

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :
Alla NESTERENKO

le : mercredi 5 décembre 2012

Titre :

Étude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application
en microencapsulation

Ecole doctorale :
Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :
Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA) - UMR 1010 INRA/INP-ENSIACET

Directeur(s) de Thèse :
Mme Françoise SILVESTRE (Professeur des universités, INP-ENSIACET, Toulouse)
Mme Vanessa DURRIEU (Maître de Conférences, INP-ENSIACET, Toulouse)

Rapporteurs :
M. Jacques GUÉGUEN (Directeur de Recherche, INRA, Nantes)
M. Jack LEGRAND (Professeur des universités, CNRS-GEPEA, Saint-Nazaire)

Membre(s) du jury :
M. Juan M. IRACHE, Président du jury (Professeur des universités,
Université de Navarre, Espagne)
M. Frédéric VIOLLEAU, Membre (Enseignant-Chercheur,
INP-EIP, Toulouse)

"Ceux qui ne font rien ne se trompent jamais"

Théodore de Banville

A toute ma famille

Les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au sein du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de l'Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (LCA, UMR 1010 INRA/INP-ENSIACET) dans le cadre d'une bourse ministérielle.

Je tiens tout d'abord à remercier Mlle Elisabeth BORREDON de m'avoir accueillie dans son laboratoire et M. Carlos VACA GARCIA, le directeur actuel du LCA, pour ses remarques et commentaires très pertinents lors des séminaires de laboratoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes directrices de thèse : Mme Françoise SILVESTRE pour ses nombreux conseils scientifiques et ses encouragements qui m'ont permis d'avancer au mieux dans ce travail, ainsi que Mme Vanessa DURRIEU pour la qualité de son encadrement, son soutien, sa continuelle disponibilité et ses qualités humaines. Je remercie Vanessa pour sa très large contribution à mon travail au quotidien, mais aussi pour la qualité et la rigueur qu'elle a apporté à ce manuscrit. Un grand merci à Mme Isabelle ALRIC pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils précieux et son aide durant ces trois années de thèse.

Je voudrais également remercier M. Jacques GUEGUEN et M. Jack LEGRAND qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Vos remarques pertinentes et vos commentaires précieux suite à la lecture de mon manuscrit m'ont permis de mettre la touche finale à celui-ci.

Merci à M. Juan M. IRACHE de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse, ainsi qu'à Mme Anne PAULHE-MASSOL qui a apporté un regard 'industriel' sur ce travail. Je suis très reconnaissante à M. Frédéric VIOLLEAU pour la participation à mon jury de thèse et pour la précieuse collaboration sur l'analyse AsFIFFF. Merci de m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Agro-Physiologie de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan, pour les connaissances que vous m'avez transmis, pour votre disponibilité et gentillesse.

Merci à toute l'équipe du LCA, les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer au quotidien. J'aimerais remercier plus particulièrement Didier DANGLA pour ses nombreuses interventions et pour son aide ; Emmanuelle DAO et Ingrid PELLETIER d'avoir assuré la disponibilité des produits nécessaires pour travailler et pour leur gentillesse ; Eric LACROUX pour le temps passé avec moi à côté de l'homogénéisateur (en le montant et démontant), pour tout son aide, sa patience et sa bonne humeur ; Anne LUNG, Jean-François FABRE, Laure CANDY, Muriel CERNY, Antoine ROUILLY, Romain VALENTIN et Virginie VANDENBOSSCHE pour l'aide et les conseils qu'ils m'ont apporté dans leurs domaines de compétences.

Je tiens également à remercier Mme Mireille GAUCHER pour son aide technique et ses conseils lors des analyses AsFIFFF et M. Yannick THEBAULT pour sa disponibilité et son aide pendant les analyses MEB.

Je remercie tous les doctorants du laboratoire LCA qui ont partagé avec moi les moments de travail et de la vie pendant ces trois années. Dorothee, merci pour ta grande gentillesse, ta patience et pour les nombreux voyages qu'on a partagé ensemble dans le bus N°79. Merci aussi d'avoir relu un chapitre de ce manuscrit et d'être notre conseillère de grammaire dans le bureau. Merci à Louise qui a assuré chaque année la déco de Noël dans le bureau. Cécile (qui a pris le relais de conseillère de grammaire dans le bureau, après le départ de Dorothee), merci pour ta gentillesse, toujours prête à rendre service et à aider, merci surtout pour le temps que tu as passé à la "chasse aux fautes" dans le manuscrit. Merci à Bastien, Assad et Benjamin pour leur participation active à la bonne ambiance dans le bureau. Je remercie particulièrement Bastien pour sa patience et son aide dans mes nombreux soucis informatiques. C'était également un réel plaisir de partager le bureau avec Christophe, Christian, Alexandre et Tian Ming.

Je pense à Leslie et Anaïs avec lesquelles nous avons avancé côte à côte pendant ces trois ans, commençant par le voyage à Graz et finissant par la soutenance. Merci les filles pour votre sympathie, ainsi que pour vos conseils lors des derniers mois précédents la soutenance. Merci également à nos amis de Tarbes, Elodie et Guillaume G., pour leur gentillesse et pour les bons moments passés ensemble, notamment à Strasbourg.

Merci à Manon pour son sourire rayonnant, William pour les délices réunionnaises, Romain pour son "salu-é" en bon humeur chaque matin, Sylvain pour les poses café régulières qui ont disparues malheureusement après son départ, Jordan pour la bonne ambiance au labo bleu. Merci à Julien B., Julien P., Clément, Houssein, Zaher, JB, Bassam, Guillaume B., Matthieu, Thibaud, Pauline, Mike, Audrey, Claire, Julie, Carl, Hermine, Sabina, Natalia, Gildas et Pranudda, pour leur sympathie et pour les bons moments passés dans une ambiance chaleureuse et agréable.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans parler des personnes qui ont pris une place particulière dans ma vie et devenues plus que des collègues de travail après ces années de thèse. Ma petite Nicoleta, merci d'avoir été là pendant ces trois ans, ce temps n'aurait pas été le même sans toi. Merci pour cette amitié, pour ton soutien sans faille (particulièrement après mes cours de conduite :)), pour toutes les petites attentions, pour ton énorme gentillesse et ton grand cœur. Anna, Lupita, et Emilie, merci pour votre soutien et pour les soirées riches en discussions et en friandises. Je suis heureuse que nos chemins se soient croisés.

Merci à Katya pour son soutien, sa gentillesse et pour les balades "déstressantes" passés dans les boutiques du Mans.

Mes sentiments les plus forts vont bien sûr à ma famille. Je remercie mes parents d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu pendant toutes ces années, même s'ils n'ont jamais très bien compris ce que je cherchais et ce que je voulais retrouver. Enfin, je veux remercier la personne la plus chère, mon mari, pour son soutien, ses encouragements, son écoute, sa patience et son aide. Merci tout simplement d'être là.

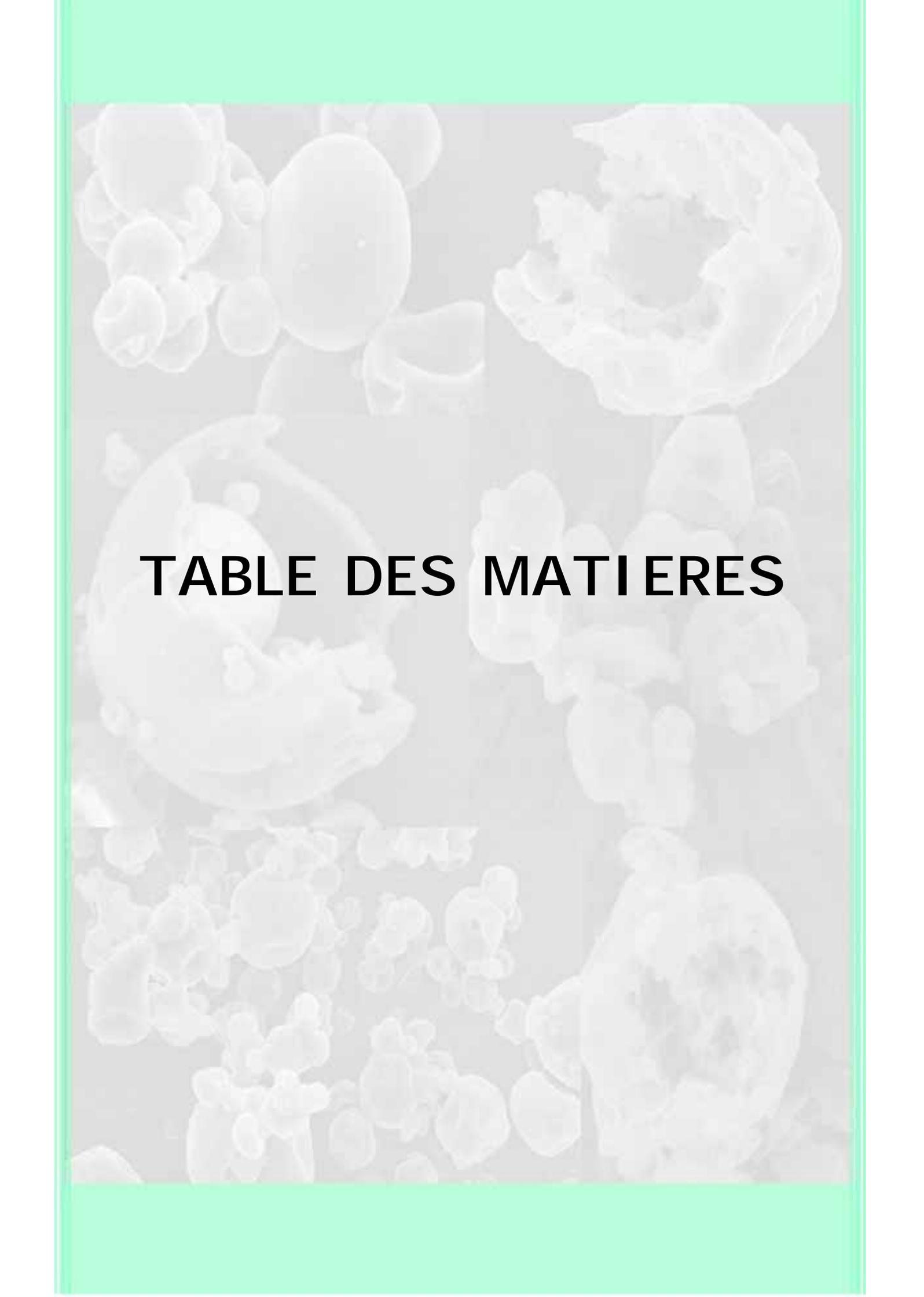


TABLE DES MATIERES

Liste des Abréviations	9
Introduction Générale	13

Chapitre I. Synthèse Bibliographique

I.1. Microencapsulation	19
I.1.1. Définition.....	19
I.1.2. Historique	19
I.1.3. Classification des microparticules	20
I.1.4. Microparticule et ses composés.....	22
I.1.4.1. Matière enrobante	22
I.1.4.1.1. Polymères synthétiques	22
I.1.4.1.2. Polysaccharides	23
I.1.4.1.3. Protéines.....	24
I.1.4.1.4. Lipides	25
I.1.4.2. Les molécules encapsulées – la matière active.....	26
I.1.4.3. Additifs	26
I.1.5. Techniques d'encapsulation.....	27
I.1.5.1. Procédés d'encapsulation chimiques.....	27
I.1.5.1.1. Polymérisation interfaciale.....	28
I.1.5.1.2. Polymérisation en milieu dispersé	28
I.1.5.2. Procédés d'encapsulation physico-chimiques	30
I.1.5.2.1. Coacervation	30
I.1.5.2.2. Evaporation de solvant.....	32
I.1.5.2.3. Gélification.....	33
I.1.5.3. Procédés d'encapsulation physico-mécaniques.....	33
I.1.5.3.1. Enrobage en lit fluidisé.....	33
I.1.5.3.2. Extrusion	35
I.1.5.3.3. Procédé basé sur la technologie de CO ₂ supercritique.....	35
I.1.5.3.4. Atomisation	36
I.2. Protéines végétales	39
I.2.1. Structure.....	39
I.2.2. Protéines d'origine animale ou végétale?	40
I.2.3. Classification.....	41
I.2.2.1. Albumines	41
I.2.2.2. Globulines	42
I.2.2.3. Glutéline et prolamine	43

I.2.4. Modification et fonctionnalisation des protéines végétales	43
I.2.4.1. Modification des protéines par traitement physico-chimique.....	44
I.2.4.2. Modification des protéines via la réaction chimique	46
I.2.4.2.1. Réaction de Maillard.....	46
I.2.4.2.2. Déamidation.....	48
I.2.4.2.3. Acylation.....	49
I.2.4.2.4. Hydrolyse enzymatique.....	51
I.2.4.2.5. Réticulation	52
I.2.4.2.6. Cationisation	54
I.3. Application des protéines végétales en microencapsulation	55
I.3.1. Protéines de soja	56
I.3.1.1. Microencapsulation par atomisation.....	57
I.3.1.2. Microencapsulation par coacervation.....	59
I.3.2. Protéines de pois.....	61
I.3.2.1. Microencapsulation par atomisation.....	62
I.3.2.2. Microencapsulation par coacervation.....	63
I.3.2.3. Protéine de pois en tant qu'additif	64
I.3.3. Protéines de blé et d'autres céréales	65
I.3.3.1. Microencapsulation par coacervation.....	66
I.3.3.2. Microencapsulation par d'autres techniques.....	67
I.3.4. Autres protéines végétales potentiellement utilisables dans la microencapsulation.....	68
I.3.4.1. Protéines de riz.....	68
I.3.4.2. Protéines d'avoine	69
I.3.4.3. Protéines de tournesol.....	69
I.4. Conclusions	72

Chapitre II. Protéines Végétales : Caractérisation et Application en Microencapsulation

II.1. Introduction	75
II.2. Généralités sur les protéines de soja et de tournesol.....	76
II.3. Caractérisation des extraits protéiques.....	77
II.3.1. Constituants des extraits protéiques	77
II.3.2. Composition en acides aminés des extraits protéiques	78
II.3.3. Fractionnement des extraits protéiques (selon la méthode d'Osborne)	80
II.3.4. Solubilité des extraits protéiques.....	82
II.3.5. Fractionnement des extraits protéiques par la technique AsFIFFF	84

II.3.6. Morphologie et taille des extraits protéiques.....	86
II.4. Atomisation des solutions protéiques : optimisation du procédé.....	88
II.4.1. Etape de préparation des solutions protéiques.....	88
II.4.2. Etape d'atomisation des solutions protéiques.....	91
II.5. Microencapsulation de l'α-tocophérol par les extraits protéiques.....	93
II.5.1. α-Tocophérol : matière active hydrophobe modèle.....	93
II.5.2. Elaboration du procédé.....	94
II.5.2.1. Etape d'émulsification.....	94
II.5.2.2. Etape d'atomisation.....	94
II.5.3. Propriétés thermiques des microparticules.....	95
II.5.4. Influence de la pression d'homogénéisation.....	97
II.5.4.1. Influence sur les propriétés des émulsions.....	97
II.5.4.1.1. Influence sur la viscosité des émulsions.....	97
II.5.4.1.2. Influence sur la taille des gouttelettes en émulsion.....	99
II.5.4.1.3. Influence sur la morphologie des émulsions.....	102
II.5.4.2. Influence sur les propriétés des microparticules.....	104
II.5.4.2.1. Influence sur le rendement d'atomisation et sur l'efficacité de microencapsulation.....	104
II.5.4.2.2. Influence sur la taille et le taux d'humidité des microparticules.....	106
II.5.5. Influence du ratio matière enrobante/matière active (extrait protéique/α-tocophérol).....	109
II.5.5.1. Influence sur les propriétés des émulsions.....	109
II.5.5.2. Influence sur les propriétés des microparticules.....	112
II.5.6. Influence de la concentration de solution protéique.....	115
II.5.6.1. Influence sur les propriétés des émulsions.....	116
II.5.6.2. Influence sur les propriétés des microparticules.....	117
II.6. Microencapsulation de l'acide ascorbique par l'extrait protéique de soja.....	119
II.6.1. Acide ascorbique : matière active hydrophile modèle.....	119
II.6.2. Conditions opératoires du procédé de microencapsulation.....	119
II.6.3. Microencapsulation de l'acide ascorbique et propriétés des microparticules.....	120
II.7. Conclusions.....	124

Chapitre III. Modifications des Extraits Protéiques et Effet sur la Microencapsulation

III.1. Introduction	129
III.2. Microencapsulation par les extraits protéiques hydrolysés	130
III.2.1. Hydrolyse enzymatique des chaînes protéiques	130
III.2.2. Fractionnement des extraits protéiques natifs et hydrolysés par la technique AsFIFFF	131
III.2.3. Propriétés des émulsions d'extraits protéiques hydrolysés et d' α -tocophérol.....	135
III.2.4. Propriétés des microparticules d'extraits protéiques hydrolysés et d' α -tocophérol..	138
III.3. Microencapsulation par les extraits protéiques acylés	140
III.3.1. Acylation des chaînes protéiques	140
III.3.1.1. Influence de la longueur de la chaîne grasse.....	141
III.3.1.2. Influence du ratio protéine/chlorure d'acide gras	142
III.3.2. Microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques acylés.....	143
III.3.2.1. Influence de la longueur de la chaîne grasse et du ratio protéine/chlorure d'acide gras	143
III.3.2.1.1. Propriétés des émulsions d'extraits protéiques acylés et d' α -tocophérol.....	143
III.3.2.1.2. Propriétés des microparticules d'extraits protéiques acylés et d' α -tocophérol	146
III.3.2.2. Influence du ratio matière enrobante/matière active	150
III.3.3. Microencapsulation de l'acide ascorbique par les extraits protéiques acylés	154
III.4. Microencapsulation par les extraits protéiques réticulés	155
III.4.1. Réticulation des chaînes protéiques.....	156
III.4.2. Microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques réticulés.....	157
III.5. Microencapsulation par les extraits protéiques cationisés	161
III.5.1. Cationisation des chaînes protéiques.....	161
III.5.1.1. Cationisation de l'extrait protéique de soja	162
III.5.1.2. Cationisation de l'extrait protéique de tournesol	164
III.5.2. Microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques cationisés	165
III.5.3. Microencapsulation de l'acide ascorbique par les extraits protéiques cationisés	167
III.6. Etude de la libération de l'α-tocophérol	168
III.7. Conclusions	170

Chapitre IV. Matériels et Méthodes

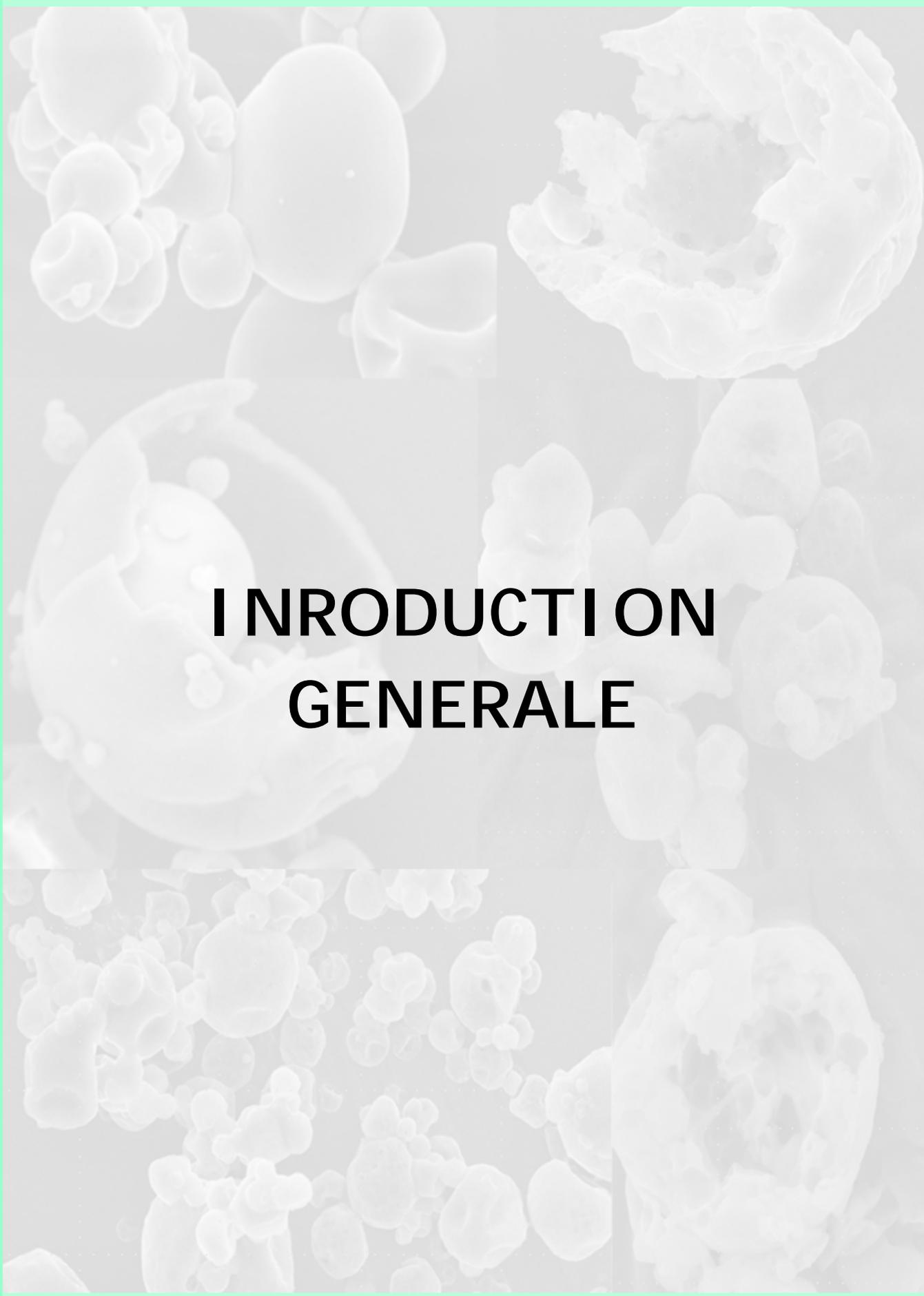
IV.1. Matériels.....	173
IV.1.1. Matières enrobantes : extraits protéiques de soja et de tournesol.....	173
IV.1.2. Matières actives.....	173
IV.1.3. Solvants et réactifs.....	173
IV.2. Méthodes.....	174
IV.2.1. Caractérisation et analyse des extraits protéiques.....	174
IV.2.1.1. Teneur en différents composants.....	174
IV.2.1.2. Evaluation de la solubilité des extraits protéiques par la méthode Kjeldahl.....	175
IV.2.1.3. Fractionnement des extraits protéiques selon la méthode d'Osborne.....	175
IV.2.1.4. Analyse de la composition en acides aminés.....	176
IV.2.2. Modifications des extraits protéiques.....	176
IV.2.2.1. Hydrolyse.....	176
IV.2.2.1.1. Hydrolyse acide totale.....	176
IV.2.2.1.2. Hydrolyse enzymatique partielle.....	176
IV.2.2.2. N-acylation selon Schotten-Baumann.....	177
IV.2.2.3. Réticulation enzymatique.....	178
IV.2.2.4. Cationisation avec le chlorure de glycidyltriméthylammonium.....	179
IV.2.3. Procédé d'encapsulation de référence.....	179
IV.2.3.1. Préparation des solutions protéiques.....	179
IV.2.3.2. Préparation des émulsions avec les extraits protéiques et l' α -tocophérol.....	179
IV.2.3.2.1. Préparation des émulsions avec les extraits protéiques solubilisés à pH alcalin.....	179
IV.2.3.2.2. Préparation des émulsions avec les extraits protéiques réticulés.....	180
IV.2.3.3. Préparation des solutions d'extrait protéique/acide ascorbique.....	180
IV.2.3.4. Atomisation – préparation des microparticules.....	181
IV.2.4. Caractérisations physico-chimiques des extraits protéiques, émulsions, microparticules.....	182
IV.2.4.1. Mesure de la viscosité.....	182
IV.2.4.2. Détermination de l'efficacité de microencapsulation.....	182
IV.2.4.2.1. Dosage du taux d' α -tocophérol dans les microparticules.....	182
IV.2.4.2.2. Dosage de l'acide ascorbique dans les microparticules.....	183
IV.2.4.3. Conditions de fractionnement des extraits protéiques par AsFFFF.....	183
IV.2.4.4. Observations microscopiques.....	184
IV.2.4.4.1. Microscopie optique – analyse des émulsions.....	184
IV.2.4.4.2. Microscopie électronique à balayage – analyse des microparticules.....	185

IV.2.4.5. Granulométrie (mesure de taille des particules).....	185
IV.2.4.5.1. Voie liquide – analyse des émulsions.....	185
IV.2.4.5.2. Voie sèche – analyse des microparticules.....	186
IV.2.4.6. Analyse thermogravimétrique	186
IV.2.4.7. Libération de l'α-tocophérol	186
IV.2.4.8. Mesure du potentiel zêta	187
IV.2.4.9. Mesure du taux d'humidité.....	187
Conclusion Générale	191
Références bibliographiques	197
Annexes	217
Production Scientifique	231



LISTE DES ABREVIATIONS

AA	acide ascorbique
AsFIFFF	asymmetrical flow field-flow fractionation
ATG	analyse thermogravimétrique
BSA	albumine du sérum bovin
C8	chlorure d'octanoyle
C12	chlorure de dodécanoyle
C16	chlorure de hexadécanoyle
DH	dégré d'hydrolyse
EME	efficacité de microencapsulation
GTMAC	chlorure de glycidyltrialkylammonium
MEB	microscopie électronique à balayage
OPA	ortho-phthaldialdéhyde
POE	poly(oxyde d'éthylène)
PS	extrait protéique de soja
PT	extrait protéique de tournesol
PTFE	polytétrafluoroéthylène
RA	rendement d'atomisation
T	α -tocophérol
TA	taux d'acylation
TC	taux de cationisation
TG	transglutaminase
TME	taux de microencapsulation
TR	taux de réticulation
UV	ultraviolet



I NRODUCTION GENERALE

Au cours des dernières décennies, l'utilisation des polymères biodégradables, issus de la biomasse, a constitué une nouvelle filière de l'industrie avec un impact positif sur l'environnement et une grande variabilité et disponibilité des matières premières. Le développement de ces matériaux permettrait à long terme de réduire la consommation des polymères non-renouvelables d'origine pétrochimique.

Parmi les polymères naturels renouvelables, les protéines végétales ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Ces biopolymères ont l'avantage d'être disponibles en grande quantité et à faible coût. A ce jour, les protéines d'origine végétale intéressent autant les chercheurs, pour leurs propriétés fonctionnelles avantageuses (propriétés émulsifiantes, moussantes, gélifiantes) [1,2], que les industriels, qui les utilisent dans de nombreuses applications, notamment dans le domaine agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique ou des matériaux.

Néanmoins, l'utilisation des protéines végétales peut nécessiter des modifications structurales permettant de moduler leurs propriétés et ainsi d'élargir leur champ d'applications. L'intérêt d'utiliser des protéines réside dans la possibilité de leur apporter de nouvelles fonctionnalités par modification chimique ou enzymatique. Les travaux de recherche menés sur des protéines végétales confirment que certaines modifications peuvent offrir à ces matériaux des propriétés fonctionnelles améliorées [3-7].

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des protéines végétales extraites des graines de tournesol pour une application en microencapsulation. En effet, la filière de la culture du tournesol, très répandue en Europe pour la production d'huile, donne également lieu à la production de tourteaux, constitués en grande partie de protéines (40-45 %). Aujourd'hui, les tourteaux de tournesol sont utilisés essentiellement en alimentation animale, mais ils représentent une source de matériaux biodégradables avec un grand potentiel de valorisation.

Plusieurs travaux ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle concernant la valorisation de tourteaux et de protéines de tournesol pour les agromatériaux composites [8-11]. Nous avons repris ce savoir faire dans le but de développer, au cours de cette thèse, une nouvelle voie de valorisation des protéines de tournesol en les utilisant comme matériau enrobant en microencapsulation.

Les protéines de soja, déjà décrites dans la littérature comme matériau enrobant en microencapsulation [12-18], ont été utilisées dans notre étude en tant que protéines de

référence. Elles présentent l'avantage d'être disponibles en grande quantité et à moindre coût. Les protéines de soja et de tournesol, sont issues des plantes oléo-protéagineuses et possèdent des compositions et des propriétés physico-chimiques proches [19].

L'objectif principal de ces travaux est d'étudier la pertinence de l'utilisation d'isolat protéique de tournesol en microencapsulation de principes actifs par atomisation. Le protocole mis au point doit être respectueux pour l'environnement, efficace, simple et peu coûteux.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse est d'améliorer la compréhension des interactions entre le principe actif et le matériau enrobant pendant l'encapsulation. En effet, l'affinité entre la matière enrobante et la matière active, ainsi que l'efficacité de microencapsulation et les propriétés des microparticules peuvent être influencées par les différents paramètres, tels que la nature du principe actif (hydrophile ou hydrophobe) et les propriétés fonctionnelles des protéines (la présence des domaines hydrophobes/hydrophiles, la longueur de chaînes, la solubilité). De nombreux travaux dans la littérature décrivent l'utilisation des protéines végétales en tant que matériau enrobant en microencapsulation. Mais, à notre connaissance, aucun auteur n'a étudié l'influence de modifications chimiques ou enzymatiques sur le comportement des protéines, particulièrement de soja et de tournesol, en tant que matériau enrobant en microencapsulation, d'où l'originalité de ce travail.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

Le **premier chapitre** de ce mémoire est consacré à une synthèse bibliographique dans laquelle sont présentés le principe de la microencapsulation, ainsi que les protéines végétales, notamment les possibilités de modification des chaînes protéiques et la description des protéines végétales déjà étudiées en tant que matériau enrobant en microencapsulation.

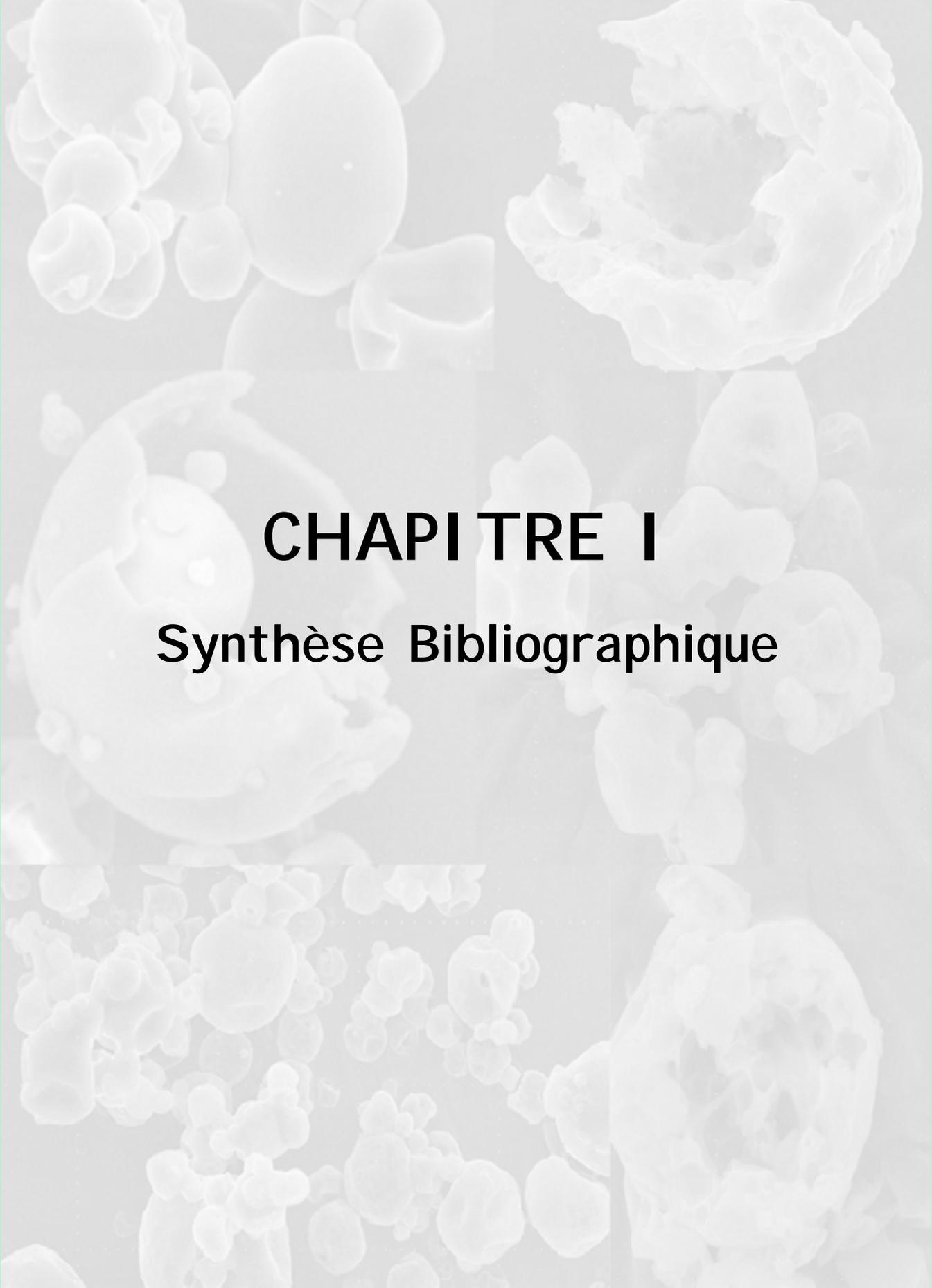
Les résultats obtenus au cours de ce travail sont décrits dans le deuxième et troisième chapitre du manuscrit. Dans le **second chapitre**, après la description des deux extraits protéiques choisis pour cette étude, nous décrivons la mise en place et l'optimisation d'un protocole de microencapsulation en utilisant la technique d'atomisation. Par la suite, nous abordons l'influence des différents paramètres sur le procédé d'encapsulation et sur les propriétés des microparticules obtenues.

Le **troisième chapitre** de ce manuscrit traite de la fonctionnalisation des extraits protéiques par différentes voies, tout en respectant les principes de la chimie verte. Ensuite, l'utilisation des protéines modifiées en microencapsulation d'un principe actif hydrophobe ou hydrophile est développée. Ce chapitre comporte quatre parties principales correspondant aux quatre

modifications réalisées : l'hydrolyse, l'acylation, la réticulation et la cationisation. L'influence de la fonctionnalisation sur le procédé de microencapsulation et sur les propriétés des microparticules est évaluée dans chaque partie. De même, les résultats obtenus avec les extraits protéiques modifiés sont comparés à ceux obtenus avec les extraits protéiques natifs. Une étude préliminaire sur la cinétique de libération de la matière active contenue dans les microparticules achève ce chapitre.

Le **quatrième** et dernier **chapitre** présente les matériels d'étude, les protocoles expérimentaux, ainsi que la description des appareillages et techniques d'analyse utilisés au cours de ce travail.

Une conclusion générale présentera le bilan de ce travail de thèse et dressera les perspectives envisagées pour la suite de la recherche.



CHAPITRE I
Synthèse Bibliographique

I.1. Microencapsulation

I.1.1. Définition

La microencapsulation est une technique de protection de matières sensibles (à l'état solide, liquide ou gazeux) appelées aussi matières actives à l'aide d'une matière enrobante par formation de particules de taille micrométrique [20]. Ce procédé permet de créer une barrière de protection pour les molécules encapsulées et de contrôler leur relargage dans un milieu donné. Le contenu d'une capsule individualisée est protégé de l'environnement par la matière enrobante et peut être libéré sous l'action de la température, d'enzymes, du changement de pH du milieu, de l'action mécanique ou simplement par la diffusion à travers la matière enrobante poreuse.

Les principales motivations pour l'encapsulation d'un matériau sont :

- l'augmentation de la stabilité des ingrédients sensibles (protection de la matière encapsulée contre l'oxydation ou des effets de milieu ambiant tels que la chaleur, l'humidité ou le pH) ;
- la conversion des liquides en poudres fluides ;
- le masquage d'odeur, du goût ou d'activité des matériaux encapsulés ;
- la diminution de la vitesse d'évaporation de la matière active volatile ;
- la formulation des principes actifs utilisés en très petites quantités ;
- la libération contrôlée ou ciblée de composants actifs.

I.1.2. Historique

La première application industrielle de microparticules date des années 1950 quand Green et Schleicher ont encapsulé des particules de pigments dans des polymères naturels (protéine/gélatine et polysaccharide/gomme arabique) par coacervation complexe. Cette stratégie, utilisée pour la production de papier "carbone", permet la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression en encapsulant des colorants [21]. Le principe repose sur la préparation d'une dispersion de microcapsules où la matière encapsulée est composée d'un agent colorant qui couvre le recto des feuilles de papier. Le contenu des capsules se libère grâce à l'action mécanique d'une machine à écrire et il change de couleur quand il réagit avec la colle acide qui couvre l'autre face du papier (Figure I - 1). Le papier autocopiant est l'un des produits les plus importants fabriqués par la méthode de microencapsulation. Il représente encore aujourd'hui une application très importante en volume de microparticules produites – plusieurs milliers de tonnes par an.

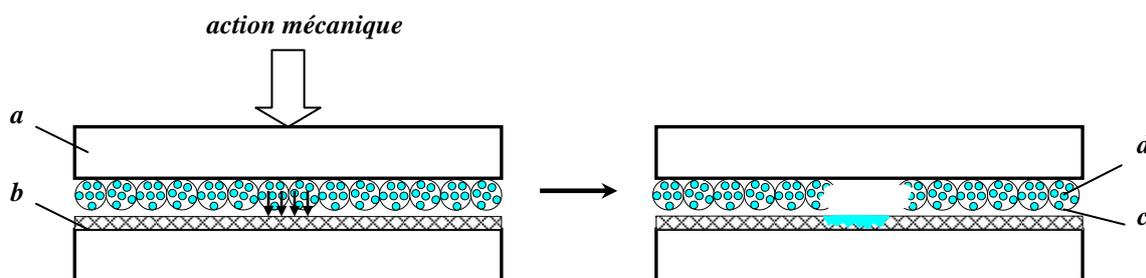


Figure I - 1. Système de triple-couche du papier autocopiant avec des microcapsules : (a) papier, (b) colle acide, (c) microcapsule, (d) solution du colorant.

Dans les années 1960, l'encapsulation de cristaux liquides par la gélatine et la gomme d'acacia pour la production de matériaux pour écrans thermosensibles a été décrite par Ferguson [22]. Cette méthode d'encapsulation a permis le développement des écrans à cristaux liquides utilisés pour les structures aérospatiales.

Au cours des dernières années, la microencapsulation s'est considérablement développée à l'échelle industrielle. Les microparticules ont des applications très variées, elles sont utilisées pour la production de textiles parfumés [23] et de produits cosmétiques [24,25], pour la protection des récoltes agricoles [26,27], dans l'agroalimentaire pour donner de nouvelles propriétés aux aliments (encapsulation d'arômes, colorants, épices) [20], mais aussi dans les produits phytosanitaires [28,29] et dans le domaine de la médecine et de la pharmacie [30-34].

I.1.3. Classification des microparticules

Le type de particules obtenues par microencapsulation dépend des propriétés physico-chimiques de la matière active et de la matière enrobante, de leur composition et de la technique utilisée. Les microparticules peuvent se présenter sous différentes structures dont les deux plus simples sont la structure réservoir (microcapsule) et la structure matricielle (microsphère) [35] :

- la microcapsule est une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide ou solide entouré d'une enveloppe solide continue de matériau enrobant ;
- la microsphère est constituée d'un réseau macromoléculaire continu, formant une matrice dans laquelle la matière active est finement dispersée, à l'état de fines particules solides ou encore de gouttelettes liquides.

Ces deux types de morphologie de microparticules ainsi que quelques variantes plus complexes sont présentés sur la [Figure I - 2](#).

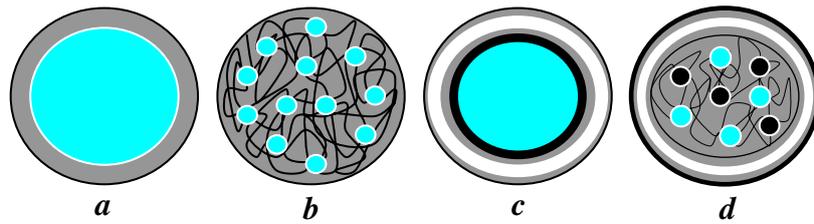


Figure I - 2. Morphologie de particules obtenues par microencapsulation : (a) microcapsule simple, (b) microsphère simple, (c) microcapsule multi-enveloppe, (d) microsphère avec double cœur actif/multi-enveloppe.

En ce qui concerne leur forme, les microparticules ne sont pas nécessairement sphériques, elles peuvent également avoir une forme irrégulière. Lorsqu'une particule solide est encapsulée, la matière enrobante épouse généralement les contours de la particule, ce qui conduit à une grande variété de formes. En revanche, la taille est un dénominateur commun à ces systèmes : elle est comprise entre 1 μm et 1000 μm . En deçà, on parlera de nanoparticules et au-delà de minigranules.

La production de microparticules s'accompagne fréquemment d'une certaine polydispersité en taille : distribution gaussienne, apparition de deux ou plusieurs populations. Seules les techniques basées sur la formation de gouttelettes ou sur la polymérisation en milieu dispersé permettent l'obtention de microparticules proches de la monodispersité. Comme la taille moyenne et la distribution granulométrique sont en relation directe avec la surface spécifique des microparticules, ces paramètres vont influencer certaines propriétés comme notamment la libération de la matière active dans le milieu environnant.

La teneur en matière active (taux d'encapsulation) peut être très élevée dans les microcapsules, de l'ordre de 85 % à 90 %. Au contraire, les teneurs habituellement rencontrées dans les microsphères sont plus faibles, de l'ordre de 20 % à 50 %. Par contre les propriétés de relargage de matière active sont souvent plus avantageuses dans le cas des microsphères. La diffusion progressive du principe actif du fait de sa dispersion dans la matrice est particulièrement adaptée à certaines applications, notamment dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique [35].

En ce qui concerne le relargage, deux systèmes existent : les systèmes à libération déclenchée et ceux à libération prolongée. Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane étanche qui vont libérer brutalement leur contenu par fusion ou éclatement de la membrane. Les systèmes à libération prolongée se distinguent les uns des autres par les mécanismes de libération mis en jeu (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant, échange d'ions) et par leur structure

(microcapsule ou microsphère) qui vont directement influencer la cinétique de libération résultante [35].

I.1.4. Microparticule et ses composés

Les constituants principaux d'une particule obtenue par microencapsulation sont la matière enrobante et la matière active. Afin d'améliorer la stabilité du système et/ou lui apporter des fonctionnalités désirées, des additifs peuvent également être ajoutés. Les constituants de microparticules le plus souvent utilisés sont présentés ci-dessous.

I.1.4.1. Matière enrobante

Le système enrobant joue un rôle principal sur l'efficacité, la stabilité des microparticules et sur le degré de protection de la matière active. En général, les critères de choix des matériaux enrobants sont basés sur leurs propriétés physico-chimiques (stabilité, humidité, pH, oxydation), thermiques et mécaniques. L'enrobage permet de modifier radicalement l'aspect du produit encapsulé : masquer le goût et l'odeur, changer l'état de surface, la solubilité, la rhéologie ou l'état fondamental, comme par exemple transformation des liquides ou des gaz en poudres fluides [36].

Suivant le procédé utilisé, le matériau enrobant est constitué d'un ou plusieurs polymères (Paragraphe I.1.5). L'avantage des systèmes enrobants polymériques (à base des polymères naturels ou synthétiques) réside dans la possibilité de fonctionnalisation des chaînes ce qui permet l'obtention de nouvelles propriétés telles que la résistance aux températures élevées et aux agents chimiques.

I.1.4.1.1. Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont largement utilisés comme matrice de microparticules. Les particules enrobées par les polymères synthétiques sont généralement utilisées dans la médecine et la pharmacie. Par exemple, le polyacrylate est utilisé pour encapsuler le paracétamol [30], des cellules vivantes [33] ou des cellules endocrines [34]. D'autres exemples de polymères synthétiques utilisés pour protéger des composés actifs sensibles sont présentés dans le [Tableau I - 1](#).

Tableau I - 1. Exemples d'utilisation des polymères synthétiques comme matière enrobante en microencapsulation.

Polymère	Matière active	Technique d'encapsulation	Application	Référence
Acide polylactique/ Acide polylactique- co-glycolique	Principes actifs hydrophobes	Atomisation	Médicaments	[37]
		Coacervation		
		Gélification		
		Technologie des fluides supercritiques		
Polystyrène	Matériau à changement de phase	Polymérisation en suspension	Textile	[38,39]
Poly(acrylate d'alkyl)	Insuline	Polymérisation en émulsion	Médicaments	[40,41]
Polyuréthane	Catalyseur	Polymérisation interfaciale	Catalyse	[42]
Polyacrylonitrile	Hépatocytes	Co-extrusion	Biomédecine	[43,44]
Poly(éthylène glycol)	Felodipine	Enrobage en lit fluidisé avec CO ₂ supercritique	Médicaments	[45,46]

Un autre avantage des systèmes d'enrobage à base de polymères synthétiques est la possibilité d'utiliser des copolymères à blocs ou des mélanges de polymères avec d'autres matériaux. Les systèmes de ce type permettent de conjuguer différentes propriétés (ou fonctionnalités). Par exemple, grâce aux propriétés amphiphiles des copolymères à blocs tels que le polycaprolactone-*b*-poly(oxyde d'éthylène), l'encapsulation d'un principe actif hydrophobe peut être envisagée [47]. Elversson et Millqvist-Fureby ont étudié le mélange alcool polyvinylique/dextrane pour l'encapsulation du sérum albumine bovine [48]. L'enrobage polymérique peut également être créé grâce à une réaction de polymérisation interfaciale, où le polymère formé le plus souvent est un polyuréthane [49-52].

I.1.4.1.2. Polysaccharides

Les hydrocolloïdes de type polysaccharide ont largement fait leur preuve dans le domaine de la microencapsulation et sont d'usage courant dans de nombreux secteurs d'activité (cosmétique, textile, pharmacie, agroalimentaire) [53]. L'avantage majeur de ces matériaux réside dans leur diversité, leur capacité à lier les arômes, une faible viscosité à une concentration élevée dans la solution, une bonne solubilité et un faible coût. Ils peuvent agir en tant que matériaux d'encapsulation et également en tant que stabilisateurs d'émulsion pour les autres matières

enrobantes. Les polysaccharides les plus étudiés dans l'encapsulation sont présentés dans le [Tableau I - 2](#).

Tableau I - 2. Exemples d'utilisation des polysaccharides comme matière enrobante en microencapsulation.

Polysaccharide	Matière active	Technique d'encapsulation	Application	Référence
Amidon	Arômes	Gélification	Alimentaire	[54]
		Atomisation		[55-57]
Maltodextrine	Arômes	Atomisation	Alimentaire	[56]
	Bétalaïne (colorant)			[58]
	Probiotiques	Lyophilisation		[59]
Gomme arabique (gomme d'acacia)	Arômes	Atomisation	Alimentaire	[56,57]
	Fe ₂ O ₃	Coacervation	Biomédecine	[60]
	Endoglucanase (enzyme)	Séchage à l'air et broyage	Détergents	[61]
Chitosane	Astaxanthine (pigment)	Evaporation de solvant	Alimentaire	[62]
	Ampicilline	Atomisation	Pharmacie	[63]
Cellulose/ Ethylcellulose	Protéine	Evaporation de solvant	Médecine	[64]
	Polyphénols	Coacervation	Alimentaire	[65]
Pectine	Huile de poisson	Atomisation	Alimentaire	[66]

Les données rassemblées dans le [Tableau I - 2](#) montrent que les polysaccharides sont généralement utilisés pour l'encapsulation des ingrédients actifs dans l'industrie alimentaire, mais aussi pour la préparation de médicaments ou de détergents. Les polysaccharides présentent un bon compromis entre le coût et l'efficacité, des bonnes propriétés organoleptiques, une viscosité basse et une variété de poids moléculaires. La gomme arabique, par exemple, est principalement utilisée pour ses propriétés émulsifiantes et filmogènes qui la rendent plus efficace que les maltodextrines ou l'amidon seul. Pour encapsuler une matière active, le polysaccharide peut être utilisé seul ou mélangé avec les autres composants de la matrice, notamment les autres carbohydrates ou les protéines.

I.1.4.1.3. Protéines

Les protéines d'origine végétale (protéines de soja, protéines de pois, protéines de blé) et animale (protéines de lait, protéines d'œuf, caséine, gélatine) peuvent être employés comme

matériaux enrobants en microencapsulation. Quelques exemples d'utilisation des protéines en microencapsulation sont présentés dans le [Tableau I - 3](#).

Tableau I - 3. Exemples d'utilisation des protéines comme matière enrobante en microencapsulation.

Protéine	Matière active	Technique d'encapsulation	Application	Référence
Gélatine	Shikonine	Coacervation	Pharmacie	[31]
	Lycopène (pigment)	Atomisation	Alimentaire	[67]
Protéine de soja	Hydrolysate de caséine	Atomisation	Alimentaire	[17,68]
	Riboflavine	Gélification		[13]
	Huile de poisson	Coacervation	[69]	
Protéine de lait	Vitamine B ₁	Coacervation	Alimentaire	[70]
	Gras de lait	Atomisation		[71,72]
	Théophylline	Gélification	Médecine	[73]
Caséine	Pyrronitrine	Coacervation	Médecine	[74]
	Huile de poisson	Atomisation	Alimentaire	[75]

L'utilisation des protéines comme matériau enrobant en microencapsulation présente plusieurs avantages :

- les protéines sont biocompatibles et biodégradables ;
- la nature amphiphile des chaînes protéiques permet d'encapsuler des matières actives hydrophobes ou hydrophiles ;
- la masse moléculaire élevée et la flexibilité de leurs chaînes permettent de bien enrober et de protéger la matière active.

Une fois en solution, les protéines forment des réseaux tridimensionnels grâce aux contributions des liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, électrostatiques et de Van der Waals. Grâce à leur structure complexe et à la présence des groupements fonctionnels différents, les protéines possèdent des propriétés fonctionnelles bénéfiques, telles que les capacités émulsifiante et moussante, la bonne solubilité et les propriétés gélifiantes, ce qui rend leur utilisation dans la microencapsulation intéressante.

I.1.4.1.4. Lipides

Il existe une grande variété de lipides (graisses, huiles, glycérides, phospholipides, glycolipides, cires) qui peuvent être utilisés dans la microencapsulation en tant que matériaux enrobants [76-78]. Les lipides tels que les triglycérides, les caroténoïdes et les phytosterols sont capables de

créer une barrière de protection pour les molécules lipophiles bioactives, de protéger les composés sensibles contre l'humidité et de transporter des ingrédients en milieu aqueux [79]. Les lipides amphiphiles, tels que les glycérides, les phospholipides et les glycolipides ont la possibilité de stabiliser des émulsions et de provoquer l'auto-assemblage des molécules dans les structures supramoléculaires [20]. Ces propriétés de surface permettent aux lipides amphiphiles de protéger les molécules sensibles (à l'oxydation, l'humidité, l'action des substances chimiques ou encore à pH du milieu), ainsi que de mieux disperser les molécules hydrophiles au sein de la préparation liquide.

I.1.4.2. Les molécules encapsulées – la matière active

La matière active est la partie qui détermine l'utilisation suivante des microparticules produites. La nature des substances actives utilisées dans la microencapsulation est très variable. Parmi les ingrédients que l'on peut protéger et isoler se trouvent :

- des arômes, des huiles essentielles et des substances aromatisantes volatiles [80-82] ;
- des vitamines, comme l'acide ascorbique (vitamine C) [83,84], le β -carotène (vitamine A) [85-87], l' α -tocophérol (vitamine E) [88-90] ;
- des lipides sensibles à l'oxydation tels que des acides gras polyinsaturés [72,91,92] ;
- des acides et bases alimentaires (acide citrique, bicarbonate de sodium) [93] ;
- des additifs alimentaires (colorants, conservateurs) [18] ;
- des bactéries et des enzymes [94-96] ;
- des principes actifs pour l'industrie pharmaceutique [30,33,34] ;
- des principes actifs cosmétiques [24,25] ;
- des minéraux (sels du calcium ou du fer) [97].

I.1.4.3. Additifs

En plus du matériau enrobant et la matière active, certains additifs peuvent également être ajoutés dans le système avant la microencapsulation. Parmi les additifs les plus souvent utilisés en microencapsulation on trouve les agents tensioactifs [49,51,52,56,57,69,74,90,98,99], les agents antimicrobiens [100-103] ou encore les agents réticulants [102,104].

Dans le cas de l'utilisation d'un principe actif hydrophobe, la stabilisation de l'émulsion, avant l'étape de microencapsulation, peut se faire en présence d'un agent tensioactif. Les surfactants utilisés pour stabiliser la phase huileuse de l'émulsion sont les oléates de sorbitane (Span) [49,52,69], les polysorbates (Tween) [51,56,57,74,90], le polyricinoléate de polyglycérole [20] et les copolymères à blocs (Synperonic) [98,99]. Ces tensioactifs sont ajoutés dans les préparations liquides en faible quantité (de 0,5 % à 5 %).

Afin de prévenir la multiplication des microorganismes dans le système et de le stabiliser efficacement, des agents antimicrobiens, notamment l'azoture de sodium, peuvent être utilisés [100-103].

Les agents de réticulation sont parfois utilisés après l'étape de microencapsulation pour consolider l'enrobage polymérique et lui apporter de meilleures propriétés mécaniques dans le but de protéger les particules formées contre la coalescence et la libération préalable de la matière active. Par exemple, dans le cas de l'encapsulation de principes actifs par des protéines, le glutaraldéhyde est souvent utilisé comme agent de réticulation [102,104].

Avant l'utilisation d'un additif il est nécessaire de connaître ses propriétés, notamment la compatibilité avec l'application visée. Par exemple, les additifs comme l'azoture de sodium et le glutaraldéhyde présentent une toxicité élevée et leur utilisation dans les produits destinés à la consommation humaine est limitée [105,106].

I.1.5. Techniques d'encapsulation

Les procédés de microencapsulation sont variés ; il existe plusieurs classifications de ces techniques [35]. Elles peuvent être classées selon l'utilisation ou non de solvants organiques, selon le coût énergétique des techniques ou encore selon leur application dans un domaine ou un autre. Cependant, la classification la plus courante est présentée dans le **Tableau I - 4**.

Tableau I - 4. Procédés de microencapsulation.

Procédés chimiques	Procédés physico-chimiques	Procédés physico-mécaniques
<ul style="list-style-type: none"> • polymérisation interfaciale • polymérisation en milieu dispersé • polymérisation radicalaire ou anionique 	<ul style="list-style-type: none"> • coacervation (simple ou complexe) • évaporation-extraction de solvant • gélification thermique 	<ul style="list-style-type: none"> • atomisation • gélification ou congélation de gouttes • enrobage en lit fluidisé • extrusion • procédé basé sur la technologie des fluides supercritiques

I.1.5.1. Procédés d'encapsulation chimiques

L'encapsulation par voie chimique consiste en la polymérisation autour de la matière active (pure ou en solution) d'un ou plusieurs monomères conduisant à la formation in situ d'une membrane de protection. Plusieurs types de polymérisation peuvent être envisagés : polycondensation, polymérisation radicalaire ou anionique.

I.1.5.1.1. Polymérisation interfaciale

L'encapsulation par polymérisation interfaciale nécessite la formation d'une émulsion, dans laquelle deux monomères réactifs sont solubles respectivement dans chacune des phases de l'émulsion et où la matière active se trouve dans la phase dispersée [107]. La réaction de polymérisation se déroule alors à l'interface des gouttelettes contenant la matière active (pure, en solution ou en dispersion) créant ainsi la paroi des microcapsules (Figure I - 3) [108].

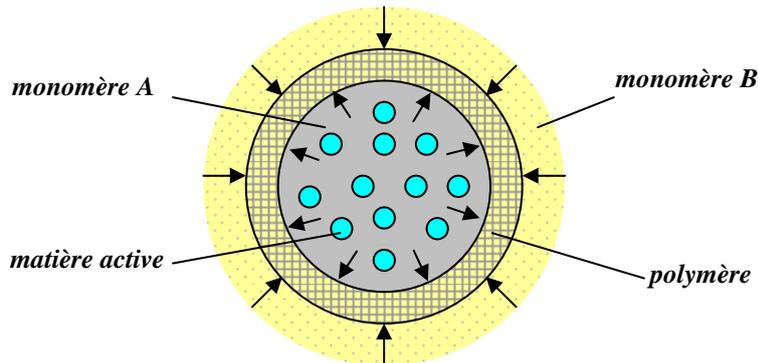


Figure I - 3. Représentation du procédé de microencapsulation par polymérisation (polycondensation) interfaciale.

Ce procédé s'applique à des solutions de matières actives aussi bien liposolubles [109,110] que hydrosolubles [111]. La voie de polymérisation majoritairement utilisée est la polycondensation, permettant notamment la formation de membranes polyuréthanes et polyamides. Les particules obtenues par cette technique ont des tailles comprises entre quelques μm et une centaine de μm .

Les principales limitations du procédé de polymérisation interfaciale sont liées aux possibilités de réaction chimique incontrôlée entre la matière active et les monomères utilisés pour former la membrane, ainsi que la solubilité de la matière active dans le solvant de la phase continue qui peut entraîner sa migration et limiter le taux d'encapsulation. Les solvants organiques utilisés dans ce procédé sont principalement le cyclohexane, le chloroforme, l'éthylènediamine ou encore le dichlorométhane [108-111].

I.1.5.1.2. Polymérisation en milieu dispersé

Le procédé chimique de microencapsulation en milieu dispersé peut avoir lieu en dispersion, émulsion ou encore en microsuspension [35]. La voie de polymérisation peut être soit anionique soit radicalaire.

De façon générale, le monomère est solubilisé dans la phase continue d'une dispersion (émulsion, suspension), alors que le principe actif se trouve dans la phase dispersée (Figure I - 4a). Après amorçage de la réaction de la polymérisation, les polymères formés précipitent à partir d'une longueur de chaînes critique formant ce que l'on appelle les noyaux primaires (Figure I - 4b). La précipitation des chaînes polymériques autour du principe actif permet la formation d'une particule finale de type microcapsule (Figure I - 4c). Pendant le procédé d'encapsulation par polymérisation en milieu dispersé, un tensioactif peut être utilisé dans la phase continue pour stabiliser les agrégats de polymères et aider à leur précipitation autour des gouttelettes contenant le principe actif.

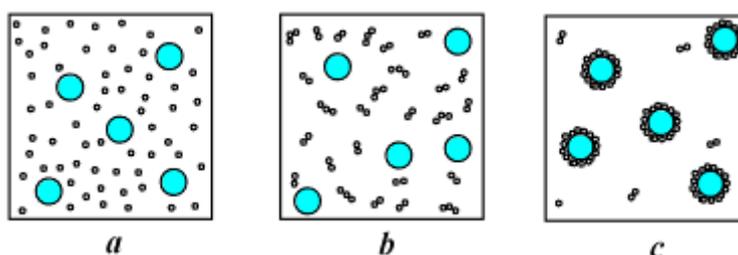


Figure I - 4. Principe du procédé de microencapsulation par polymérisation en milieu dispersé : (a) matière active dispersée dans la solution de polymères, (b) formation des noyaux du polymère et (c) formation de microcapsule.

Il est important de préciser que pour que la microencapsulation par polymérisation en milieu dispersé soit efficace, les conditions d'étalement entre les différentes phases doivent être respectées. Pour assurer des conditions d'encapsulation efficaces, il suffit que la tension interfaciale entre la matière active et la phase continue soit supérieure à celle entre la matière active et le coacervat. Les principaux paramètres du procédé déterminant les caractéristiques finales des microcapsules sont :

- l'agitation (mode d'agitation, vitesse, temps) qui conditionne le diamètre moyen et la distribution en taille des particules ;
- la concentration de la solution de polymère qui détermine l'homogénéité de la membrane d'enrobage et la distribution des masses moléculaires de cette membrane ;
- dans le cas de l'utilisation d'un tensioactif, sa nature et la concentration dans le milieu ont une influence sur le diamètre des microcapsules.

Le plus souvent, cette technique d'encapsulation est utilisée pour enrober les nanoparticules solides, notamment le dioxyde de titane, la silice, l'oxyde de fer (oxyde magnétique) ou encore l'argent [112-115]. Les polymères formés au cours de l'encapsulation sont le polyacrylate, le polystyrène et le polyacrylamide. Les solvants utilisés dans la réaction de polymérisation peuvent être l'éthanol/eau, le méthanol et le cyclohexane. Les tailles des particules obtenues par

microencapsulation par polymérisation en milieu dispersé varie entre quelques dizaines de nm et quelques μm .

Les procédés d'encapsulation chimiques sont largement utilisés dans le domaine phytosanitaire pour la production de microcapsules d'insecticides, d'herbicides et de fongicides avec des membranes de polyamide, polyurée ou polyuréthane et dans le domaine de la biologie pour encapsuler des molécules actives telles que l'hémoglobine, des enzymes et des anticorps [35].

I.1.5.2. Procédés d'encapsulation physico-chimiques

Les procédés physico-chimiques sont basés sur les variations de solubilité et les conditions de précipitation des agents enrobants. Il s'agit par exemple de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution, par ajout d'un non-solvant ou d'un polymère incompatible (coacervation). Les autres méthodes se basent sur la variation de température de la solution (évaporation du solvant) ou sur le changement d'état, comme solidification, des agents enrobants (gélification thermique d'émulsions).

I.1.5.2.1. Coacervation

Le terme de coacervation décrit le phénomène de désolvatation de macromolécules conduisant à une séparation de phases au sein d'une solution. A l'issue de la coacervation, deux phases seront en présence dans le milieu :

- le coacervat – riche en polymère et pauvre en solvant;
- le surnageant – pauvre en polymère et riche en solvant.

La microencapsulation par coacervation consiste à provoquer la précipitation de la matière enrobante par séparation de phase autour de la matière active. Une particule de type microcapsule est alors formée. Cependant, quand la quantité de matière active dans le milieu est très faible par rapport au coacervat, les particules peuvent s'agréger et donc former une microsphère. Deux types de coacervation sont connus : la coacervation complexe quand la structure du coacervat comprend plusieurs polymères et la coacervation simple quand la matrice est formée d'un seul polymère.

Coacervation complexe. La coacervation complexe consiste en la désolvatation simultanée de deux polyélectrolytes hydrosolubles portant des charges opposées, provoquée par une modification du pH du milieu aqueux [70,116,117]. Dans le cas où le produit à encapsuler (sous forme liquide ou solide) est dispersé dans une solution aqueuse contenant les deux polymères (Figure I - 5, a), la coacervation est déclenchée par un ajustement du pH de la solution, de façon que les charges positives du premier polymère équilibrent les charges négatives de la seconde

phase. Ensuite l'attraction électrostatique des deux polyélectrolytes provoque l'apparition d'un coacervat mixte. Les gouttelettes de coacervat formé viennent s'adsorber à la surface de la matière active (Figure I - 5, b) et former un enrobage continu (Figure I - 5, c) [35].

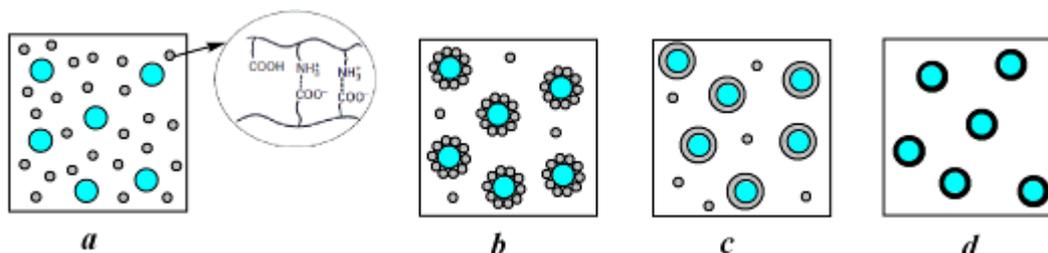


Figure I - 5. Principe du procédé de microencapsulation par coacervation complexe : (a) matière active dispersée dans la solution de polymère (protéine/polysaccharide), (b) coacervation à la surface de matière active, (c) formation d'enrobage continu et (d) réticulation d'enrobage.

Quand la matière active est constituée de gouttelettes liquides, il est nécessaire de tenir compte de l'étalement des phases. C'est-à-dire que la création d'enrobage aura lieu si le coacervat mouille spontanément la surface de la matière active. Il est donc important de connaître les coefficients d'étalement et les tensions interfaciales des différents constituants. Les sensibilités au pH et à la force ionique sont des facteurs qui limitent l'utilisation des coacervats dans l'encapsulation. L'augmentation de la stabilité des coacervats et de la solidité de leur enrobage est envisageable par la réticulation du polymère (Figure I - 5, d). Les agents réticulants utilisés pour cet effet peuvent être les glutaraldéhydes [16,118], les transglutaminases [119] ou les polyphénols [120]. Quelques exemples d'application de coacervation complexe sont présentés dans le Tableau I - 5.

Tableau I - 5. Exemples d'applications de microparticules obtenues par la coacervation complexe.

Matière enrobante	Matière active	Application	Référence
Gomme arabique/gélatine	<i>n</i> -hexa- (octa-, nona-)decane	Textile	[121]
Gomme arabique/protéine du lait	Huiles aromatiques	Alimentation	[122]
Pectine/ gélatine	Médicaments	Médecine	[123]
Alginate de sodium/gélatine			

On peut remarquer que ce procédé est limité par un choix restreint des matériaux enrobants. Seul un couple de polyélectrolytes portant des charges opposées peut convenir pour la coacervation complexe [35]. L'utilisation de la gélatine (polycation) est pratiquement incontournable en raison de ses propriétés gélifiantes.

Coacervation simple. La coacervation simple consiste en les répulsions polaires et apolaires entre deux solutés dont l'un doit être un polymère [16,124]. Elle est provoquée principalement par une désolvatation directe du polymère qui a lieu après changement du pH ou de la température, par addition d'un non-solvant ou d'un électrolyte. Les étapes du procédé sont identiques à celles de la coacervation complexe.

Le principal avantage de la coacervation est qu'il est possible d'utiliser aussi bien des polymères hydrophobes [125] que des polymères hydrophiles [126], car le coacervat peut se former en milieu organique ou aqueux. Les tailles des particules obtenues par la méthode de coacervation varient de quelques μm à quelques centaines de μm , et le taux d'encapsulation peut atteindre jusqu'à 90 %.

I.1.5.2.2. Evaporation de solvant

La méthode de microencapsulation par évaporation de solvant [127] repose sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion sous agitation. Cette technique est le plus souvent utilisée dans le domaine de la pharmacie pour la production et la libération contrôlée de médicaments [20].

Initialement, le matériau d'enrobage, généralement un polymère hydrophobe, est dissout dans le solvant organique volatil. Ensuite, la substance active à encapsuler est dissoute ou dispersée dans une solution organique avec le polymère qui formera la matrice (Figure I - 6a).

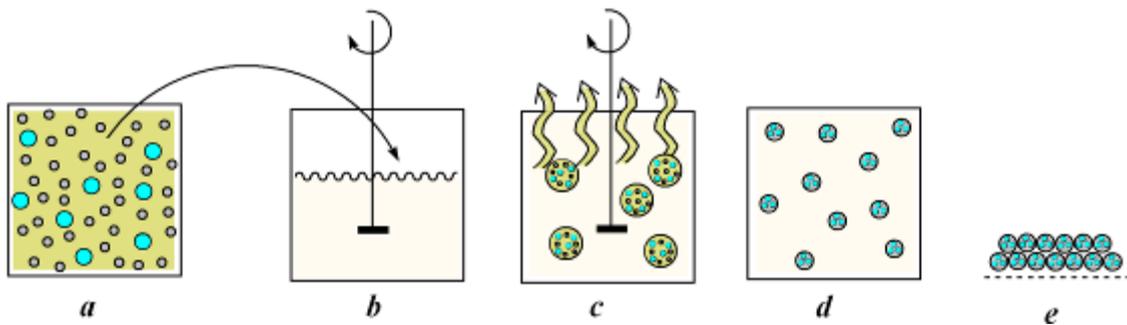


Figure I - 6. Principe du procédé de microencapsulation par évaporation du solvant : (a) matière active dispersée dans la solution organique de polymère, (b) mise en émulsion de la phase organique dans la phase aqueuse, (c) évaporation du solvant organique de la phase dispersée, (d) formation d'enrobage de polymère et (e) séchage des microparticules.

La solution organique est dispersée dans le milieu aqueux contenant un agent tensioactif (Figure I - 6) sous agitation. Dès que le solvant organique entre en contact avec la phase aqueuse externe, il migre à la surface de l'émulsion où il s'évapore par diffusion (Figure I - 6c). La concentration du solvant organique dans la phase intermédiaire diminue au cours du temps et le

polymère commence à précipiter encapsulant le principe actif (Figure I - 6d). Les microparticules sont séparées par filtration (Figure I - 6e) et séchées.

Les microparticules obtenues sont généralement de type matriciel. Ce procédé présente quelques limites : les microsphères fabriquées peuvent contenir des traces non négligeables de solvant organique et le recyclage du solvant peut être difficile à l'échelle industrielle. Parmi les polymères utilisés pour la microencapsulation par la technique d'évaporation de solvant on peut notamment trouver l'acide poly(lactique-co-glycolique) [128], le gluten du blé et le poly(éthylène glycol) [129], l'éthylcellulose [130] ou encore l'acide polylactique [131]. Le taux de matière active dans les microparticules obtenues par ce procédé est compris entre 30 % et 40 %, et le rendement (efficacité) d'encapsulation peut atteindre 100 %. La taille des particules produites est de 0,5-200 μm [35].

I.1.5.2.3. Gélification

Plusieurs matières (polysaccharides, protéines, polymères synthétiques, lipides) en solution peuvent former des gels soit par refroidissement [132], soit par contact avec certains ions chélateurs [133]. Le procédé de gélification se base sur l'encapsulation d'une matière active dissoute ou dispersée dans une solution de matière enrobante ou dans un matériau fondu. L'ensemble est émulsionné soit dans une phase dispersante où la température est maintenue supérieure à la température de fusion d'enrobage (gélification thermique), soit dans une solution contenant des ions qui provoquent la gélification. Les microparticules de gel formées peuvent être ensuite récupérées par filtration et séchées.

Les avantages que peut apporter ce procédé sont les suivants :

- la possibilité d'obtenir une distribution granulométrique des particules très étroite ;
- lorsque des polymères hydrosolubles sont utilisés (par exemple, alginate de sodium [134]), l'encapsulation peut être réalisée à des températures égales ou inférieures à la température ambiante, ce qui est intéressant lorsque la matière à encapsuler est particulièrement fragile ou volatile.

La taille des particules obtenues varie entre quelques dizaines et quelques centaines de μm et le chargement des microparticules en matière active est autour de 20 % [35].

I.1.5.3. Procédés d'encapsulation physico-mécaniques

I.1.5.3.1. Enrobage en lit fluidisé

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé s'applique exclusivement à des matières actives sous forme solide (granules, cristaux). Durant le procédé d'enrobage, il y a formation d'une couche de

matrice homogène autour du principe actif donnant aux microparticules obtenues une structure de type capsule [135].

L'encapsulation se déroule dans une chambre cylindrique verticale d'un lit fluidisé. D'abord, les particules à encapsuler sont "fluidisées" à l'aide d'un flux d'air (Figure I - 7a). Ensuite, le matériau enrobant est pulvérisé sur cette suspension fluide de particules. Les gouttelettes de la solution de polymère entrent en contact avec la surface de particules du principe actif et si les conditions d'étalement sont respectées, le polymère s'adsorbe à la surface des particules (Figure I - 7b). La couche d'enrobage se forme après plusieurs passages successifs par les zones de pulvérisation et séchage permettant de couvrir la totalité de la surface de la particule par une couche continue et homogène (Figure I - 7c). L'épaisseur de la couche de polymère formée peut être variable de quelques μm à une vingtaine de μm [35].

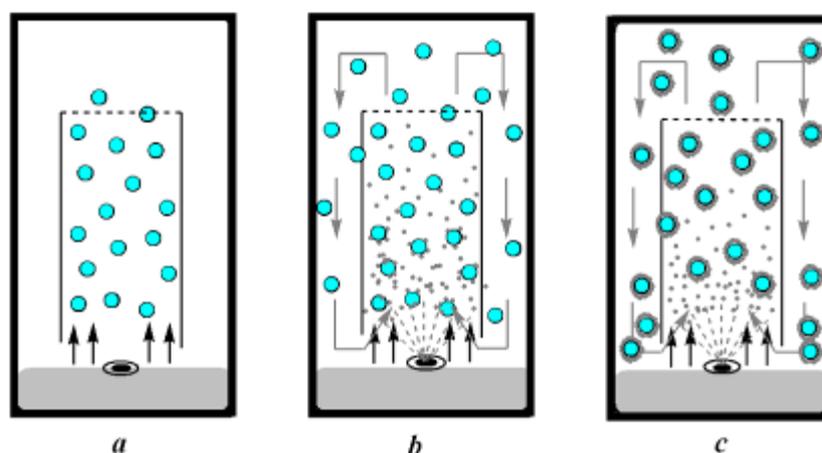


Figure I - 7. Représentation schématique de microencapsulation par méthode d'enrobage en lit fluidisé : (a) matière active "fluidisée", (b) pulvérisation de la solution de matière enrobante et (c) formation des microparticules.

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé est souvent utilisé dans le domaine de la pharmacie pour l'encapsulation de médicaments et pour la protection supplémentaire de matières très sensibles (création d'une seconde couche enrobante), comme dans l'alimentation pour protéger des vitamines et des minéraux. Cette technique permet la formation d'enrobages homogènes d'épaisseur contrôlée. La taille des microparticules produites peut aller de quelques dizaines de μm jusqu'à 600 μm et le taux de microencapsulation est compris entre 60 % et 90 % [35,136,137].

I.1.5.3.2. Extrusion

La technique d'extrusion peut être utilisée pour l'encapsulation de matière active dans des polymères thermoplastiques, dont la viscosité à l'état fluide permet de préparer des microcylindres homogènes et réguliers [35,138]. Le produit à encapsuler et le matériau enrobant sont préalablement mélangés. Ensuite, ce mélange est passé à travers une extrudeuse dans laquelle il subit un certain nombre d'opérations: mélange, malaxage, mise en pression, chauffage, détente. La séquence de ces opérations est établie de manière à obtenir une transition d'état de la matière (solide/liquide). Après extrusion, la matière obtenue est découpée en microparticules cylindriques, qui sont ensuite érodées mécaniquement pour rendre leur forme voisine de celle de microsphères [139].

Les principaux avantages de cette méthode sont les suivants:

- des coûts de transformation faibles et des rendements élevés sans production d'effluents;
- les poudres obtenues ont une morphologie dense et sont peu poreuses ;
- les composés actifs sont protégés par la matrice contre l'oxydation grâce à la formation d'une microsphère dense [140].

D'un autre côté, la perte des fonctions du principe actif est importante, ceci est dû essentiellement aux défauts structuraux (lors de la formation) et à une température d'extrusion élevée. Cette technique est essentiellement utilisée dans le cas des matières actives et matières enrobantes résistantes à haute température (jusqu'à 200 °C). La taille des microsphères obtenues par la technique d'extrusion est plus importante (supérieure à 200 µm) que pour celles obtenues par les procédés chimiques et physico-chimiques. La proportion de la matière active dans les particules peut atteindre 50 %.

I.1.5.3.3. Procédé basé sur la technologie de CO₂ supercritique

Actuellement, de nombreux chercheurs étudient le procédé d'encapsulation basé sur la technologie de dioxyde de carbone supercritique [45,141,142]. A l'état supercritique, le fluide a des propriétés intermédiaires entre un gaz et un liquide. Selon cette technique d'encapsulation, le principe actif est dispersé dans une solution de matière enrobante dans le fluide supercritique. L'élimination du dioxyde de carbone permet alors de précipiter les polymères de leur solution et donc de créer un enrobage continu [20].

L'utilisation du CO₂ supercritique, qui est non-toxique, non-inflammable et facilement recyclable dans le domaine de la microencapsulation donne la possibilité d'obtenir des microparticules par une méthode relativement simple. La limite principale de cette technique est la solubilité de la

matière enrobante dans le CO₂ fluidifié, dont la polarité est proche de celle de l'hexane. L'application la plus importante de l'encapsulation par la méthode basée sur la technologie des fluides supercritiques est l'enrobage des médicaments par les polymères synthétiques, notamment les polylactides, les polyacrylates et les polyéthers [45,46,141-144]. La taille des particules, généralement de type microsphères, obtenues par ce procédé varie de 0,5-1 µm à 100 µm et le taux d'encapsulation est de 10-40 %.

I.1.5.3.4. Atomisation

Le procédé d'atomisation (ou spray-drying) est un procédé mécanique continu de déshydratation qui permet la transformation de préparations liquides en poudres sèches. Différentes formes liquides initiales peuvent permettre la microencapsulation de la matière active par atomisation [145-147] :

- l'émulsion – la matière active est émulsionnée dans une solution contenant le matériau enrobant ;
- la solution – la matière active et le matériau enrobant sont solubilisés dans le même solvant ;
- la dispersion – des particules solides de matière active sont dispersées dans la solution de matière enrobante.

L'étape préliminaire de l'atomisation est la réalisation d'une forme liquide (émulsion, solution ou dispersion) appelée solution d'alimentation, homogène et relativement stable dans un solvant adapté. L'atomisation consiste alors en la pulvérisation et le séchage de la solution d'alimentation à l'aide d'un appareil appelé atomiseur (Figure I - 8).

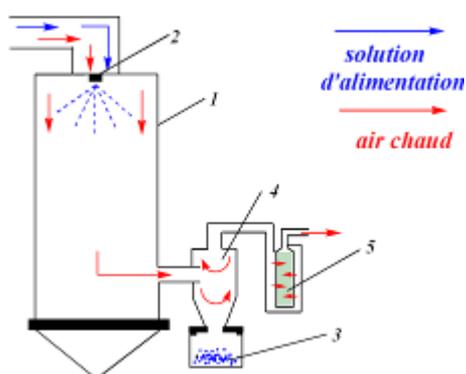


Figure I - 8. Représentation schématique de l'atomiseur.

L'atomiseur est généralement constitué d'une haute tour, appelée chambre d'atomisation (Figure I - 8, 1), au sommet de laquelle la formulation liquide initiale est injectée à l'aide d'une

buse d'atomisation (Figure I - 8, 2). Après le contact des microgouttes de la préparation liquide avec un flux d'air chaud, le solvant (généralement l'eau) composant une partie de ces gouttes s'évapore. En effet, grâce à la différence de température et de pression entre la phase liquide et la phase gazeuse, un transfert de chaleur depuis l'air vers la phase aqueuse se produit, engendrant un transfert des molécules de solvant du produit vers l'air chaud. La vitesse de diffusion du solvant du cœur de la microgoutte à sa surface est considérée constante et égale à la vitesse d'évaporation à la surface. Finalement, quand la quantité de solvant dans la gouttelette atteint son niveau critique, l'enveloppe sèche est formée autour. La vitesse d'évaporation diminue et devient dépendante de la vitesse de diffusion de l'eau à travers la surface de la croûte formée. Le séchage est terminé quand la température de la particule devient égale à celle de l'air dans la chambre d'atomisation [145].

Les microparticules formées sont collectées dans le récipient de récupération (Figure I - 8, 3) après une séparation du flux d'air par passage dans un cyclone (Figure I - 8, 4). L'air humide est évacué vers la sortie après la traversée du filtre (Figure I - 8, 5). Le séchage peut être effectué suivant deux régimes différents :

- quand la solution est pulvérisée dans le même sens que le flux d'air chauffé, l'appareil fonctionne à co-courant (Figure I - 9a);
- lorsque les microgouttes pulvérisées présentent initialement une trajectoire opposée au flux d'air chaud, l'appareil fonctionne à contre-courant (Figure I - 9b).

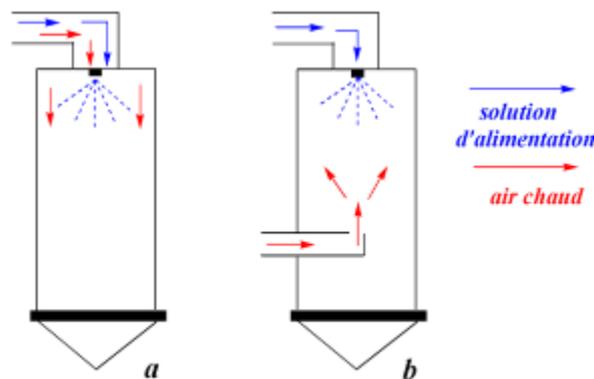


Figure I - 9. Schéma de principe d'un appareillage d'atomisation a) à co-courant et b) à contre-courant.

La taille moyenne des microparticules obtenues par procédé d'atomisation varie entre 1 μm et 100 μm pour le séchage à co-courant et entre 50 μm et 200 μm pour le séchage à contre-courant où l'agrégation des petites microparticules avec les grandes est plus fréquente. En général, la morphologie des particules est de type microsphère, avec une forme sphérique, une surface lisse ou parfois fripée.

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité du procédé de microencapsulation par atomisation. Parmi ces paramètres, on peut citer la viscosité et la température de la préparation liquide de départ, la température de l'entrée et de la sortie d'appareil, la nature et la concentration de la matière active et de la matière enrobante [145]. En effet, la température de la préparation de départ influence sa viscosité, sa fluidité et par conséquent l'homogénéité de l'atomisation. Quand cette température augmente, la viscosité des gouttelettes dispersées diminue, mais la température trop élevée peut causer la dégradation des ingrédients sensibles. Le débit de la solution d'alimentation pendant l'atomisation est également un paramètre important. Il doit être ajusté pour assurer que chaque microgoutte dispersée atteigne le niveau désiré de séchage avant d'être en contact avec la chambre d'atomisation. Le temps de séjour des particules dans l'atomiseur varie, selon la taille de l'appareil, de quelques secondes jusqu'à une minute.

La température d'entrée de l'air chaud, pulvérisé pendant l'atomisation, influence également les propriétés des microparticules obtenues. En effet, la température d'entrée de l'atomiseur est liée à la vitesse d'évaporation de la phase liquide et à l'humidité de la poudre produite. Quand cette température est très basse, la faible vitesse d'évaporation provoque la formation de microparticules avec une densité de membrane et une humidité élevée, et les microsphères ont tendance à s'agglomérer. Inversement, si la température d'entrée est trop importante, l'évaporation trop rapide favorise la formation de fissures dans la membrane d'enrobage et la libération non désirée de la matière active.

La nature de la matière enrobante joue également un rôle important pendant le procédé de microencapsulation par atomisation. Ce matériau doit être choisi en fonction des propriétés désirées des microparticules (taille, propriétés mécaniques, thermiques ou encore celles de la libération). Les matières enrobantes utilisées dans le procédé d'atomisation sont les polysaccharides, les protéines, les polymères synthétiques ainsi que les lipides. Parfois ces matériaux peuvent être mélangés pour améliorer les propriétés des microparticules. Par exemple, l'addition de lactose dans une préparation avec des protéines de lait favorise la formation de la croûte autour des microparticules, permet d'améliorer les propriétés du séchage et l'efficacité de microencapsulation [148]. Cet effet positif de l'addition de polysaccharide a été expliqué par la formation d'une couche protectrice efficace grâce aux interactions électrostatiques entre les deux polymères de matière enrobante.

Le procédé d'encapsulation par atomisation est simple à mettre en œuvre, rapide et économique. Pour ces différentes raisons, il est très largement utilisé dans l'industrie. Parmi les domaines d'utilisation de l'atomisation comme procédé de microencapsulation on peut trouver :

- l'alimentation – épices, stabilisants, vitamines, minéraux et arômes ;
- la pharmacie/médecine – antibiotiques, additifs et médicaments ;
- la biologie – enzymes et microorganismes ;
- d'autres domaines d'industrie – pigments pour la teinture, matériaux céramiques et supports catalytiques.

Les facteurs limitants du processus peuvent être la sensibilité des produits à la température élevée, l'entretien de l'appareil, surtout l'usure de la buse d'atomisation avec des produits cristallisés et concentrés, la concentration en matière sèche de la solution et donc sa viscosité car lorsque la phase liquide est très visqueuse, le passage par la buse d'atomisation est difficile [53].

En conclusion de cette partie, il nous semble important de préciser qu'avant d'encapsuler un ingrédient, il est nécessaire de connaître l'application et les propriétés désirées, notamment la morphologie de la particule obtenue. Ces informations, ainsi que la nature de la matière active, permettront de choisir le matériau enrobant et le procédé d'encapsulation adaptés.

I.2. Protéines végétales

I.2.1. Structure

Les protéines sont des polymères naturels azotés dont la taille varie entre plusieurs milliers et plusieurs millions de daltons [149]. Les protéines se composent d'un enchaînement linéaire d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Cet enchaînement possède une organisation tridimensionnelle (ou repliement) qui lui est propre. De la séquence au repliement, puis à l'association, il existe quatre niveaux d'organisation structurale de la protéine (Figure I - 10).

La structure primaire (Figure I - 10a) correspond à la succession linéaire des acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques. La structure secondaire (Figure I - 10b) décrit le repliement local de la chaîne principale d'une protéine et concerne les arrangements spatiaux entre les résidus d'acides aminés proches. De telles interactions confèrent souvent une structure périodique et ordonnée à la chaîne polypeptidique. De plus, certaines conformations se trouvent nettement favorisées car elles sont stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les groupements amides (-NH) et carbonyles (-CO) du squelette peptidique. Les hélices α et les feuillets β sont les éléments les plus importants de la structure secondaire.

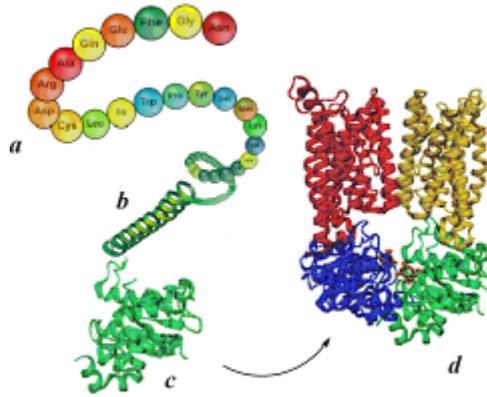


Figure I - 10. Représentation schématique de la structure de protéine : (a) structure primaire, (b) structure secondaire, (c) structure tertiaire et (d) structure quaternaire.

La structure tertiaire (Figure I - 10c) d'une protéine correspond au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace résultant des interactions entre les résidus d'acides aminés très éloignés dans la séquence linéaire. On parle plus couramment de structure tridimensionnelle ou structure 3D. La structure tertiaire est stabilisée par de nombreuses liaisons de faible énergie, mais également par des liaisons covalentes – ponts disulfures. Les protéines contenant plusieurs chaînes polypeptidiques possèdent un niveau supplémentaire d'organisation structurale. En effet, la structure quaternaire (Figure I - 10d) des protéines se fait par l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes, par des liaisons non-covalentes (liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, interactions hydrophobes). Chacune de ces chaînes est appelée monomère (ou sous-unité) et l'ensemble, oligomère ou protéine multimérique. La structure tridimensionnelle d'une protéine est intimement liée à sa fonction : lorsque cette structure est cassée par l'emploi d'agent dénaturant, la protéine perd sa fonction [149].

I.2.2. Protéines d'origine animale ou végétale?

Il est nécessaire de distinguer les protéines d'origine animale et les protéines d'origine végétale. Les protéines animales ont en principe des qualités nutritionnelles plus importantes que les protéines végétales, mais leur coût est plus élevé et leur utilisation est donc essentiellement dans le domaine alimentaire. L'avantage des protéines d'origine animale réside dans leur richesse en acides aminés essentiels, comme la lysine, la méthionine et le tryptophane.

Les protéines végétales sont essentiellement présentes dans plusieurs sources :

- graines protéagineuses (oléo-protéagineuses) – soja, colza, pois, lentilles, haricots, tournesol, fèves, lupin ;
- céréales – blé, avoine, seigle, orge, maïs, riz, sorgho, millet, quinoa, sarrasin ;
- algues.

Les protéines végétales ont l'avantage d'être peu coûteuses, de ne pas présenter de risque sanitaire et d'être accessibles en grande quantité, renouvelables, biocompatibles et biodégradables. Elles sont beaucoup étudiées ces dernières années comme alternative aux protéines animales, surtout dans le domaine de l'alimentation. Parmi les protéines les plus étudiées, on trouve celles de soja, de pois, de riz, d'avoine, d'orge, la zéine de maïs et la gliadine de blé.

Les protéines végétales peuvent être utilisées tant dans le domaine alimentaire [20] que pour des applications non-alimentaires [150]. Aujourd'hui, le débat concernant la qualité des aliments et la sécurité alimentaire permet d'envisager l'utilisation de plus en plus large des protéines végétales en formulation alimentaire ou en alimentation animale.

Le développement des applications non-alimentaires des macromolécules d'origine végétale est principalement dû à leur caractère renouvelable et biodégradable. Les utilisations potentielles concernent les domaines de la cosmétique, pharmaceutique ainsi que l'industrie des colles, des vernis et des agromatériaux. Les protéines végétales sont souvent des coproduits de l'industrie alimentaire. Il est donc très intéressant de chercher des alternatives innovantes pour leurs valorisations non alimentaires et développer leurs applications à haute valeur ajoutée.

I.2.3. Classification

Il existe quatre grandes familles de protéines d'origine végétale, classées selon leur solubilité [151] : les globulines, les albumines, les glutélines et les prolamines. Les albumines et les globulines constituent la majeure fraction protéique des végétaux. Elles sont simultanément extraites de farines de graines délipidées par une solution aqueuse de chlorure de sodium [149]. D'autre part, selon le coefficient de sédimentation (S, défini comme la vitesse de sédimentation par unité d'accélération de la particule dans un milieu), caractérisant la masse molaire et la conformation spatiale d'une protéine et son comportement dans le milieu ambiant, les protéines peuvent être classées en globulines 7S ou 11S, et en albumines 2S. Chaque plante peut être constituée de ces trois groupes de protéines en différentes fractions.

I.2.2.1. Albumines

La fraction albumine est la fraction soluble dans l'eau. Elle regroupe la plupart des protéines qui présentent une activité biologique, ainsi que les protéines de réserve. Les molécules dotées des albumines sont les enzymes, la lectine et les inhibiteurs. La fraction albumine diffère de la fraction globuline par sa masse molaire plus faible qui varie entre 10 kDa et 100 kDa, alors que pour les globulines elle peut atteindre plusieurs centaines de kDa [149]. Généralement, les albumines présentent des teneurs élevées en lysine et en acides aminés soufrés, comme la

méthionine et la cystéine, ainsi qu'une quantité élevée de ponts disulfures qui affectent leur résistance à la dénaturation thermique.

I.2.2.2. Globulines

Les globulines sont les protéines majeures des plantes, solubles dans les solutions aqueuses salines. Elles sont constituées principalement de deux fractions caractérisées par des coefficients de sédimentation de 7S et 11S. Ces fractions portent des noms spécifiques pour différents végétaux (Tableau I - 6). Le rapport des fractions des globulines 7S et 11S dans un isolat protéique dépend de la provenance de la plante (légumineuse, céréale ou oléo-protéagineuse), ainsi que des conditions de culture.

Tableau I - 6. Globulines de type 7S et 11S de différentes plantes.

Plante	Globulines 7S	Globulines 11S
Soja	Conglycinine	Glycinine
Pois	Viciline/convicine	Légumine
Féverole	Viciline	Légumine
Colza	-	Cruciférine
Tournesol	-	Hélianthinine
Arachide	-	Arachine
Haricot	Phaséoline	-

Contrairement aux albumines, les globulines ont une composition caractéristique des protéines de réserve, riche en acides aspartique, glutamique et leurs amides, ainsi qu'en arginine. Quant à la structure de globulines issues de végétaux, la plupart des études sont effectuées sur la glycinine, la protéine 11S de soja [152-155]. La glycinine est un oligomère hétérogène constitué de six sous-unités chacune représentée par deux polypeptides (acide (A) et basique (B)). Les sous-unités et les polypeptides sont reliés entre eux par des ponts disulfures, ainsi que par des liaisons hydrogènes, hydrophobes et ioniques, ce qui maintient la stabilité de la structure hexagonale. Les polypeptides A et B se trouvent en alternance, aussi bien au sein de l'hexagone que par rapport aux sous-unités adjacentes du deuxième hexagone (Figure I - 11). Cette structure formée des deux couches de sous-unités peut être imaginée en forme de cylindre avec un diamètre de 110 Å [149].

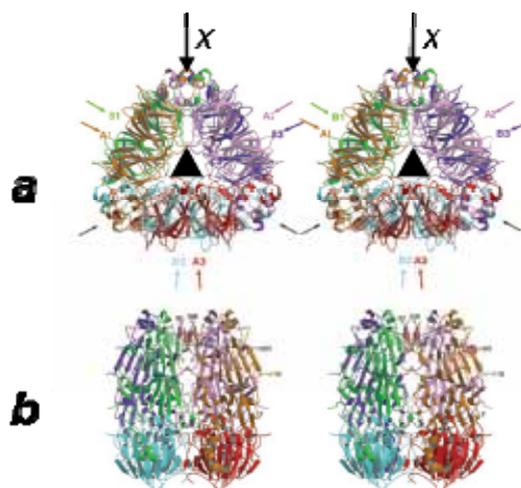


Figure I - 11. Représentation schématique de la glycine, A - polypeptide acide et B - polypeptide basique ; (a) axe perpendiculaire au plan de la feuille représenté par le triangle noir et (b) obtenu par rotation de l'hexamère 'a' autour de l'axe X à 90° [155].

I.2.2.3. Glutéline et prolamine

La glutéline et la prolamine sont les protéines solubles dans les solutions aqueuses basiques et les mélanges eau/alcool respectivement. Leur structure est peu étudiée, mais il est connu que ces fractions représentent des agglomérats de globulines liées entre elles par des ponts disulfures et des interactions hydrophobes, et possèdent une morphologie complexe [149].

I.2.4. Modification et fonctionnalisation des protéines végétales

Les protéines végétales possèdent des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, telles que la bonne solubilité, les capacités émulsifiante et moussante, les propriétés filmogènes, pertinentes pour de nombreuses applications, notamment en industrie alimentaire, cosmétique et biomédicale. Cependant, afin d'améliorer encore ces propriétés, certaines modifications de structure peuvent être envisagées, notamment :

- la modification de leur conformation par traitement physico-chimique (par exemple l'augmentation de la température ou de la pression, le changement du pH) ;
- l'hydrolyse enzymatique pour diminuer la longueur des chaînes polypeptidiques ce qui entraîne également des modifications de conformation ;
- la fonctionnalisation des protéines par voies chimique, car les protéines possèdent de nombreux groupements fonctionnels (fonction alcool, amine, thiol, carboxyle) susceptibles d'être modifiés chimiquement. Ces modifications peuvent permettre l'amélioration de certaines propriétés telles que la solubilité, l'hydrophobicité, l'hydrophilie, les propriétés gélifiantes, émulsifiantes, moussantes, ainsi que les propriétés tensioactives.

I.2.4.1. Modification des protéines par traitement physico-chimique

Certains traitements physico-chimiques (variation de la température, de la pression, du pH et de la force ionique) peuvent provoquer la dénaturation des protéines. Or, les propriétés des protéines sont fortement liées à leur conformation et à leur structure tridimensionnelle. La dénaturation des protéines aura donc une influence certaine sur leurs propriétés. Le modèle de dénaturation des protéines est présenté sur la **Figure I - 12**. Sous l'effet d'un facteur physico-chimique, la structure native est convertie en un intermédiaire, dont la structure tertiaire est modifiée, mais la structure secondaire est inchangée. Le déploiement des chaînes va conduire à la dénaturation de la protéine. La dénaturation est un processus irréversible, contrairement au phénomène de mobilité des chaînes qui peut avoir lieu après une légère augmentation de la température. Le plus souvent, ce phénomène est provoqué par l'exposition de la protéine à une température élevée, on parle alors de dénaturation thermique. La température correspondant à cette dénaturation dépend de l'origine de la protéine et des conditions environnementales (pH, solvant, présence de sel, tensioactifs). Elle peut varier de 30 °C pour les protéines sensibles dans les cellules vivantes à 100 °C et plus pour les protéines constitutives des bactéries thermostables [156].

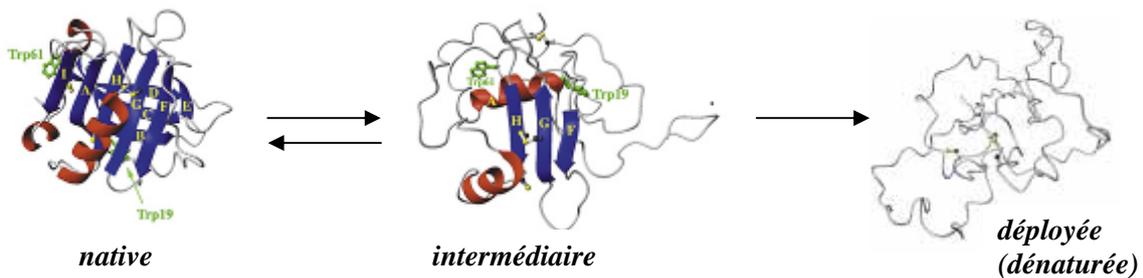


Figure I - 12. Représentation de la dénaturation de β -lactoglobuline [157].

En solution aqueuse, la structure et donc les propriétés (la capacité émulsifiante et moussante, l'affinité avec des molécules hydrophobes) des protéines dépendent fortement du pH du milieu et de la présence de sels qui influencent la force ionique. L'ajout de sels dans la solution protéique permet l'ionisation des chaînes, l'augmentation des forces de répulsion ainsi que la solubilité [158]. Par contre, à une forte concentration saline, les ions de sel en excès mobilisent les molécules d'eau disponibles pour la solvatisation des protéines qui ont la tendance à précipiter.

La variation du pH du milieu produit aussi une modification d'ionisation des groupements acido-basiques des protéines. La solubilité des protéines est minimale à pH proche du point isoélectrique situé généralement entre le pH 4,0 et 5,5. Aux valeurs de pH fortement basiques ou

acides, les charges accumulées sur les protéines permettent une dissociation des chaînes et une augmentation de la solubilité [36,159].

Un autre facteur pouvant provoquer le déploiement des chaînes protéiques est le traitement sous haute pression. Ce type de modification protéique s'effectue à température ambiante ou même à basse température [160]. Pendant le traitement sous haute pression, les liaisons intermoléculaires non covalentes (Figure I - 13) entre les résidus des acides aminés des protéines peuvent être rompues sous l'action d'une force mécanique [161]. Les chaînes protéiques se libèrent, entraînant un changement de conformation et une modification des propriétés. Généralement, les liaisons covalentes ne sont pas affectées par un traitement sous pression jusqu'à 100 MPa.

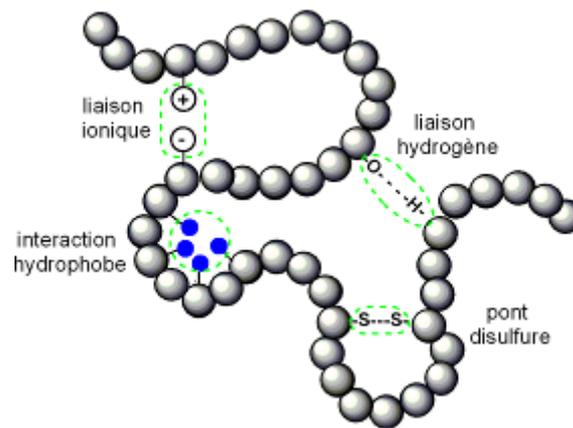


Figure I - 13. Liaisons susceptibles de se former entre les acides aminés des chaînes de protéines.

La masse moléculaire et la structure primaire des protéines ne sont pas affectées par la dénaturation. Par contre, cette dernière modifie certaines fonctionnalités des protéines, telles que la solubilité, la viscosité, les propriétés gélifiantes ou encore les capacités moussante et émulsifiante, ainsi que leur affinité pour les phases hydrophobes [162-165].

Ces modifications sont justifiées par le changement de conformation des protéines dû à la dénaturation, et plus particulièrement le déploiement des chaînes et l'augmentation de leur mobilité qui en résulte, exposant un certain nombre d'acides aminés à un nouvel environnement. Ces modifications de propriétés dépendent fortement de la nature des protéines et des conditions de leur dénaturation (vitesse de chauffage, temps de traitement, température), car les transitions structurales pendant le déploiement sont spécifiques à chaque protéine.

Liu *et al.* [165] remarquent la diminution de la solubilité, des propriétés émulsifiantes et moussantes après dénaturation thermique de l'isolat protéique de cacahuète. Ibanoglu et Ercelebi [163] observent le même phénomène avec les protéines d'œuf. Ju *et al.* [164] montrent que le traitement à haute température provoque l'augmentation de l'hydrophobicité des

protéines du riz, en raison de l'exposition des groupements hydrophobes à la surface des protéines, qui étaient à l'intérieur de la pelote protéique dans la structure native. Dissanayake et Vasiljevic [162] observent une amélioration de la capacité émulsifiante et moussante des protéines de petit lait après un traitement combiné à haute pression et température (140 MPa et 90 °C respectivement). Ceci est dû à l'augmentation de la flexibilité moléculaire des chaînes protéiques après dénaturation. Toutes ces observations prouvent l'influence des facteurs physico-chimiques sur le changement de la conformation des protéines et sur leurs propriétés fonctionnelles.

I.2.4.2. Modification des protéines via la réaction chimique

I.2.4.2.1. Réaction de Maillard

La chimie de la réaction de Maillard est très complexe, elle débute par la condensation d'une fonction amine d'un acide aminé de protéine sur la fonction réductrice carbonyle d'un polysaccharide. L'intermédiaire énamine formé peut conduire ensuite selon les conditions expérimentales (température, humidité, pH, présence d'oxygène, temps de réaction, ainsi que concentration et nature des réactifs) à de nombreux produits [166,167].

Quelques auteurs ont étudié la microencapsulation en utilisant un mélange de protéines et de polysaccharides qui se conjuguent par la réaction de Maillard après un chauffage à haute température [166-170]. Cette conjugaison entre les protéines et les polysaccharides permet d'augmenter la stabilité du système et lui confère de nouvelles propriétés, notamment la capacité émulsifiante et la stabilité antioxydante [169,171].

En microencapsulation, la réaction de Maillard est surtout utilisée pour augmenter la stabilité des matières actives encapsulées contre l'oxydation [166-169]. Différentes combinaisons de matière enrobante peuvent être utilisées pour la réaction de Maillard. Quelques exemples appliqués à la microencapsulation sont présentés dans le [Tableau I - 7](#).

Différents paramètres influencent le taux de réaction de Maillard et par conséquent les propriétés des microparticules obtenues : la température et le temps de traitement, mais aussi la nature et le ratio du couple protéine/polysaccharide.

Les travaux d'Augustin *et al.* [168] montrent l'influence de la nature de la protéine utilisée, et particulièrement de sa solubilité et de sa capacité émulsifiante sur l'oxydation de la matière active encapsulée. Les auteurs démontrent également l'intérêt d'un chauffage à haute température (98 °C) du mélange protéine/polysaccharide avant l'étape d'émulsification sur la protection de la matière active, notamment contre l'oxydation. De même, une étude de Sant'Anna *et al.* [170] démontre que la microencapsulation de peptides antimicrobiens par des

dérivés de réaction de Maillard est pertinente pour améliorer la stabilité de ces composés actifs dans les produits alimentaires soumis à haute température.

Tableau I - 7. Couples protéines/polysaccharides utilisés dans la réaction de Maillard en microencapsulation.

Procédé	Matière enrobante			Matière active	Référence
	Protéine	Polysaccharide	Ratio, w/w		
Atomisation	Petit lait/soja	Sirop de glucose	1/2	Huiles végétales/ Huile de poisson	[169]
Atomisation	Caséinate de sodium	Glucose/dextrane	1/2	Huile de poisson	[167]
Atomisation	Mélange des protéines (caséinate de sodium, protéines du lait, protéines de soja)	Mélange des polysaccharides (glucose, sirop de glucose, oligofructose)	1/1	Huile de poisson	[168]
Atomisation	Petit lait	Maltodextrine	1/2 à 1/10	Acide linoléique	[166]
Méthode d'hydratation du film	Mélange des acides aminés (glycine, lysine, arginine, alanine)	Mélange des sucres (glucose, fructose, lactose, sucrose)	-	Peptides antimicrobiens	[170]
Méthode de double émulsion	Caséinate de sodium	Maltodextrine	-	Vitamine B12	[172]
Méthode de simple émulsion	β -lactoglobuline	Dextrane	1/3	Huile de maïs	[173]

Les propriétés interfaciales des couples protéines/polysaccharides conjugués par la réaction de Maillard vis-à-vis de phases hydrophobes sont sensiblement différentes de celles de simples mélanges physiques protéines/polysaccharides. Dunulap et Côte [174] montrent que les liaisons covalentes entre polysaccharides et protéines permettent une meilleure résistance à la coalescence dans l'émulsion et une meilleure protection de la phase hydrophobe. Cela confirme les résultats obtenus par Choi *et al.* [166] et O'Regan *et al.* [172] qui observent des tailles de particules réduites et des efficacités de microencapsulation améliorées dans le cas de matériau

enrobant constitué de couples protéines/polysaccharides liés par la réaction de Maillard par rapport à des systèmes non conjugués (meilleure solubilité et meilleure capacité émulsifiante).

I.2.4.2.2. Déamidation

La déamidation est une réaction chimique éliminant le groupement aminé d'un amide pour conduire à un acide carboxylique. Dans le cas des protéines, cette réaction se traduit essentiellement par la disparition des groupements amides de l'asparagine ou de la glutamine et leur transformation en acide aspartique ou acide glutamique respectivement (Figure I - 14).

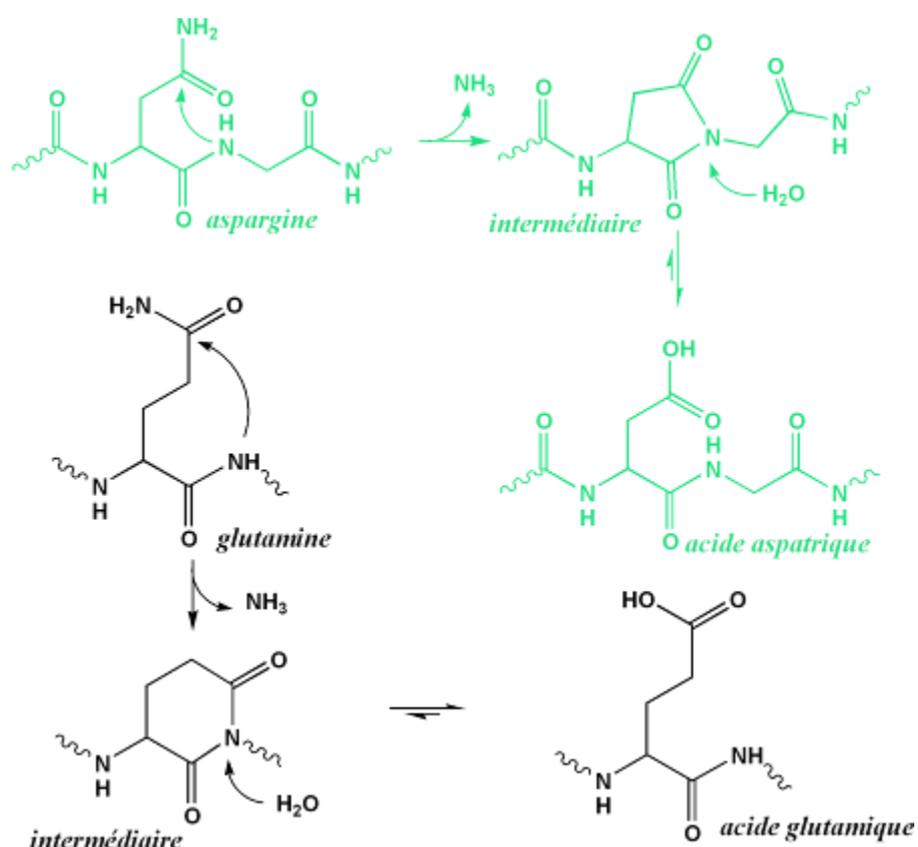


Figure I - 14. Représentation du mécanisme général de déamidation non-enzymatique de l'asparagine et la glutamine.

La réaction de déamidation peut se dérouler selon deux voies : chimique et enzymatique. La déamidation chimique peut être effectuée en milieu acide [4,6] ou basique [175]. En ce qui concerne la déamidation par voie enzymatique, la glutaminase est généralement utilisée [7,176,177].

La conversion des groupements amides des protéines en groupements carboxyles par déamidation influence leurs propriétés fonctionnelles [176]. En effet, les amides ne sont pas des groupements ionisables (pas de pKa) alors que les acides carboxyliques le sont (pKa (COOH) 3-

5). A pH supérieur au pKa de l'acide, l'augmentation de la quantité de charges négatives sur les protéines après la déamidation entraîne une plus importante répulsion électrostatique entre chaînes et donc un déploiement partiel des chaînes protéiques améliorant leur solubilité [175,178]. De plus, le changement des charges à la surface des protéines provoque le déplacement de leur point isoélectrique [179]. Expérimentalement, une augmentation de la solubilité et de la capacité émulsifiante a été observée pour des faibles taux de déamidation, dans le cas des protéines d'orge, de soja, de riz et de maïs [4,6,175]. Par contre, une déamidation excessive peut provoquer la détérioration de certaines propriétés fonctionnelles de protéines, comme le décrit Mirmoghtadaie *et al.* [6]. Un faible taux de déamidation augmente la mobilité des chaînes protéiques, alors qu'une déamidation excessive se traduit par une augmentation des charges sur les chaînes et la réduction des interactions protéine-protéine, ce qui diminue les capacités émulsifiante et moussante.

Yong *et al.* [7] ont montré qu'après une déamidation enzymatique (taux de modification de 20 %), la solubilité du gluten de blé augmente de 19 % à 68 %, sa capacité émulsifiante s'améliore et la taille moyenne des gouttelettes de l'huile dispersées diminue de 100 µm à 2-3 µm. Suppavorasatit *et al.* [177] montrent qu'une déamidation enzymatique à 52 % des protéines de soja augmente leur solubilité de 25 % à 65 %, leur capacité émulsifiante de 17 % à 41 % et leur capacité moussante de 26 % à 53 %. Mirmoghtadaie *et al.* [6] observent que la déamidation en milieu acide de protéines d'avoine entraîne une forte augmentation de sa capacité émulsifiante. Liao *et al.* [4] remarquent que la déamidation en milieu acide de gluten du blé à 59 % influence l'augmentation de sa solubilité de 4 % à 64 %. Zhao *et al.* [175] observent que l'augmentation du taux de déamidation des protéines d'orge en milieu basique de 1,0 % à 2,2 % entraîne une amélioration de leur capacité émulsifiante de 20 % à 68 % respectivement.

I.2.4.2.3. Acylation

L'acylation consiste à fixer par liaison covalente une chaîne grasse sur la molécule. Trois groupements fonctionnels des protéines sont susceptibles de créer une liaison covalente avec un dérivé d'acide gras : les groupements thiols de cystéine qui conduisent à une liaison thioester, les groupements hydroxyles de serine qui conduisent à une liaison ester et les fonctions amines de lysine et des extrémités de chaînes polypeptidiques qui forment des liaisons amides [180].

Dans la littérature, l'acylation des protéines en milieux aqueux alcalin est réalisée par la réaction de condensation de Schotten-Baumann [181-183]. Dans ces conditions, ce sont principalement les amines qui réagissent avec des dérivés d'acides gras. Dans le cas d'une protéine, les fonctions amines libres sont représentées par les extrémités des chaînes et les résidus de la lysine. La

représentation schématique de la réaction d'acylation de protéines est illustrée sur la [Figure I - 15](#).

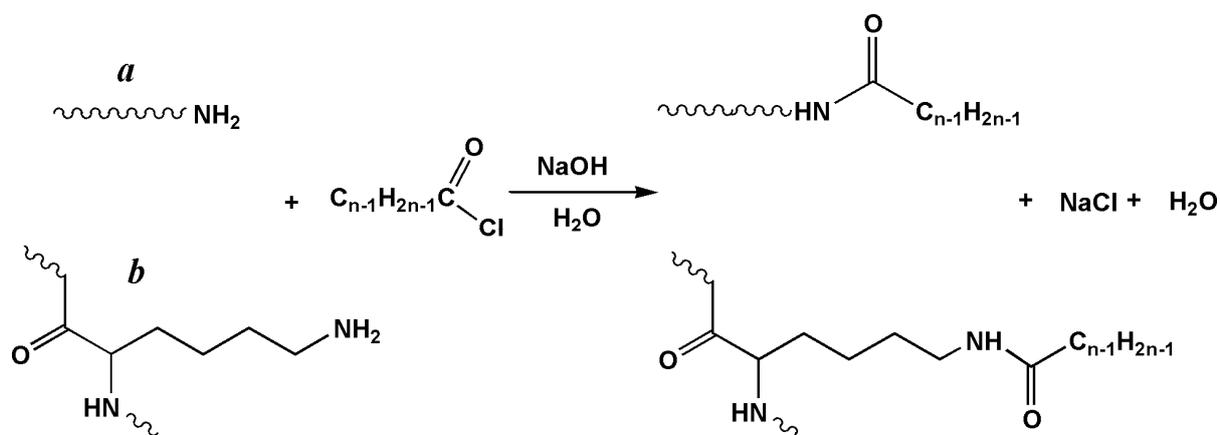


Figure I - 15. Réaction de N-acylation de Schotten-Baumann (a) par l'extrémité de chaîne et (b) par le résidu de lysine.

La fonctionnalité des protéines dépend de leur activité de surface. En milieu aqueux, les pelotes des chaînes protéiques sont organisées de sorte que les groupements hydrophobes se trouvent plutôt à l'intérieur et les groupements hydrophiles à l'extérieur. L'acylation permet alors d'introduire de nouveaux groupements hydrophobes à la surface des pelotes, et aura donc une influence notable sur les propriétés de surface des protéines [5].

Wong *et al.* [184] ont réalisé l'acylation de macropeptides de caséine avec différentes longueurs de chaînes grasses de C8, C12, C14, C16 ou C18 atomes de carbone. Les résultats obtenus montrent que quelle que soit la longueur de la chaîne lipophile, l'acylation des dérivés protéiques de caséine entraîne une diminution de la solubilité en solution aqueuse, liée à l'agrégation et la précipitation des chaînes qui présentent une hydrophobicité accrue. La stabilité et la capacité moussante des macropeptides diminuent également de manière significative après acylation. Cet effet est attribué à l'abaissement de la solubilité et de la capacité des molécules lipophilisées à s'adsorber à l'interface air/eau. Ainsi, la capacité émulsifiante des nouveaux composés est améliorée par rapport aux macropeptides non modifiés.

L'acylation des protéines de soja avec différentes longueurs de chaînes grasses a été étudiée par Matemu *et al.* [5]. Ils ont montré que la capacité émulsifiante et l'absorption de l'huile sur les protéines sont plus élevées pour les protéines acylées par rapport aux protéines natives. Il a été mis en évidence que le greffage de chaînes grasses sur les protéines influence le changement de leur conformation et le déploiement des pelotes protéiques. La dissociation des sous unités de la structure quaternaire des protéines acylées a été démontrée dans ce travail. L'exposition des groupements hydrophobes facilite le réarrangement des protéines à l'interface huile/eau et

apporte d'excellentes propriétés émulsifiantes aux protéines. En effet, l'affinité entre les chaînes protéiques acylées et l'huile augmente et permet une meilleure stabilité des émulsions.

I.2.4.2.4. Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des protéines a été beaucoup étudiée et appliquée à de nombreuses protéines végétales. Parmi elles, en majorité des protéines extraites de tourteaux, coproduits de pressage d'huile de tournesol, de soja et de colza, mais également d'autres sources telles que les protéines de blé, d'avoine, de pois et de riz. L'hydrolyse enzymatique peut être réalisée à l'aide d'endo- et d'exopeptidases. Les endopeptidases rompent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes protéiques, tandis que les exopeptidases détachent les acides aminés terminaux en décomposant la protéine en acides aminés. Par conséquent, pour obtenir des fragments de protéines de taille réduite et pour améliorer leurs propriétés physico-chimiques, il est plus intéressant d'utiliser des endopeptidases.

Les hydrolysats protéiques issus de matière végétale sont utilisés comme principes actifs ou additifs pour les produits fonctionnels en cosmétique, médecine et alimentation [185]. La fonctionnalité des protéines hydrolysées dépend de la masse molaire, de la structure et de la séquence des acides aminés. Le paramètre de base pour caractériser le niveau d'hydrolyse et les propriétés des hydrolysats est le degré d'hydrolyse (DH), représentant le pourcentage des liaisons peptidiques rompues [186].

Adler-Nissen et Olsen [3] observent que les propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines de soja peuvent être améliorées par l'hydrolyse enzymatique jusqu'à un DH limité (jusqu'à 10 %). En effet, les peptides obtenus doivent posséder une taille suffisante pour former un film stable autour des gouttelettes en phase dispersée. Dans les travaux de Chabanon *et al.* [186], une réduction de la stabilité émulsifiante et moussante des hydrolysats de protéines de colza est observée à partir d'un DH de 15 % à cause de la présence d'une quantité importante de courtes chaînes de peptides, moins efficaces pour réduire la tension interfaciale. La même observation concernant la capacité d'absorption des protéines hydrolysées de pois chiche sur les gouttes d'huile est constatée par Yust *et al.* [187]. Dans la majorité des cas, un faible DH favorise l'exposition des parties non-polaires des chaînes protéiques et leur association avec les groupements hydrophobes d'huile, ce qui contribue à l'augmentation de la capacité d'absorption d'huile. Cependant, l'augmentation du DH conduit à la diminution de ces propriétés. Quelques exemples d'hydrolyse enzymatique de protéines d'origine végétale sont présentés dans le [Tableau I - 8](#).

Tableau I - 8. Exemples d'hydrolyse de protéines végétales décrits dans la littérature.

Graines/source de protéine	Enzyme utilisée	Intérêt d'hydrolyse/Conclusions	Référence
Citrouille	Protéase acide d'Aspergillo-pepsine	Excellente solubilité et de bonnes propriétés antioxydants des hydrolysats obtenus	[185,188]
Blé	Pepsine	Cinétique d'hydrolyse contrôlée par le changement de la vitesse d'agitation et de la température	[189,190]
Colza	Pepsine	Aucune amélioration significative des propriétés émulsifiante et moussante après l'hydrolyse des protéines	[191]
Colza	Alcalase	A DH faible, l'amélioration des capacités émulsifiante et moussante par rapport aux protéines natives	[186]
Pois chiche	Alcalase	Amélioration de la solubilité, de la capacité d'absorption d'huile et des propriétés moussantes après hydrolyse	[187]
Soja	Broméline	Augmentation de la solubilité et de la capacité moussante, mais diminution des propriétés gélifiantes après hydrolyse	[192,193]
Soja	Peptidase <i>Bacillus subtilis</i>	Diminution des capacités émulsifiante et moussante des protéines après l'hydrolyse (à cause du DH élevé >5%)	[194]
Soja	Alcalase	Obtention de peptides avec des propriétés immunomodulantes	[195]
Tournesol	Alcalase	Augmentation des propriétés moussantes des protéines après hydrolyse à faible DH	[196]

I.2.4.2.5. Réticulation

La réticulation consiste en la formation de liaisons covalentes entre les chaînes polymères grâce à un agent de réticulation (chimique ou enzymatique) ou sous action de différents facteurs : pH, température, rayonnement UV.

Pour la formation de réseaux protéiques par réticulation, les agents réticulants sont le glutaraldéhyde, le glyceraldéhyde ou encore le génipine (agent réticulant naturel extrait du Gardenia) [197,198]. L'inconvénient principal de ces substances reste leur toxicité élevée, qui limite les champs d'applications potentielles. Pour cette raison, les réticulants enzymatiques, à faible coût et non toxiques, sont plus avantageux pour la réticulation des protéines. Ils

permettent d'effectuer la modification dans des conditions douces (basse température, pH neutre) et d'obtenir une large gamme de taux de réticulation.

La réticulation des protéines par la transglutaminase (TG) a été largement décrite dans la littérature [14,23,197,199-210]. Cette enzyme est utilisée pour catalyser la réticulation des chaînes protéiques, aussi bien d'origine animale que végétale, et pour modifier leurs propriétés fonctionnelles. La transglutaminase permet de créer une liaison covalente entre un amide de résidu glutamique et une amine primaire de résidu lysine ou d'extrémités de chaîne. La réaction se déroule avec libération d'une molécule d'ammoniac. Un schéma de réticulation de protéines par la transglutaminase est présenté sur la [Figure I - 16](#).

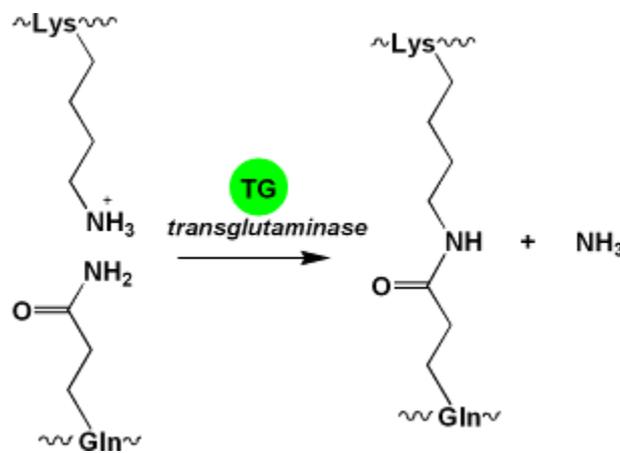


Figure I - 16. Représentation de la réticulation de protéines par la transglutaminase.

La réticulation des protéines est particulièrement utilisée dans le cas de l'étude des propriétés rhéologiques et gélifiantes. L'action d'un agent réticulant transforme les protéines hydrosolubles en agrégats à haute masse moléculaire peu solubles. Cette modification est largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour changer la texture, la cohésion et la viscosité des préparations dans lesquelles les protéines sont employées [198,201,209].

Plusieurs travaux traitent de la réticulation de protéines végétales (notamment les protéines de soja, de pois, de riz et la gliadine du blé) par la transglutaminase [201,202,206,209,211,212]. L'influence de la réticulation par transglutaminase sur la fonctionnalité de chacune de ces protéines a été étudiée. Les résultats obtenus démontrent que la création de liaisons covalentes par réticulation de protéines permet d'obtenir des hydrogels avec une bonne viscoélasticité [198,201,204], une texture plus dense, une capacité gélifiante plus importante [209], une stabilité thermique améliorée et une température de dénaturation plus élevée par rapport aux protéines natives [205,206,211].

La réticulation est parfois utilisée en combinaison avec d'autres modifications. Par exemple, Walsh *et al.* [208] ont observé une amélioration significative de la solubilité à pH entre 3,0 et 5,0

après la modification successive des protéines de soja par hydrolyse enzymatique et réticulation. Le résultat obtenu a été expliqué par le changement de la masse molaire des protéines. Par conséquent, les interactions électrostatiques entre les différents polypeptides de la protéine ainsi que leurs propriétés de surface sont affectées. Gan *et al.* [14] décrivent une autre combinaison de modifications : la réticulation par transglutaminase des chaînes protéiques et leur conjugaison par réaction de Maillard avec du ribose pour améliorer les propriétés mécaniques et la structure des gels préparés. Ils ont démontré que le traitement combiné permet d'obtenir des gels avec une meilleure durabilité et une meilleure élasticité grâce à la formation d'un réseau polymérique continu.

I.2.4.2.6. Cationisation

La réaction de cationisation permet d'apporter des charges positives sur les molécules par le greffage de groupements cationiques. Une telle fonctionnalisation permet de modifier le point isoélectrique des protéines et donc leur solubilité en fonction du pH et leur affinité vis-à-vis de substance anionique. Les réactifs cationiques le plus souvent utilisés dans la littérature pour la cationisation des polymères possèdent une fonction ammonium quaternaire, par exemple le chlorure de 3-halo-hydroxypropyltrialkyl-ammonium, le chlorure de 2,3-epoxypropyltrialkylammonium et le chlorure de glycidyltrialkylammonium [213-215].

En ce qui concerne la cationisation de polymères naturels (protéines et polysaccharides), les molécules utilisées pour cette modification doivent posséder deux groupements fonctionnels : le groupement réactif susceptible de réagir avec la macromolécule et la fonction cationique d'ammonium quaternaire [203]. En milieu aqueux, les chaînes protéiques et celles des polysaccharides possèdent deux principaux groupes réactifs à savoir les fonctions amines primaires et les groupements carboxylates. A pH basique, la réactivité nucléophile des fonctions amines est plus importante que celle des fonctions carboxylates. La réaction de cationisation se déroule donc principalement sur les fonctions amines. Un exemple de cationisation de protéines par le chlorure de glycidyltriméthylammonium est présenté sur la [Figure I - 17](#).

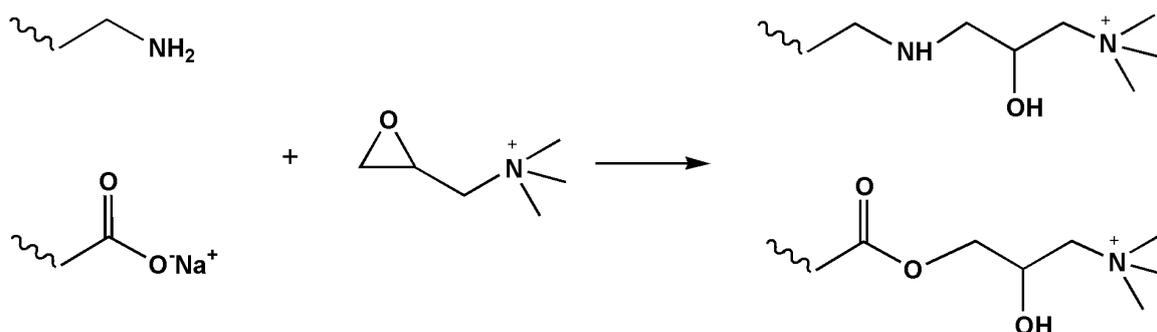


Figure I - 17. Cationisation de protéines par le chlorure de glycidyltriméthylammonium.

Peu d'études décrivent la modification de molécules naturelles par cationisation. Parmi ces molécules, on trouve essentiellement des polysaccharides tels que le chitosane [216,217], l'agarose [218], le dextrane [214], le glucane [219] et l'amidon [215,220,221]. Les polysaccharides cationiques sont connus pour leur hydrophilie, leur biodégradabilité, leur basse toxicité et leurs propriétés antibactériennes [219]. Wang et Xie [220] ont démontré que la cationisation favorise la rupture des liaisons hydrogènes intermoléculaires et intramoléculaires. Cependant, elle modifie la structure cristalline des grains de polysaccharide et leur morphologie [218]. Channasanon *et al.* [216] observent que l'attachement de l'ammonium quaternaire par cationisation augmente l'activité antimicrobienne et la solubilité des molécules naturelles. Les polysaccharides cationisés trouvent leur utilisation dans divers domaines : le traitement des eaux, la biologie moléculaire, l'industrie papetière, chimique, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, pétrolière et l'industrie textile [218].

Seulement quelques études décrivent la modification des protéines par la cationisation. Parmi elles, un brevet de Sarkar et Ramesh [222] qui porte sur la cationisation des protéines de soja. Les protéines de soja modifiées par cationisation peuvent trouver leur application comme coagulants dans l'industrie papetière et le traitement des eaux.

La gélatine a également été étudiée en cationisation par Kiick-Fischer et Tirrel [203] et par Zohuriaan-Mehr *et al.* [210]. L'incorporation du groupement positivement chargé à la gélatine permet d'augmenter les répulsions électrostatiques entre les sites cationiques ajoutés. L'hydrophilie de la protéine augmente et par conséquent sa solubilité dans l'eau. De plus, le gel obtenu avec les protéines modifiées retient une quantité d'eau plus importante car après l'introduction des groupements hydrophiles, la capacité de gonflement des chaînes protéiques devient plus élevée [203,210].

I.3. Application des protéines végétales en microencapsulation

Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont été menées pour valoriser les protéines végétales en tant que matériau enrobant en microencapsulation. Parmi les protéines végétales utilisées comme matière enrobante on trouve essentiellement les protéines de soja, les protéines de pois et les protéines des céréales.

Les deux procédés majoritairement utilisés sont l'atomisation [15,18,103,168,169,223-226] et la coacervation simple ou complexe [16,104,227-230]. D'autres procédés comme l'encapsulation par gélification ou par évaporation de solvant peuvent également être envisagés [13,102,129,231,232]. Mais, l'intérêt principal de l'utilisation des deux techniques citées précédemment avec des protéines végétales hydrosolubles est la possibilité d'envisager des

procédés d'encapsulation ne nécessitant pas l'utilisation de solvant organique. Il permet aussi de conserver l'aspect "procédé vert" de la microencapsulation en utilisant les protéines végétales en tant que ressources renouvelables et biodégradables.

Ces deux procédés permettent d'obtenir des efficacités de microencapsulation élevées (jusqu'à 100 %). L'efficacité de microencapsulation (EME) est définie comme le rapport entre le pourcentage de matière active dans les microparticules (déterminé expérimentalement) et le pourcentage de matière active mise en préparation liquide de départ.

I.3.1. Protéines de soja

Les graines de soja sont composées d'une fraction importante de protéines (35-45 %), composée majoritairement de glycinine et de conglycine (50-90 % des protéines totales) [233]. La fraction de glycinine (11S globuline) a une masse d'environ 350 kDa et la fraction de conglycine (7S globuline) a une masse autour de 140-180 kDa. Les protéines de soja isolées et purifiées présentent des propriétés fonctionnelles intéressantes, comme des propriétés gélifiantes, tensioactives et émulsifiantes [234]. Ces propriétés ainsi que leur solubilité dépendent fortement du pH, du traitement thermique, de la présence et la concentration de sels ou d'autres ingrédients. Les protéines obtenues à partir des tourteaux se trouvent sous la forme d'extrait protéique contenant également d'autres composants, comme des polysaccharides, des composés minéraux ou des lipides [235,236].

L'utilisation des protéines de soja (PS) dans le domaine de la microencapsulation a été étudiée par différents auteurs ([Tableau I - 9](#)). Ces protéines sont généralement utilisées comme seul matériau enrobant mais peuvent également être mélangées à des polysaccharides [12,18,233,234]. La combinaison protéines/polysaccharides permet une meilleure protection, notamment contre l'oxydation de la matière active [168]. Grâce à l'hydrosolubilité des protéines de soja, les microparticules sont fréquemment préparées par la technique d'atomisation [12,17,18,68,168,169,226], mais la coacervation et la gélification peuvent également être envisagées [13,16,69,104,229,230].

Tableau I - 9. Microencapsulation à base de protéines de soja comme matière enrobante.

Procédé	Matière enrobante	Matière active	Référence
Atomisation	PS	Huile d'orange	[15]
Atomisation	Mélange des protéines et des polysaccharides	Huile de poisson	[168]
Atomisation	PS/sirop de glucose	Stéarine, huile de palme	[169]
Atomisation	PS/maltodextrine	Phospholipide	[226]
Atomisation	PS	Composées aromatiques	[12]
Atomisation	PS	Hydrolysate de caséine	[17]
Atomisation	PS/gélatine	Hydrolysate de caséine	[68]
Atomisation	PS	Oléorésine du paprika (colorant alimentaire)	[18]
Coacervation simple	Glycine de soja	Hexadécane	[16]
Coacervation simple	PS	Huile de poisson	[69]
Coacervation complexe	PS/dodécyle sulfate de sodium	Hexadécane	[104]
Coacervation complexe	PS/pectine	Hydrolysate de caséine	[229]
Coacervation complexe	PS/pectine	Propolis	[230]
Coacervation complexe	PS/gomme arabique	Huile d'orange	[237]
Gélification	PS	Riboflavine	[13]

I.3.1.1. Microencapsulation par atomisation

Dans le cas d'une émulsion huile dans eau, où la matière enrobante est représentée par des protéines de soja ou par un couple protéine/polysaccharide, une étape d'homogénéisation sous pression est souvent effectuée afin de stabiliser l'émulsion avant de passer à l'étape d'atomisation [15,18,168,169,226]. Yu *et al.* [226] remarquent que l'augmentation de la pression pendant l'homogénéisation diminue légèrement la viscosité des émulsions. Rusli *et al.* [169] décrivent une diminution de la taille des gouttelettes d'huile avec l'augmentation de la pression. Quelques exemples sont présentés dans le [Tableau I - 10](#).

L'application d'une force mécanique pendant l'homogénéisation se traduit par la dispersion des gouttelettes d'huile et par des modifications structurales des protéines globulaires [238]. Le déploiement des chaînes protéiques permet l'exposition de certains acides aminés à un nouvel environnement. Les modifications principales ont lieu au niveau de la structure tertiaire et secondaire des protéines, ce qui influence le changement des propriétés de surface. Par conséquent, les protéines acquièrent des propriétés tensioactives plus importantes et s'accumulent facilement à l'interface huile-eau créant ainsi une émulsion stable. La couche

formée par les protéines autour de la gouttelette d'huile permet une protection immédiate et efficace contre la coalescence et une stabilité de l'émulsion dans le temps.

Tableau I - 10. Influence de l'homogénéisation sous pression avant atomisation sur les propriétés des émulsions à base des protéines de soja.

Matière enrobante/ matière active, w/w	Pression, MPa	Taille des gouttelettes, μm	Viscosité, mPa*s	Référence
2/1	35	1,52	-	[15]
2/1	35	0,57 \pm 0,1	-	[168]
1/1	15 \rightarrow 55	-	100 \rightarrow 70	[226]
1/1	18 \rightarrow 35	0,45 \rightarrow 0,32	-	[169]
4/1	30	1,05 \pm 0,66	-	[18]

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de la microencapsulation par atomisation en utilisant les protéines de soja ou un mélange protéines de soja/polysaccharide comme matrice. La rétention de la matière active augmente avec le taux en matière sèche en émulsion [12], car le temps d'évaporation du solvant est plus court, la formation de l'enrobage est plus rapide et plus efficace. Par contre, au dessus d'une concentration critique (20 % m.s.), l'émulsion devient trop visqueuse et on observe une baisse en efficacité du procédé [226]. Rusli *et al.* [169] observent une légère amélioration de l'efficacité de microencapsulation avec l'augmentation de la pression pendant l'homogénéisation.

Du point de vue du procédé, la hausse de la température de séchage de la formulation liquide permet également d'augmenter la vitesse de formation du film autour de la matière active en limitant son relargage anticipé et ainsi d'améliorer l'efficacité de microencapsulation [18].

Dans les différentes études, il a été démontré que l'efficacité du procédé est dépendante de plusieurs paramètres tels que la nature des matières utilisées, les conditions d'atomisation, comme par exemple la concentration en matière sèche de la formulation liquide et les températures d'entrée et de sortie d'atomiseur. En effet, pendant le séchage par atomisation, les préparations liquides peuvent être soumises à une température élevée (150-180 °C), ce qui provoque l'évaporation des matières actives très volatiles. Ceci explique la faible efficacité de microencapsulation par cette technique du citral (35 %) [12] par rapport à celle de la stéarine (91 %) [169] avec les protéines de soja.

I.3.1.2. Microencapsulation par coacervation

Les protéines de soja ont été aussi étudiées comme matériau enrobant en microencapsulation par coacervation. L'efficacité du procédé d'encapsulation par cette technique est corrélée à de nombreux paramètres tels que la concentration en matière active et en matière enrobante, la température ou encore le pH du milieu. Quand la concentration de matière active hydrophobe dépasse 50 % w/w, une baisse de l'efficacité du procédé est généralement observée [16,169,229,237]. Ce phénomène est particulièrement bien illustré dans le travail de Mendanha *et al.* [229] où il est constaté qu'une variation du ratio matière enrobante (protéines de soja et pectine)/matière active (hydrolysate de caséine) de 1/1 à 1/3 diminue l'efficacité de microencapsulation de 91,6 % à 78,8 %. Jun-xia *et al.* [237] justifient cette tendance par une émulsification incomplète après l'addition d'excès de matière hydrophobe dans le système. Cela affecterait alors les interactions électrostatiques entre les protéines de soja et les polysaccharides, provoquant la déstabilisation de l'émulsion.

Lazko *et al.* [16] démontrent que la concentration en protéines de soja (en tant que matériau enrobant) pendant l'étape d'émulsification est aussi en forte corrélation avec la stabilité et la taille des coacervats. Cela peut être expliqué par l'introduction d'un nouveau paramètre – la surface spécifique – qui est inversement proportionnelle au diamètre des gouttelettes d'huile. En effet, grâce aux propriétés tensioactives des protéines, l'augmentation de leur concentration dans le milieu favorise l'augmentation de la surface spécifique des gouttelettes améliorant l'absorption des protéines à l'interface l'huile/eau et par conséquent la résistance des gouttelettes à la coalescence. Ainsi, la taille moyenne des coacervats (généralement mesurée par granulométrie) diminue. D'autre part, Lazko *et al.* [16] ont également démontré que la concentration en glycine de soja ne semble pas affecter significativement l'épaisseur de la membrane des microcapsules. Quelques résultats de ces travaux sont présentés dans le [Tableau I - 11](#).

Tableau I - 11. Résultats de la microencapsulation de l'hexadécane avec la glycine de soja par coacervation simple [16].

Concentration en protéine, g/L	pH	Température, °C	Surface spécifique, m ² /g	EME, %	Taille des particules, µm
5	8	25	-	6,4	-
0,5	2	55	0,2	58	153
1,25	2	55	0,25	65	125
5	2	55	0,35	100	87

Ces auteurs [16] ont mis en évidence que la microencapsulation par coacervation est plus efficace pour les pH acides et les températures élevées (pH 2 et 55 °C respectivement). Un milieu acide favorise la dénaturation des protéines globulaires 11S ce qui se caractérise par la déformation de leur structure quaternaire vers les structures tertiaire et secondaire. L'accessibilité globale des sites hydrophobes à l'intérieur des formations globulaires est améliorée par ce changement de la structure [239,240]. A pH inférieur au point isoélectrique, les fonctions COO⁻ de la protéine se transforment en groupements COOH non chargés et l'hydrophilie de la macromolécule diminue. Un milieu acide favorise donc l'affinité entre les protéines et la matière active hydrophobe au sein des émulsions, ce qui se traduit par une meilleure efficacité d'encapsulation par coacervation.

Lorsque la microencapsulation d'une matière active est effectuée par coacervation, une étape de réticulation est souvent utile en fin de procédé, principalement pour renforcer l'enrobage des microcapsules. Cette étape supplémentaire n'affecte pas l'efficacité de la précipitation des protéines autour des gouttelettes contenant la matière active, mais joue un rôle important sur la dispersion et la taille des microcapsules, particulièrement dans le cas d'une agitation prolongée. En effet, Lazko *et al.* [16] ont observé une augmentation significative de la taille des microcapsules (de 90 µm à 200 µm) due à la coalescence en l'absence de réticulation (Figure I - 18), alors que cette coalescence n'a pas été observée lorsque les microcapsules étaient réticulées (aucune variation du diamètre des microcapsules) [104].

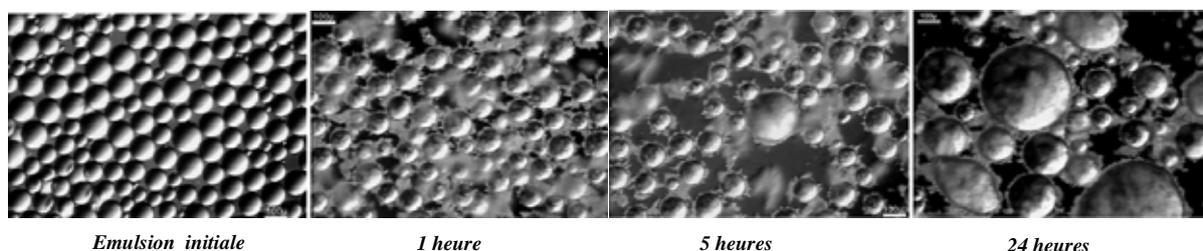


Figure I - 18. Stabilité dans le temps des microcapsules d'hexadécane obtenues par coacervation simple avec le glycinine de soja, sans réticulation [16].

Afin de masquer le goût amer de certains produits, comme par exemple l'hydrolysat de caséine, et de pouvoir les incorporer dans les produits alimentaires, leurs microencapsulation par des protéines de soja a été effectuée par atomisation [17,68] et coacervation [229]. Durant l'étape d'encapsulation, les interactions hydrophobes entre l'hydrolysat de caséine et les protéines de soja permettent de réduire le mauvais goût de la caséine. Dans les deux cas, une diminution de l'efficacité d'encapsulation et une augmentation de la taille des particules avec l'augmentation de la concentration en hydrolysat de caséine ont été démontrées.

Chen et Subirade [13] ont étudié la préparation de microsphères à base de protéines de soja par la technique de la gélification froide (initiée par l'acide acétique glacial en présence de carbonate de calcium), afin d'élaborer des nouveaux systèmes à libération contrôlée pour des produits nutraceutiques (riboflavine). Les microparticules obtenues ont une morphologie sphérique et un diamètre d'environ 15 μm . Une efficacité de microencapsulation élevée (79-88 %) a été obtenue à température ambiante sans ajout d'agent réticulant, ce qui est particulièrement intéressant pour de nombreuses applications, notamment dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Ainsi, des nombreuses études ont prouvé que les protéines de soja étaient tout à fait adaptées à la microencapsulation, tant par coacervation que par atomisation. Dans le cas de des deux techniques, des paramètres spécifiques, et particulièrement la concentration en matière active, affectent l'efficacité de microencapsulation et la taille des microparticules [16,169,226,229]. Mais ces auteurs montrent que des valeurs élevées d'efficacité de microencapsulation peuvent être obtenues, en utilisant des conditions expérimentales adaptées. Les différences principales entre les microparticules obtenues par ces deux techniques sont la structure des particules, ainsi que les propriétés de libération de la matière active et leur taille : le diamètre moyen des sphères obtenues par coacervation est généralement plus élevé et peut atteindre 100 μm , alors que dans le cas de l'atomisation la taille des microparticules varie de quelques μm à quelques dizaines de μm .

I.3.2. Protéines 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 [241]. La légumine de pois représente une fraction des globulines 11S avec une masse molaire comprise entre 350 kDa et 400 kDa, alors que la viciline et la convicine représentent la fraction des globulines 7S avec une masse autour de 150 kDa.

Les extraits protéiques de pois possèdent des propriétés gélifiantes [242] et interfaciales [243]. Cependant, dans les études traitant de microencapsulation, ces dernières sont généralement associées à des polysaccharides [84,101,223,224,227]. 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 [116]. 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. Les différents couples protéines de pois/polysaccharides utilisés en microencapsulation et les procédés associés sont présentés dans le [Tableau I - 12](#).

Tableau I - 12. Microencapsulation à base de complexes protéines de pois – polysaccharides.

Procédé	Matière enrobante			Matière active	Référence
	Protéine	Polysaccharide	Ratio, w/w		
Coacervation complexe	Globuline de pois	Carboxyméthylcellulose	3/7	Triglycéride	[227]
		Gomme arabique			
		Alginate de sodium			
Atomisation	Concentrats de protéines de pois	Maltodextrine	1/1	Acide ascorbique	[84]
Atomisation	Isolats de protéines de pois	Maltodextrine	1/1	α -tocophérol	[224]
Atomisation	Isolats de protéines de pois	Maltodextrine	1/1	Acide ascorbique	[223]
Atomisation	Isolats de protéines de pois	Pectine Maltodextrine	1/45	Triglycéride	[101]

I.3.2.1. Microencapsulation par atomisation

Plusieurs études traitent de l'utilisation des protéines de pois en microencapsulation par atomisation. Les principales propriétés des microparticules obtenues sont résumées dans le [Tableau I - 13](#).

Tableau I - 13. Propriétés des microparticules à base de protéines de pois.

Matière enrobante	Matière active	Taille des particules, μm	EME, %	Taux d'encapsulation, %	Référence
Protéines de pois	acide ascorbique	2,7	101,9	34,6	[84]
Protéines de pois/ maltodextrine	acide ascorbique	8,2	95,9	29	
Protéines de pois	α -tocopherol	2,2	86,8	28	[224]
Protéines de pois/ maltodextrine	α -tocopherol	3,5	77,8	25	

L'intérêt d'utiliser des mélanges protéine/polysaccharide est de combiner les propriétés spécifiques de chacun de ces polymères. Les polysaccharides possèdent de faibles propriétés

émulsifiantes par rapport aux protéines et sont généralement utilisés comme matériaux enrobants en présence d'agents émulsifiants.

L'incorporation de polysaccharides dans le matériau enrobant permet une meilleure protection des ingrédients actifs contre l'oxydation et une amélioration de la stabilité d'émulsion [71]. Gharsallaoui *et al.* [101] remarquent que dans les mélanges protéine/polysaccharide, les protéines apportent des propriétés émulsifiantes et filmogènes, alors que les polysaccharides agissent de façon à former le matériau matriciel. En termes de taux d'encapsulation, Pierucci *et al.* [224] montrent que les protéines de pois utilisées comme seul matériau enrobant donnent des résultats comparables, voire meilleurs, que ceux obtenus pour les microparticules à base de mélange protéine de pois/polysaccharide. Ces résultats sont expliqués par la présence d'interactions électrostatiques sensiblement plus fortes entre protéines et matière active que entre polysaccharides et matière active, dues à la diversité des fonctions chimiques présentes sur les protéines.

Les résultats présentés dans le [Tableau I - 13](#) illustrent que l'ajout de maltodextrine se traduit par des tailles de particules plus élevées, en particulier pour une matière active hydrosoluble, telle que l'acide ascorbique. Pierucci *et al.* [84] justifient cette augmentation par la capacité de la maltodextrine à former rapidement une couche vitreuse à la surface et à laisser l'air circuler dans son réseau matriciel, ce qui aurait un effet "gonflant" sur la microsphère et par conséquent augmenterait sa taille.

Les résultats de ces travaux démontrent que les protéines de pois seules ou en association avec des polysaccharides sont efficaces en microencapsulation des matériaux hydrosolubles (acide ascorbique [84,223]) ou liposolubles (α -tocopherol [224], triglycéride [101,227]) par atomisation.

I.3.2.2. Microencapsulation par coacervation

Les travaux de Ducl *et al.* [227] traitant de l'utilisation de protéines de pois pour la microencapsulation de triglycérides par coacervation complexe ([Tableau I - 12](#)) ont permis de mettre en évidence l'influence du pH et de la concentration en matériau enrobant (protéine de pois/gomme arabique, 50/50) sur la taille des microcapsules. Plus la concentration en matière enrobante est élevée, plus la taille des microcapsules obtenues est grande. Par exemple, pour un pH de 3,5, le diamètre des microcapsules varie de 28 μm à 97 μm pour des concentrations de 1 g/L et 10 g/L respectivement. Inversement, Lazko *et al.* [16] observent une diminution de la taille des coacervats de 153 μm à 88 μm avec la hausse de la concentration de matériau enrobant (glycine de soja) de 0,5 g/L à 5 g/L respectivement. Ce désaccord dans les résultats obtenus dans deux études peut être attribué à la différence des conditions d'encapsulation par

coacervation. La technique de la coacervation complexe est utilisée dans le cas des particules à base des protéines de pois. Ainsi, la présence de polysaccharides dans le système peut influencer l'agglomération et la coalescence des coacervats, et donc l'augmentation de leur taille [244]. Alors que dans le cas des protéines de soja, la technique de coacervation simple est utilisée. La concentration plus élevée de la protéine avec des propriétés tensioactives dans l'émulsion permet une meilleure résistance des coacervats contre la coalescence. De plus, les conditions opératoires ne sont pas exactement les mêmes dans les deux cas. Par exemple, la température de 30 °C et de 55 °C, le pH de 3,5 et de 2,0, l'agitation mécanique à 500 tr/min et l'agitation magnétique à 600 tr/min sont utilisés dans le cas de préparations à base de protéines de pois et de protéines de soja respectivement.

Il semble également possible de préparer des microparticules à partir d'une fraction de protéines de pois (légumine [98] ou viciline [102,245]), sans ajout de polysaccharide, pour enrober une matière active. Dans ces travaux, les microparticules de légumine ou viciline sont préparées par coacervation simple. En ce qui concerne la distribution des tailles pour les particules obtenues, elles sont comprises entre 0,3 µm et 0,9 µm.

Enfin, les tailles moyennes des microparticules à base des protéines de pois obtenues par la technique de coacervation varient entre quelques µm et 100 µm, alors que celles produites par atomisation ont une taille supérieure ou proche de 10 µm.

I.3.2.3. Protéine de pois en tant qu'additif

Les propriétés émulsifiantes des protéines de pois permettent également d'envisager son utilisation comme additif aidant à mieux stabiliser une émulsion par rapport au matériau enrobant seul [246]. Dans les travaux de Gharsallaoui *et al.* [101], la protéine de pois a été utilisée en faible quantité (0,25 % w/w) pour la préparation d'une émulsion d'huile dans l'eau. La protéine de pois a été ajoutée à un mélange de polysaccharides (pectine/maltodextrine) pour stabiliser l'émulsion avant l'encapsulation de triglycéride par atomisation. Cette étude valide l'intérêt de combiner les propriétés des polysaccharides à celles des protéines. Les émulsions à base de polysaccharides sont moins sensibles aux variations de pH, aux forces ioniques élevées et aux hautes températures, que celles à base de protéines seules [233,247]. De plus, la présence des polypeptides hydrophobes de la protéine (par exemple des globulines de pois à pH acide) permet aux émulsions à base de polysaccharides une bonne absorption du matériau enrobant à l'interface l'huile/eau et donc une bonne stabilité [101]. Ces études montrent que l'ajout d'une petite quantité de protéines permet de stabiliser les émulsions et de les protéger contre la coalescence, les variations en température et pH.

I.3.3. Protéines de blé et d'autres céréales

Les céréales sont principalement cultivées pour leurs graines, qui jouent un rôle important dans l'alimentation humaine et animale. Le blé, le riz et le maïs sont les céréales les plus cultivés au monde. Elles contiennent de 7 % jusqu'à 15 % de protéines dans les graines.

Le blé contient une protéine particulière appelée le gluten, qui est obtenue à partir de la farine de blé après l'extraction de l'amidon. Le gluten est un mélange complexe composé majoritairement de protéines et d'une faible fraction de polysaccharides (autour de 20 %). Les protéines du gluten sont constituées de la gliadine et la gluténine. La gliadine est composée de chaînes polypeptidiques simples, stabilisées par des ponts disulfures. Elle est soluble dans les solutions hydro-alcooliques et possède une taille autour de 25-100 kDa. La gluténine est la fraction protéique hydrosoluble, elle est constituée de sous-unités similaires à la gliadine liées entre elles par des ponts disulfures et formant des agrégats avec une taille supérieure à 100 kDa [248].

Le gluten représente environ 80 % des protéines contenues dans les graines du blé, son taux joue un rôle important dans la qualité de la farine (mélange d'amidon et de gluten) [249]. Il est utilisé essentiellement dans l'alimentation humaine et animale. La faible solubilité du gluten dans l'eau favorise les applications dans le domaine de la boulangerie. Par contre les applications de gluten dans les autres domaines, notamment en cosmétique et pharmacie, sont limitées à cause de son insolubilité.

Le gluten de blé est la protéine de céréale la plus étudiée dans la microencapsulation [74,102,227,228,250,251]. Sa faible solubilité dans l'eau et sa viscoélasticité apportent à ce polymère naturel des caractéristiques physico-chimiques très intéressantes, notamment les propriétés gélifiantes et filmogènes [252].

Les protéines de blé seules ou en combinaison avec des polysaccharides sont appropriées pour l'encapsulation des principes actifs par des différentes techniques. Quelques travaux décrivent l'utilisation des autres protéines de céréales en tant que matériau enrobant, notamment les protéines d'orge et la zéine de maïs [103,225,231,232,253]. Les protéines d'orge étudiées en encapsulation par Wang *et al.* [103,225] sont composées de deux fractions majoritaires : la glutéline et la hordéine. Ces protéines possèdent d'excellentes propriétés gélifiantes et émulsifiantes. La zéine extraite de maïs est une prolamine soluble dans les solutions hydro-alcooliques et connue pour ces propriétés filmogènes [254]. Les études de microencapsulation par les protéines de céréales sont présentées dans le [Tableau I - 14](#).

Tableau I - 14. Protéines de céréales dans la microencapsulation.

Procédé	Matière enrobante	Matière active	Référence
Atomisation	Gliadine de blé, zéine du maïs	Acide linoléique	[251]
Atomisation	Protéines de l'orge	Huile de poisson, β -carotène	[103,225]
Coacervation simple	Gluten/caséine	Pyrrolnitrite	[74]
Coacervation simple	Gliadine de blé	Hexadécane	[228]
Coacervation complexe	Gliadine de blé/ gomme arabique	Huile de vaseline	[227,250]
Evaporation de solvant	Gliadine de blé	Acide rétinoïque	[102]
Evaporation de solvant	Gluten de blé/ poly(oxyde d'éthylène)	Chlorite de diltiazem (principe actif)	[129]
Séparation des phases	Zéine de maïs	Huiles essentielles	[231]
Procédé basé sur CO ₂ supercritique	Zéine de maïs	Lysozyme	[253]
Précipitation par anti- solvant	Zéine de maïs	Quercétine	[232]

I.3.3.1. Microencapsulation par coacervation

Ducel *et al.* [250] ont étudié l'encapsulation de la vaseline avec le mélange gliadine/gomme arabique par la coacervation complexe en se focalisant sur l'influence de la concentration en protéines et du pH du milieu sur les propriétés des microcapsules. La taille des coacervats double de 25 μm à 50 μm quand le pH augmente de 3,0 à 3,5 respectivement. Ils notent qu'à pH plus acide, la viscoélasticité des protéines augmente, leur répartition à la surface des gouttelettes est plus homogène et la coalescence est moins importante. Le pH 3,5 est plus proche du point isoélectrique des protéines de pois (pI 4,5-5,0), la solubilité des protéines est plus faible, donc leur agrégation augmente. La faisabilité et l'efficacité de microencapsulation sont donc améliorées avec la diminution du pH. Le phénomène observé par Ducel *et al.* [250] est en accord avec les résultats obtenus par Lazko *et al.* [16] pour les coacervats à base de glycine de soja. Finalement, les tailles des particules obtenues par la technique de coacervation (simple ou complexe) varient entre quelques μm et 200 μm , et sont comparables pour toutes les protéines végétales : protéines de soja [16], protéines de pois [227] et protéines de blé [74,228,250].

I.3.3.2. Microencapsulation par d'autres techniques

Seulement quelques études reportent l'utilisation des protéines de céréales comme matériau enrobant en microencapsulation par atomisation. Iwami *et al.* [251] étudient l'encapsulation de l'acide linoléique par la gliadine de blé afin d'améliorer sa stabilité et digestibilité pour des applications alimentaires. Wang *et al.* [103] utilisent les protéines d'orge pour encapsuler l'huile de poisson par la technique d'atomisation à 150 °C. Ils obtiennent des valeurs d'efficacité de microencapsulation élevées de 97-100 %. Les particules préparées peuvent être chargées en matière active jusqu'à 50 %. Elles possèdent la morphologie sphérique avec un intérieur poreux et une taille moyenne entre 1 µm et 5 µm. Les protéines d'orge démontrent une bonne efficacité de protection de la matière active contre l'oxydation dans les formulations alimentaires.

Andreani *et al.* [129] étudient l'utilisation des protéines de blé pour la libération contrôlée d'un médicament (diltiazem) et l'influence de l'addition des faibles quantités de poly(oxyde d'éthylène) (POE) sur les propriétés des microparticules. Des particules parfaitement sphériques avec la morphologie poreuse d'un diamètre moyen entre 10 µm et 20 µm ont été obtenues par le procédé d'évaporation de solvant. Il a été démontré que l'ajout d'une faible quantité (5 %) de POE dans la préparation permet d'améliorer l'efficacité de la microencapsulation par le gluten de 73 % à 97 %. En effet, la porosité, et donc la surface spécifique, des microparticules avec le POE est plus importante, ce qui favorise une meilleure incorporation de la matière active. Il a été également observé que la porosité des microparticules dépend de la quantité du POE ajouté, ce qui peut permettre une modulation de la libération de la matière active.

Dans les travaux d'Ezpeleta *et al.* [102], la technique d'évaporation de solvant a été utilisée également pour préparer des microparticules à base de gliadine de blé. L'influence du solvant sur la taille des microparticules obtenues par la méthode de désolvatation a été étudiée. Par exemple, le diamètre maximum des particules produites dans le mélange éthanol/eau (7/3) ou acétone/eau (5/5) est de 0,45 µm, dans le propan-2-ol/eau (5,5/4,5) – 0,8 µm, dans le propan-1-ol/eau (5/5) – 1 µm. La variation significative en diamètre des particules suivant la composition du solvant utilisé peut être expliquée par les différentes interactions physico-chimiques entre les protéines et le solvant qui dépendent de la polarité de solvant et des groupement de chaînes protéiques.

L'encapsulation du lysozyme de l'œuf avec la zéine de maïs par la méthode d'anti-solvant basée sur le CO₂ supercritique a été étudiée par Zhong *et al.* [253]. Les microparticules avec la taille variant de quelques µm à 50 µm et une efficacité de microencapsulation de 46,5 % sont obtenues. Les cinétiques de libération de la matière active montrent un bon potentiel d'utilisation des particules produites pour des applications alimentaires.

I.3.4. Autres protéines végétales potentiellement utilisables dans la microencapsulation

D'autres protéines d'origine végétale, comme les protéines de riz, les protéines d'avoine et les protéines de tournesol, présentent des caractéristiques intéressantes et un potentiel d'utilisation comme matière enrobante en microencapsulation.

D'une manière générale, les protéines de riz ou d'avoine ont déjà une application alimentaire importante qui restera toujours prioritaire. Par contre, les propriétés des protéines de tournesol sont largement étudiées, mais l'utilisation de ce biopolymère dans l'industrie est négligeable. Par conséquent, il est intéressant de trouver de nouvelles applications à haute valeur ajoutée pour ce polymère naturel.

I.3.4.1. Protéines de riz

Le riz est la culture céréalière la plus importante cultivée dans le monde en développement, il constitue la denrée alimentaire de base de plus de la moitié de la population du globe. Les sons de riz produits par le broyage et la séparation des graines de riz sont assez riches en protéines car constituent de 12 % à 20 % de la matière protéique. Ils sont donc une source potentielle de protéines de haute qualité pour les nouvelles applications alimentaires [255].

Comparé aux sons du riz, la quantité de protéines dans ces graines est légèrement inférieure et varie entre 6 % et 15 % [256]. Les protéines de riz sont généralement obtenues par extraction alcaline [257,258] ou par traitement à l'eau supercritique [259,260]. De plus, les graines de riz sont étudiées pour la production de l'amidon, de glutamate monosodique, des pigments et de l'alcool de riz. Ainsi, les protéines de riz représentent un coproduit additionnel à explorer [261]. En ayant recours à l'extraction séquentielle des protéines, la répartition moyenne des fractions suivante est obtenue : 9 % de prolamine, 84 % de glutéline, 7 % d'albumine et de globuline. Chandi et Sogi [262] ont étudié les propriétés fonctionnelles de protéines de riz. Ils démontrent que le concentrat protéique de 55 % a :

- une stabilité moussante pendant plusieurs jours dans les solutions sucrées (5-15 % de concentration) ;
- une bonne stabilité émulsifiante qui dépend du pH, de la présence de sels et des sucres dans la solution ;
- des propriétés physico-chimiques comparables avec celles de la caséine.

Les protéines isolées à 92 % préparées à partir de sons du riz et analysées par Wang *et al.* [263] ont :

- des propriétés moussantes semblables à celles des protéines de blanc d'œuf ;
- une stabilité émulsifiante plus faible que l'albumine du sérum bovin (BSA) ;

- un minimum de solubilité à pH 4 et un maximum à pH 12 ;
- une composition en acides aminés principaux similaire à celle des protéines de soja et de la caséine ;
- une température de dénaturation de 83,4 °C.

Les protéines de riz s'associent aux polysaccharides (alginate et carragenane) en formant des complexes précipités pour des nouvelles applications industrielles [264]. On peut donc considérer que les protéines de riz ont des propriétés physico-chimiques assez intéressantes et peuvent potentiellement être étudiées comme enrobage dans la microencapsulation. Pourtant, l'utilisation principale des graines de riz appartient à l'industrie alimentaire et son application potentielle pour des produits à haute valeur ajoutée développés par microencapsulation restera mineure.

I.3.4.2. Protéines d'avoine

L'avoine est une plante utilisée principalement dans l'alimentation humaine et animale du fait de sa teneur élevée en protéines et en acides gras. La fraction des protéines du grain d'avoine s'étend de 12 % à 24 %, la plus élevée parmi les céréales [265]. La protéine d'avoine est considérée comme étant de bonne qualité alimentaire puisqu'elle contient plusieurs acides aminés essentiels, ce qui est attribué à la présence d'une fraction importante d'albumines et de globulines par rapport aux autres protéines issues des céréales. La globuline représente la majeure partie des protéines d'avoine, autour de 70 - 80 %. Les protéines concentrées d'avoine ont une faible solubilité et des propriétés fonctionnelles pauvres. Pour améliorer les propriétés physico-chimiques, l'hydrolyse enzymatique [266], l'acétylation et la succinylation [267] peuvent être réalisées. Il a été démontré que ces modifications chimiques permettent d'augmenter la solubilité, ainsi que les capacités émulsifiante et moussante des protéines.

Malgré quelques inconvénients, l'utilisation des protéines d'avoine dans le domaine alimentaire est assez importante. Après les modifications des propriétés fonctionnelles, ces polymères biodégradables ont des intérêts d'utilisation comme matériau enrobant de microparticules pour les nouvelles applications.

I.3.4.3. Protéines de tournesol

La graine de tournesol, cultivée pour son huile, renferme également une grande quantité de protéines et de fibres dans la fraction de tourteaux récupérée en sortie d'huilerie. Les tourteaux de tournesol sont utilisés essentiellement pour l'alimentation animale. Ces tourteaux dégraissés sont principalement constitués des protéines (35-45 %). Les protéines de tournesol proviennent essentiellement des protéines de réserve contenues dans l'amande de la graine dans laquelle

elles représentent une fraction entre 20 % et 25 % selon la variété de tournesol [19]. La quantité de protéines extraite du tournesol varie également en fonction de solvant utilisé (principalement les solutions aqueuses), ainsi que des conditions d'extraction (agitation, température, pH). Dans les tourteaux de tournesol, quatre familles de protéines sont représentées [268] :

- les globulines – 55 % à 60 % ;
- les albumines – 17 % à 23 % ;
- les glutélines – 11 % à 17 % ;
- les prolamines – 1 % à 4 %.

En terme de coefficient de sédimentation, les protéines de tournesol possèdent deux fractions majeures : la fraction des globulines 11S (hélianthinine) et la fraction des albumines 2S. L'hélianthinine possède une masse molaire variant entre 300 kDa et 350 kDa et une structure hexamérique qui peut être modifiée sous action de la température, de pH et de la force ionique du milieu. Les globulines, fraction principale des protéines de tournesol, sont constituées de deux sous-fractions : les polypeptides basiques d'une masse de 21-27 kDa (pI 6,8-8) et les polypeptides acides d'une masse de 32-44 kDa (pI 5,2-5,4) [269]. Ces deux types de polypeptides sont liés entre eux par des ponts disulfures. La solubilité des globulines dépend fortement du pH et de la force ionique du milieu. Par contre, la solubilité des albumines (la fraction protéique 2S et la masse molaire entre 10 kDa et 18 kDa) est indépendante du pH et de la force ionique. Contrairement aux deux fractions majoritaires, les glutélines et prolamines de la graine de tournesol sont très peu étudiées.

Les propriétés physico-chimiques des protéines de tournesol sont étudiées par plusieurs auteurs [19,270,271]. La revue de Gonzalez-Perez et Vereijken [19] illustre que la capacité émulsifiante des protéines de tournesol est plus importante ou similaire à celle des protéines de soja. Ils en déduisent les conclusions suivantes concernant les propriétés émulsifiantes de protéines de tournesol :

- la capacité émulsifiante la plus élevée est observée au pH 7-8 et la minimale au point isoélectrique des protéines (pH=4,3) ;
- le type d'extraction des protéines et la nature du solvant d'extraction ne changent pas les propriétés émulsifiantes des protéines ;
- le réchauffement qui provoque la dénaturation réduit la capacité émulsifiante des protéines.

Ces observations peuvent être interprétées par le changement de structure des protéines dû à la dénaturation thermique, ce qui favorise le déploiement des chaînes et augmente leur flexibilité. Ainsi la capacité émulsifiante des protéines de tournesol modifiées devient plus faible, mais la stabilité de la préparation dans le temps augmente.

En ce qui concerne les propriétés moussantes, les protéines de tournesol ont une capacité moussante aussi élevée que les protéines de soja [19]. Les mousses à base de protéines de tournesol restent stables dans le temps à pH acide et à concentration importante (5-10 % w/w). L'hydrolyse enzymatique de protéines de tournesol conduit à l'amélioration de ses propriétés fonctionnelles et à l'introduction de nouvelles applications intéressantes. Martinez *et al.* [196] observent une augmentation de la capacité moussante des protéines de tournesol hydrolysées (DH de 1,5 %) par rapport aux protéines non modifiées.

L'utilisation de protéines de tournesol dans l'alimentation humaine est limitée par la présence de composés phénoliques, principalement des acides chlorogénique et caféique. Ces composés affectent les qualités nutritives des protéines telles que la digestibilité et les propriétés organoleptiques. Ces dernières années, les chercheurs s'intéressent à une méthode d'extraction des protéines de tournesol avec un faible taux en composés phénoliques pour développer des applications alimentaires [272,273].

La valorisation de tourteaux de tournesol riches en protéines dans le domaine non alimentaire est encore à explorer. Trouver de nouveaux débouchés à ce co-produit pourrait permettre à la culture du tournesol, basée sur la production d'huile, de développer de nouveaux atouts. C'est la raison pour laquelle le développement de nouvelles applications en microencapsulation à base des protéines de tournesol nous semble particulièrement intéressant.

I.4. Conclusions

Ce chapitre bibliographique est composé de trois parties. La première, relative à la microencapsulation, consiste en une brève description des différents procédés et matériaux permettant d'obtenir des microparticules individualisées chargées en différentes matières actives, ainsi que des principaux matériaux enrobants.

La deuxième partie traite des protéines végétales et plus particulièrement des modifications chimiques et enzymatiques qui peuvent permettre de moduler certaines de leurs propriétés fonctionnelles. Les différentes études recensées ont démontré l'influence de modification telles que l'hydrolyse, l'acylation, la déamidation, la réticulation ou encore la cationisation sur la solubilité des protéines, leurs propriétés tensioactives et gélifiantes.

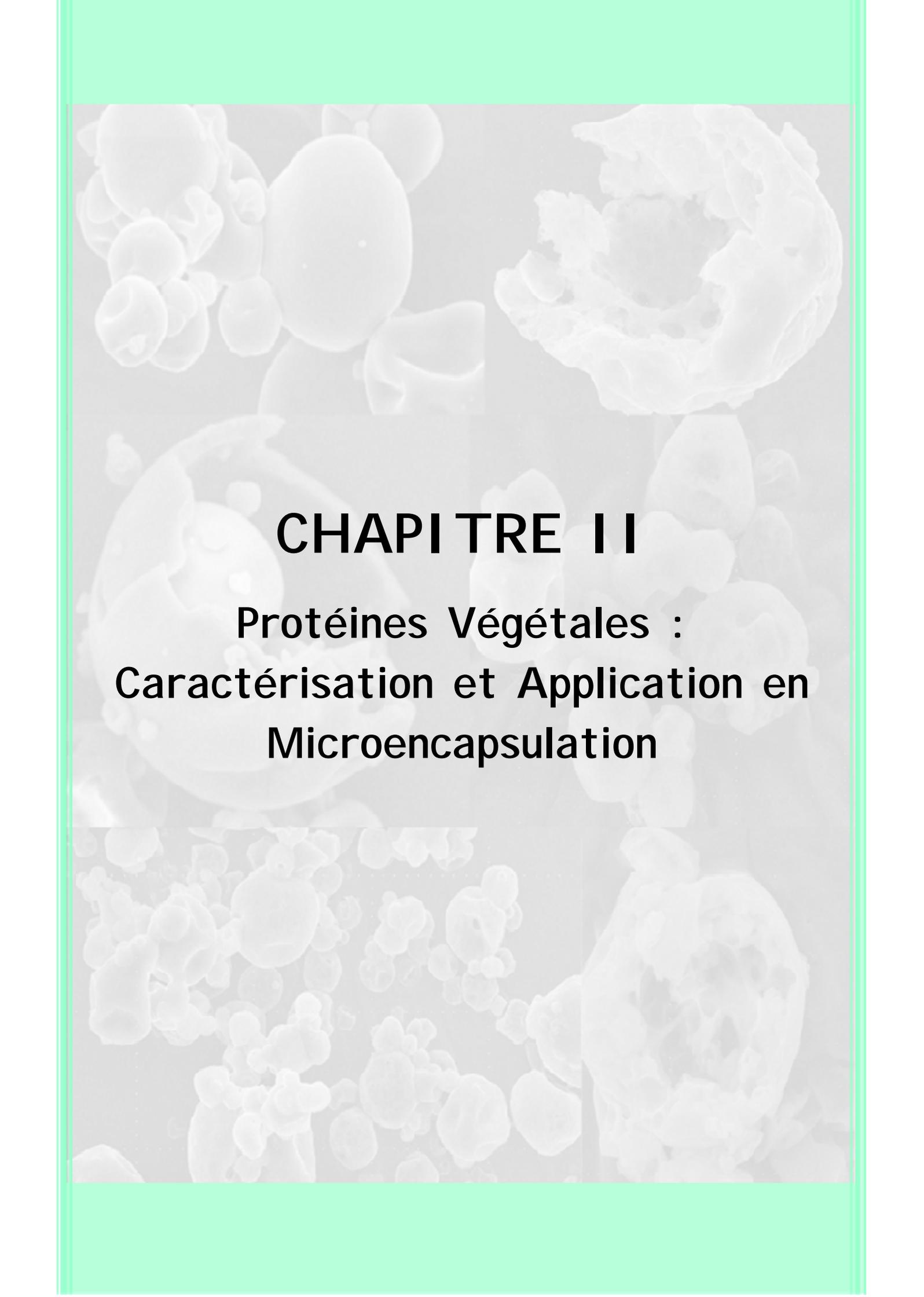
Dans la dernière partie, sont présentés les travaux traitant de l'utilisation de protéines végétales comme matériau enrobant en microencapsulation. Les protéines de soja, les protéines de pois et les protéines de céréales ont été particulièrement étudiées pour la microencapsulation de différentes matières actives hydrophiles et hydrophobes. Les techniques généralement utilisées pour la préparation des microparticules à base de protéines végétales sont l'atomisation et la coacervation.

Dans ce chapitre, il est également fait état d'autres protéines végétales, telles que les protéines de riz, les protéines d'avoine et les protéines de tournesol présentant des propriétés fonctionnelles, telles que les capacités émulsifiante et moussante, la solubilité dans les solutions aqueuses et les propriétés gélifiantes, adaptées à la microencapsulation.

Dans un contexte de développement durable, les protéines extraites de végétaux nous semblent être une alternative innovante et très intéressante aux polymères issus de la pétrochimie et aux protéines d'origine animale. Ces polymères naturels, hydrosolubles, biodégradables, biocompatibles et peu coûteux ont une grande diversité de propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, qui permettent leur utilisation en tant que des matériaux enrobants en microencapsulation. C'est la raison pour laquelle notre travail s'est basé sur l'étude de l'application des protéines issues du soja et du tournesol en microencapsulation.

Le procédé d'atomisation est choisi dans notre travail pour la préparation des microparticules car c'est une technique de microencapsulation simple à mettre en oeuvre, rapide et économique tant à l'échelle du laboratoire qu'à grande échelle.

La partie principale de ce travail consiste en la modification des protéines végétales par différentes voies afin d'évaluer l'influence de chaque modification sur le procédé de microencapsulation et sur les propriétés des microparticules.

The background of the slide is a grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing a variety of microcapsules. These particles are spherical and vary in size, with some appearing as smooth, uniform spheres and others as more irregular, textured, or porous structures. The particles are distributed across the frame, with some larger, more detailed views and many smaller ones in the background.

CHAPITRE II

Protéines Végétales : Caractérisation et Application en Microencapsulation

II.1. Introduction

Ce second chapitre est consacré à l'étude des protéines végétales en microencapsulation. D'après la revue bibliographique présentée dans le Chapitre I, deux protéines ont été choisies pour notre étude : les protéines extraites des graines de soja et de tournesol.

Les protéines de soja possèdent des propriétés fonctionnelles intéressantes, telles que des capacités émulsifiante et moussante, une bonne solubilité et des propriétés gélifiantes [274-276]. Ces protéines sont actuellement utilisées en microencapsulation, en particulier dans le domaine de l'alimentation. Dans cette partie du travail, l'extrait protéique de soja nous servira de protéine de référence.

Les protéines de tournesol sont également connues pour leurs nombreuses propriétés fonctionnelles, comparables à celles des protéines de soja [19,270,271]. Mais, au jour d'aujourd'hui, les tourteaux de tournesol (et par conséquent les protéines) sont largement utilisés en alimentation animale. Aucune autre application industrielle de ces isolats protéiques n'est aujourd'hui connue. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à cette protéine dans une application en microencapsulation.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les propriétés des deux extraits protéiques végétaux choisis. En effet, la composition, les différentes structures et groupes fonctionnels présents dans les extraits protéiques joueront un rôle important dans leur comportement en microencapsulation. La solubilité, la composition en différents constituants et en acides aminés, ainsi que le fractionnement par la méthode d'Osborne et la technique AsFIFFF sont évalués.

Dans une seconde partie, les extraits protéiques de soja et de tournesol sont étudiés comme matériaux enrobants en microencapsulation par atomisation. L'influence de différents paramètres, tels que la pression d'homogénéisation, le ratio matière enrobante/matière active et la concentration de la solution protéique, sur les propriétés des émulsions, des microparticules et sur l'efficacité du procédé d'atomisation est étudiée.

II.2. Généralités sur les protéines de soja et de tournesol

Le soja ou *Glycine max* (L.) est une plante herbacée annuelle de la famille des Fabacées. Elle est cultivée en Asie depuis plusieurs milliers d'années, mais ce n'est qu'à partir du 18^{ème} siècle qu'elle a été connue en Europe, en Amérique et en Afrique. Le soja est largement cultivé pour ses graines oléo-protéagineuses riches en huile et en protéines. Aujourd'hui, l'huile de soja (avec l'huile de palme) est l'une des huiles les plus consommées au monde, loin devant les huiles de colza, de tournesol et d'olive. La matière farineuse obtenue après l'extraction de l'huile est principalement employée pour l'alimentation animale. 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.

La production mondiale des graines de soja augmente de 4,6 % chaque année depuis 1961. Elle a atteint 258,4 millions de tonnes en 2010 [277,278]. Les producteurs les plus importants (fournisseurs de 85-90 % de toute la production mondiale) sont les Etats-Unis, l'Amérique Latine et la Chine. En France, le soja est peu cultivé (environ 150 000 tonnes par an) et est utilisé majoritairement pour l'alimentation animale.

Les graines de soja sont constituées d'environ 35-45 % de protéines, 15-22 % d'huile, 10-18 % de polysaccharides, 8-15 % de fibres et de matières minérales [279-281]. La farine récupérée après extraction de l'huile est très riche en matière protéique. Elle peut être facilement purifiée en quelques étapes (solubilisation → séparation des fibres par décantation → précipitation à pH acide → lavage → neutralisation → atomisation) afin d'obtenir un extrait protéique. Généralement, l'extrait protéique produit a une pureté de l'ordre de 80-90 %.

Le tournesol ou *Helianthus annuus* (L.) est une plante annuelle qui appartient à la plus grande famille des plantes fleuries : Astéracées. Originaire d'Amérique centrale, le tournesol est cultivé depuis plus de 3000 ans. C'est au 16^{ème} siècle que cette plante est introduite en Europe et utilisée surtout pour la décoration. Au début de 19^{ème} siècle, les habitants de la Russie ont commencé à utiliser l'huile extraite à partir de cet oléo-protéagineux en alimentation.

En 2010, la production mondiale des graines de tournesol était de 31,5 millions de tonnes. Les pays producteurs sont l'Ukraine (22,5 % de la production mondiale), les pays de l'Union Européenne (21,9 %), la Russie (17,7 %) et l'Argentine (10,8 %) [282]. L'huile extraite à partir des graines de tournesol est l'huile végétale la plus consommée en Europe après celle de colza. Les tourteaux obtenus après extraction de la matière lipidique sont essentiellement destinés à l'alimentation animale. Ils représentent environ 4 % des tourteaux utilisés dans le monde et sont largement dominés par les farines de soja (60 % d'utilisation mondiale des tourteaux végétaux). La valorisation des tourteaux de tournesol dans les produits de consommation humaine est

actuellement empêchée par la présence des composés phénoliques, notamment l'acide chlorogénique et l'acide caféique. Ces composés influencent la détérioration des propriétés fonctionnelles des protéines extraites à partir des tourteaux et leur apportent une couleur foncée. Néanmoins, des études publiées récemment présentent des procédés d'extraction permettant l'obtention de protéines de bonne qualité avec un faible taux en composés phénoliques [272,273].

Le pressage de la graine de tournesol conduit à la production de l'huile (40-45 % de la graine) et de tourteaux. Ces derniers sont constitués majoritairement de protéines (35-45 %), polysaccharides, fibres et matières minérales. La graine de tournesol est moins riche en protéines que celle de soja, mais contient plus de lipides, alors que les autres composés minoritaires sont présents dans les deux végétaux en quantité similaire.

Malgré une demande croissante en huiles végétales, la filière du tournesol, produisant à l'échelle industrielle uniquement de l'huile, est fragilisée par la concurrence d'autres cultures oléagineuses, notamment le colza et le soja. Pourtant, le développement, la valorisation des coproduits d'extraction d'huile de tournesol et leur application dans la fabrication de produits divers permettrait à cette culture de rester compétitive vis-à-vis des autres espèces.

II.3. Caractérisation des extraits protéiques

Dans tout ce qui suit, les échantillons préparés avec l'extrait protéique de soja seront nommés PS et ceux préparés avec l'extrait protéique de tournesol – PT.

II.3.1. Constituants des extraits protéiques

Les compositions des extraits protéiques de soja et de tournesol sont présentées dans le [Tableau II - 1](#). Les teneurs en différents constituants ont été déterminées par les méthodes décrites dans le [Paragraphe IV.2.1.1](#). Les résultats montrent une différence de concentration protéique de presque 10 points entre les deux extraits (82,3 % pour l'extrait de soja et 73,5 % pour l'extrait de tournesol).

Cette différence est probablement liée à la composition des graines initiales, mais aussi et surtout au mode d'extraction et de purification des extraits protéiques. L'isolat protéique de soja étudié dans ce projet a été acheté dans la grande distribution (Lustrel Laboratoires, Saint Jean de Vedas, France), alors que l'extrait protéique de tournesol a été produit sur commande par le Centre de Valorisation des Glucides (CVG, Dury, France) par un procédé détaillé dans l'[Annexe I](#). La différence de concentration en protéines entre les deux extraits se traduit également par une

différence de taux des polysaccharides : 3,5 % pour l'extrait protéique de soja contre 15,9 % pour l'extrait protéique de tournesol.

Tableau II - 1. Différents constituants des extraits protéiques de soja et de tournesol.

Constituant	Teneur, % w/w	
	PS	PT
Protéines	82,3	73,5
Humidité	8,0	6,0
Lipides	1,3	1,6
Matière minérale	5,0	3,0
Polysaccharides	3,5	15,9

Dans le cas de l'extrait protéique de tournesol, il a été démontré qu'après un traitement alcalin des tourteaux, les polysaccharides majoritairement extraits sont des pectines et des hémicelluloses [283]. La présence de ces composés dans les extraits protéiques n'est pas gênante. En effet, les polysaccharides peuvent avoir de multiples actions sur la microencapsulation : stabilisation de l'émulsion, influence sur la formation du film de l'enrobage, sur la taille des microparticules et sur le taux de rétention de matière active [68,223,224,226,229,250].

Les extraits protéiques contiennent un faible taux de lipides (1,3-1,6 %), dû à la présence de lipides résiduels adsorbés sur les parties hydrophobes des protéines. Le taux d'humidité de 6 % à 8 % provient de molécules d'eau emprisonnées dans le réseau de biopolymère et liées plus particulièrement aux parties hydrophiles de la protéine. Enfin, les composés minéraux présents en des taux allant de 3 % à 5 % sont majoritairement des sels d'azote, de phosphore, de potassium, de calcium et de magnésium [284,285].

II.3.2. Composition en acides aminés des extraits protéiques

La composition en acides aminés des deux extraits protéiques a été déterminée par chromatographie ionique après une hydrolyse acide totale selon la méthode décrite dans le [Paragraphe IV.2.1.4](#). Cette analyse nous permet d'identifier et de quantifier les acides aminés présents dans l'extrait protéique. Au cours de l'hydrolyse acide, le tryptophane est détruit et transformé en alanine et acétoacétate [286], le taux d'alanine mesuré par cette technique est donc surestimé. Les compositions en acides aminés pour les extraits protéiques de soja et de tournesol sont présentées dans la [Figure II - 1](#).

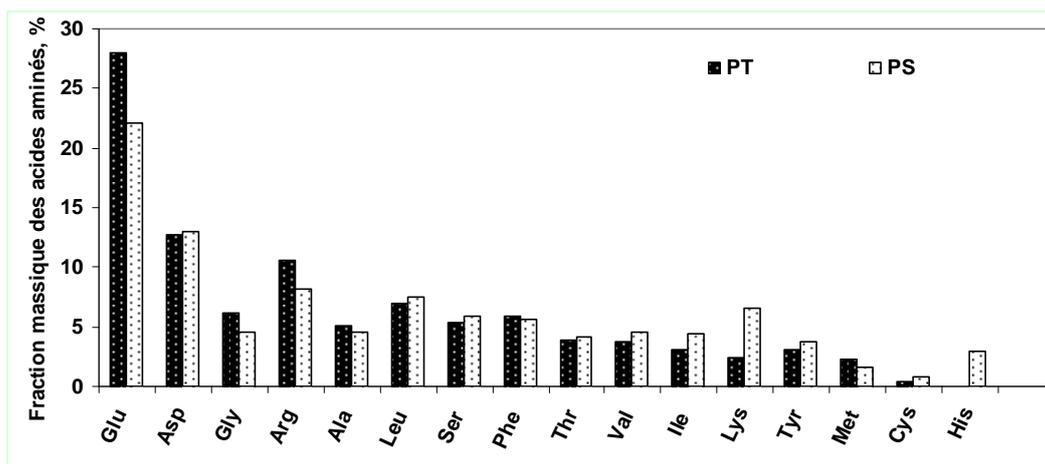


Figure II - 1. Composition en acides aminés des extraits protéiques de soja et de tournesol.

Comme dans toutes les protéines végétales, les acides glutamique et aspartique sont majoritaires. Les deux extraits protéiques présentent des aminogrammes assez proches, mais il est important de noter que la fraction de lysine est plus importante dans l'extrait protéique de soja que dans celui de tournesol. Le taux élevé de lysine est une caractéristique connue des protéines légumineuses dont fait partie le soja [287].

Les résultats obtenus sur la composition en acides aminés sont comparables avec ceux décrits dans la littérature (Tableau II - 2). Les différences rencontrées peuvent s'expliquer par l'origine et les variétés des végétaux utilisés, ainsi que par les différents procédés d'extraction mis en œuvre.

Les deux extraits protéiques étudiés montrent des compositions en acides aminés relativement proches. Cela peut expliquer la similarité de leurs propriétés physico-chimiques, notamment leurs capacités émulsifiante et moussante, leurs propriétés gélifiantes et leur solubilité, observées par de nombreux auteurs dans la littérature [19].

La seule différence significative est le taux de lysine, près de 3 fois plus élevé pour le soja que pour le tournesol (6,5 g/100 g et 2,5 g/100 g respectivement). Or la lysine comporte une fonction amine, qui peut être le siège de différentes réactions chimiques, notamment des réactions de greffage ou de réticulation, comme il a été décrit dans le [Paragraphe I.2.4.2](#). Cette différence de concentration en lysine entre les extraits protéiques de soja et de tournesol pourra donc expliquer une différence de comportement de ces deux protéines lors de leurs modifications comme il est détaillé dans le [Paragraphe III.3.1.1](#).

Tableau II - 2. Fractions en acides aminés des extraits protéiques de soja et de tournesol.

Acide aminé	Fraction massique, g/100 g de protéines					
	PS			PT		
	Résultats expérimentaux	Réf. [288]	Réf. [289]	Résultats expérimentaux	Réf. [290]	Réf. [291]
Acide glutamique	22,1	18,4	19,0	28,0	23,2	26,3
Acide aspartique	13,0	10,4	11,5	12,8	10,3	10,3
Glycine	4,6	3,4	4,1	6,2	6,0	7,3
Arginine	8,2	7,6	6,5	10,5	7,9	11,4
Alanine	4,5	3,6	4,2	5,2	4,8	5,6
Leucine	7,5	6,7	8,1	7,0	6,8	8,6
Sérine	5,8	4,6	5,2	5,4	4,6	6,1
Phénylalanine	5,6	4,5	5,2	6,0	5,4	6,7
Thréonine	4,2	3,7	3,8	3,9	4,1	5,0
Valine	4,5	4,6	5,0	3,8	5,1	5,9
Isoleucine	4,4	4,4	4,8	3,0	4,2	5,5
Lysine	6,5	6,0	6,2	2,5	3,5	3,7
Tyrosine	3,8	3,5	3,8	3,0	3,6	2,5
Méthionine	1,6	1,4	1,3	2,3	2,2	0,6
Cystéine	0,9	1,3	1,3	0,5	0,8	0,6
Histidine	2,9	2,2	2,6	0,1	2,1	3,2
Proline	-	5,3	5,1	-	5,3	6,7
Tryptophane	-	1,2	1,3	-	-	0,5

II.3.3. Fractionnement des extraits protéiques (selon la méthode d'Osborne)

Cette classification des protéines végétales établie par Osborne [151], permet de classer les protéines en quatre familles selon leur solubilité dans différents solvants à température ambiante (Tableau II - 3). On appelle albumines les protéines végétales solubles dans l'eau, globulines les protéines solubles dans les solutions salines à faible concentration, glutélines les protéines solubles dans un milieu basique et enfin prolamines les protéines solubles dans les solutions alcooliques. Cette classification s'applique aux protéines de graines à l'état natif ou aux farines deshuilées.

Tableau II - 3. Classification des protéines selon la méthode d'Osborne ; S – soluble, I – insoluble.

Solvant	Fraction protéique			
	Albumines	Globulines	Glutelines	Prolamines
Eau	S	-	-	-
Solutions salines diluées	S	S	-	-
Base diluée	-	-	S	-
Ethanol 80%	-	-	I	S
Ethanol absolu	-	-	I	I

Le fractionnement des extraits protéiques de soja et de tournesol par l'extraction successive dans différents solvants a été réalisé (Paragraphe IV.2.1.3) afin de spécifier et expliquer au mieux les propriétés fonctionnelles de ces polymères végétaux. Les résultats de fractionnement de ces protéines selon la méthode d'Osborne sont présentés dans le Tableau II - 4. Les deux extraits protéiques montrent une composition en différentes fractions assez proche. Dans les deux cas, la fraction majoritaire est celle soluble en milieu alcalin : 67,6 % dans l'extrait protéique de soja et 62,8 % dans celui de tournesol. Les fractions solubles en milieu aqueux sont également présentes en quantité importante, notamment dans l'extrait protéique de tournesol (35,3 % contre 24,8 % dans l'extrait protéique de soja). Les fractions en protéines solubles dans la solution saline et dans la solution hydro-alcoolique sont par contre relativement faibles : 3,5 % et 3,6 % (extrait protéique de soja et de tournesol respectivement) pour les globulines, et 6,1 % et 1,0 % (extrait protéique de soja et de tournesol respectivement) pour les prolamines.

Tableau II - 4. Résultats de fractionnement selon la méthode d'Osborne des extraits protéiques de soja et de tournesol.

Solvant d'extraction	Pourcentage de la fraction, w/w	
	PS	PT
H ₂ O pH=6,5	24,8	35,3
NaCl 1M	3,5	3,6
H ₂ O pH=12	67,6	62,8
EtOH 70 %	6,1	1,0

Ces résultats sont à corrélés avec l'hydrosolubilité des extraits protéiques étudiés. En effet, la forte proportion en protéines solubles en milieu basique, qui correspondent à des globulines rendues insolubles par le traitement thermique (par exemple l'extraction d'huile) [292], permet d'expliquer la bonne hydrosolubilité des deux extraits à pH alcalin. De même, la fraction en protéines solubles à pH 6,5 de l'extrait protéique de tournesol, significativement plus élevée que celle de l'extrait protéique de soja (35,3 % contre 24,8 % respectivement), justifie sa meilleure

solubilité à des pHs neutre et faiblement basiques, comme le montrent les courbes de solubilité présentées dans le paragraphe suivant.

II.3.4. Solubilité des extraits protéiques

Les profils de solubilité en fonction du pH des deux extraits protéiques ont été réalisés à température ambiante ainsi qu'à 70 °C (Figure II - 2). En effet, la solubilité de ces extraits protéiques à température ambiante est relativement faible pour des pHs inférieurs à 10 (voire 12 pour l'extrait protéique de soja). Par exemple, à pH 10, la solubilité de l'extrait protéique de soja à température ambiante est seulement de 29 %. Cette valeur est insuffisante pour envisager une microencapsulation efficace, qui nécessite une matière enrobante dissoute. Nous avons choisi de nous placer à 70 °C, car il a été démontré dans la littérature, que les fractions de globulines de protéines végétales, qui sont les fractions majoritaires, sont relativement résistantes à la dénaturation thermique [212]. Les auteurs affirment que la température de dénaturation de la fraction des globulines 7S est de 79 °C et celle des globulines 11S est de 90 °C. En dessous de ces températures, les globulines ne sont pas dénaturées et gardent leur structure initiale [293].

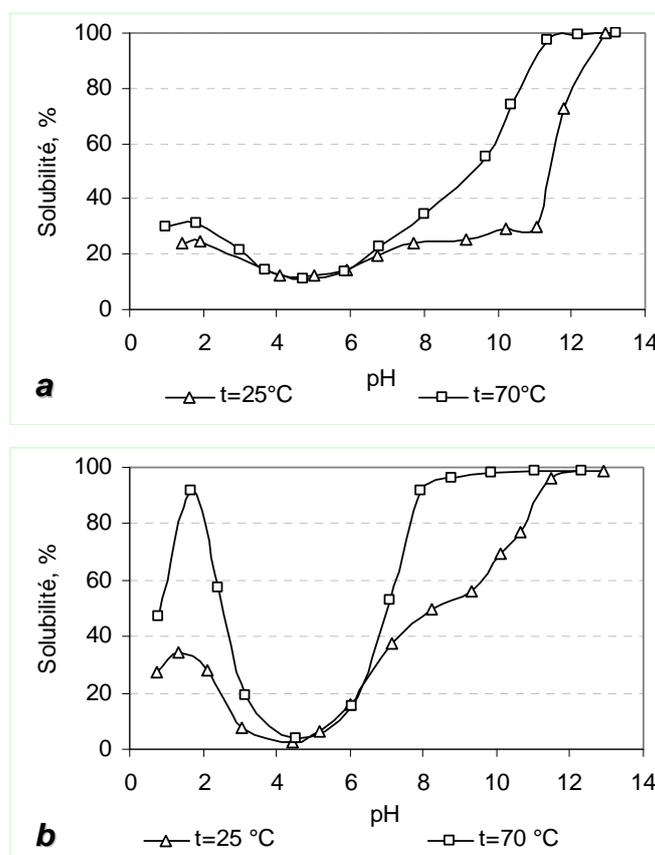


Figure II - 2. Courbes de solubilité des extraits protéiques (a) de soja et (b) de tournesol.

Les solutions protéiques de soja et de tournesol à différents pHs ont été concentrées à 5 % w/w et 3 % w/w respectivement (Paragraphe IV.4.2.1.2).

La solubilité des extraits protéiques est minimale à leur point isoélectrique c'est-à-dire au pH auquel le nombre de charges positives est égal à celui de charges négatives. Ce pH est de 4,7-5,0 pour l'extrait protéique de soja et de 4,4-4,5 pour celui de tournesol.

A pH acide, inférieur au point isoélectrique, la solubilité de l'extrait protéique de soja reste faible. Concernant la solubilité de l'extrait protéique de tournesol, on observe un maximum autour de pH 2, vraisemblablement dû au fort taux d'acide glutamique, qui entraîne une augmentation de la polarité des protéines à pH acide. A pH plus acide, autour de 1, une diminution de la solubilité est observée. Ce comportement n'est pas expliqué dans la littérature, car les auteurs n'ont pas étudié la solubilité des protéines en dessous de pH 2. Nous pouvons supposer qu'à pH fortement acide, une agrégation et une précipitation partielle des chaînes protéiques peuvent se produire, entraînant une diminution de leur solubilité.

A pH alcalin, la solubilité des extraits protéiques est améliorée, notamment à 70 °C (proche de 100 % à pH>10 pour l'extrait protéique de soja et à pH>8 pour l'extrait protéique de tournesol).

D'après Fennema [294], à pH alcalin, les molécules de protéines sont chargées négativement (COO⁻) sur la surface, provoquant des répulsions entre les chaînes. Cela se traduit par la diminution des interactions protéines/protéines et l'augmentation de celles protéines/solvant. De plus, l'énergie apportée par le chauffage permet d'augmenter la mobilité des chaînes de protéines dans la solution, ainsi que leur solubilité.

En comparant les profils de solubilité des deux extraits protéiques étudiés, on constate que quelle que soit la température, l'extrait protéique de tournesol possède une meilleure solubilité aux pHs très acides (inférieurs à 3) et basiques (supérieurs à 7). Ce comportement peut s'expliquer par la présence d'une fraction plus importante des polysaccharides dans l'extrait protéique de tournesol (15,9 % par rapport à 3,5 % dans l'extrait protéique de soja, [Tableau II - 1](#)). En effet, Guo et Narsimhan [295] ont démontré que la solubilité des extraits protéiques est améliorée par l'addition de polysaccharides grâce aux interactions protéine/polysaccharide. D'autre part, l'extrait protéique de tournesol contient une fraction plus importante de protéines hydrosolubles à pH neutre (35,3 % par rapport à 24,8 % pour l'extrait protéique de soja, [Tableau II - 4](#)), ce qui peut également expliquer l'augmentation de la solubilité.

Le comportement de l'extrait protéique de soja en solution observé dans notre étude est similaire à celui de protéines de soja commerciales ([Figure II - 3a](#)) [296]. Les courbes de solubilité obtenues par les auteurs démontrent qu'à 25 °C, le point isoélectrique de la majorité des échantillons analysés se situe à pH 4-5. La solubilité maximale est observée à pH 11, variant

pour les différentes protéines de 22 % à 95 %. A pH acide, les protéines de soja sont peu solubles. De plus, une augmentation de la solubilité avec l'augmentation de la température est observée, comme nous l'avons également montré.

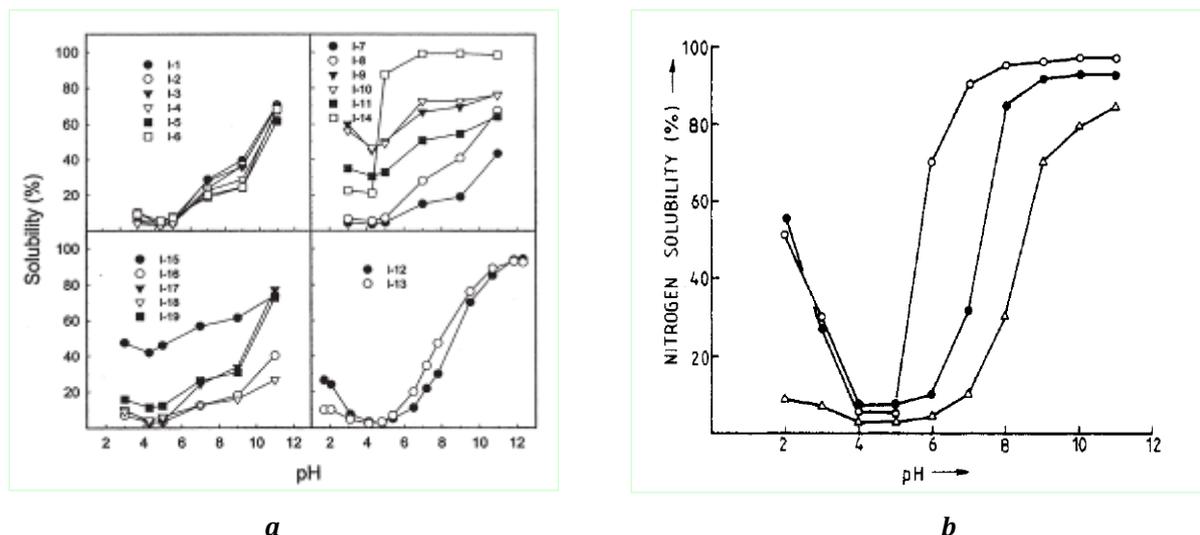


Figure II - 3. (a) Solubilité de protéines de soja commerciales déterminée à 25 °C [296]; (b) solubilité de protéines de tournesol isolées : (•) l'isolat alcalin, (o) l'isolat aqueux et (Δ) l'isolat d'une solution saline [297].

En ce qui concerne l'extrait protéique de tournesol, Kabirullah et Wills [297] observent un point isoélectrique du même ordre que celui obtenu pour l'extrait protéique étudié (autour de pH 4-5) (Figure II - 3b). La courbe de la solubilité d'isolat alcalin est similaire à celle obtenue pour notre extrait protéique avec une solubilité importante aux pHs supérieurs à 7 et à pH 2.

Dans le procédé de microencapsulation qui sera utilisé dans notre étude (atomisation), il est essentiel que les chaînes protéiques formant le matériau enrobant soient bien solubilisées. En effet, si les chaînes protéiques sont bien déployées, elles enrobent la matière active de manière plus efficace et permettent une meilleure protection. D'après les courbes de solubilité obtenues, nous avons donc fait le choix de nous placer pour les essais de microencapsulation dans les conditions suivantes :

- pour l'extrait protéique de soja – 70 °C, pH 10,0-10,5 ;
- pour l'extrait protéique de tournesol – 70 °C, pH 8,5-9,0.

II.3.5. Fractionnement des extraits protéiques par la technique AsFIFFF

Les méthodes de Field-Flow Fractionation ou Fractionnement par Flux Force (FFF) sont des techniques "chromatographiques" récentes, dédiées principalement au fractionnement des macromolécules. Décrites pour la première fois dans les années 1960 par Giddings [298], les

techniques de fractionnement par flux-force sont basées sur l'action simultanée de l'écoulement d'un liquide dans un canal, sans phase stationnaire. L'absence de cette dernière limite les problèmes d'absorption des molécules et les forces de cisaillement. Le champ d'application de ces techniques est très large. Elles permettent en effet de fractionner des molécules présentant des diamètres hydrodynamiques de l'ordre du nanomètre tout comme des particules de plus de 100 μm . Différentes techniques de fractionnement sont aujourd'hui utilisées, qui diffèrent selon le champ externe appliqué.

La technique AsFFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation) est la technique la plus universelle, dans laquelle le champ de force appliqué est un flux croisé perpendiculaire au flux d'élution. Elle permet de séparer des macromolécules de petite taille (de 1 nm à 2 nm) jusqu'aux particules de 100 μm de diamètre. Les macromolécules simples et les agrégats complexes peuvent être analysés par cette méthode pour des applications pharmaceutiques, médicales, biologiques, ainsi que pour des agromatériaux et des matériaux polymères [299]. La séparation par AsFFFF est effectuée selon le rayon hydrodynamique des particules. En comparaison avec la méthode d'exclusion stérique, cette technique assure une adsorption minimale des particules et une surface de contact limitée en raison de l'absence de phase stationnaire. Dans le mode de fractionnement dit "normal", le temps de rétention est fonction du coefficient de diffusion des macromolécules (donc leur rayon hydrodynamique). Par conséquent, les macromolécules de petite taille sont éluées plus rapidement que celles de grande taille (Annexe VI), contrairement au mode de fractionnement en Chromatographie d'Exclusion Stérique.

Les fractogrammes présentés sur la Figure II - 4 illustrent le fractionnement des extraits protéiques de soja et de tournesol par la technique AsFFFF (les conditions expérimentales sont détaillées dans le Paragraphe IV.2.4.3). Les échantillons analysés sont caractérisés selon trois populations (Annexe VI, Figure A-7) :

- P1 – population de taille inférieure au seuil de coupure de la membrane (10 kDa) soit inférieure à environ 1 nm (population non analysée) ;
- P2 – population de taille comprise entre 1 nm et 350 nm quantifiée et fractionnée ;
- P3 – population de taille supérieure à 350 nm quantifiée et non fractionnée.

Dans le cas de l'extrait protéique de tournesol, on observe une fraction largement majoritaire (entre 13 min et 15 min) correspondant à des chaînes macromoléculaires ayant un rayon hydrodynamique compris entre 20 nm et 60 nm. Pour l'extrait protéique de soja, cette population est également présente, mais un pic supplémentaire est observé (entre 17 min et 20 min). Ce dernier représente la fraction majoritaire des chaînes protéiques et correspond à des macromolécules ayant un rayon hydrodynamique compris entre 130 nm et 180 nm. Cette

population n'est pas observée dans l'extrait protéique de tournesol (la taille maximale des particules fractionnées est de 90-100 nm).

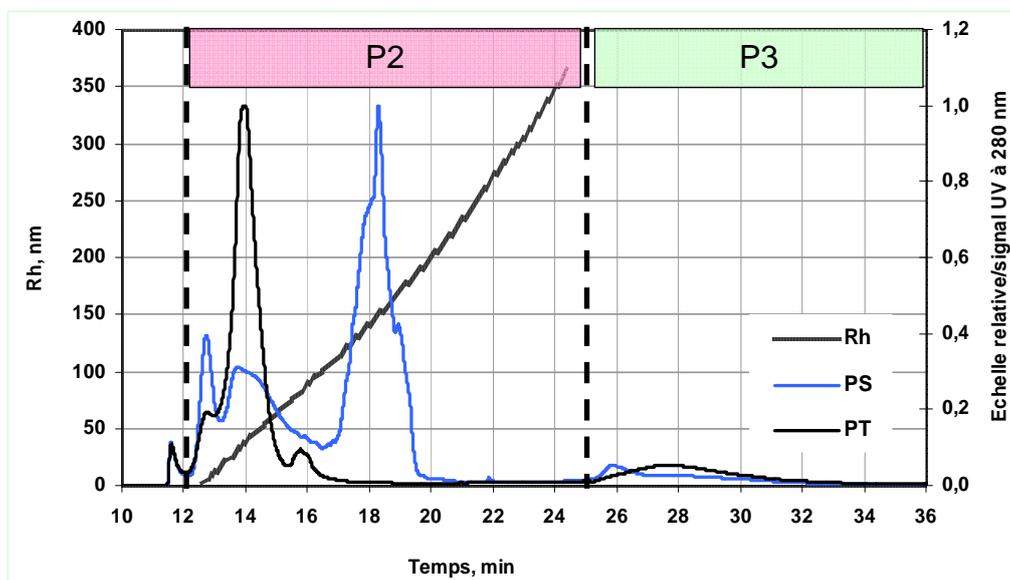


Figure II - 4. Fractogrammes AsFIFFF des extraits protéiques de soja et de tournesol (méthode II, Paragraphe IV.2.4.3, Annexe VI).

La population observée après un temps d'élution de 25 min (P3), pour les deux extraits, est essentiellement attribuée à des agrégats de grande taille.

Il semble donc d'après ces analyses que les chaînes macromoléculaires de l'extrait protéique de soja aient un rayon hydrodynamique plus grand que celles de l'extrait protéique de tournesol.

Les molécules de petite taille (P1) ne sont pas fractionnées. Il est toutefois possible de déterminer leur proportion (en utilisant une courbe de calibration, Annexe VI). Pour les échantillons étudiés dans notre cas, la fraction P1 est de 8,3 % pour l'extrait protéique de soja et de 20,5 % pour celui de tournesol. Ce résultat confirme que la taille moyenne des macromolécules dans l'extrait protéique de tournesol est inférieure à celle des macromolécules de l'extrait protéique de soja.

II.3.6. Morphologie et taille des extraits protéiques

La morphologie des particules des extraits protéiques de soja et de tournesol a été étudiée par microscopie électronique à balayage (MEB). Pour mieux examiner la morphologie interne des particules, les échantillons ont été broyés dans de l'azote liquide avant l'analyse MEB. Les images des particules d'extraits protéiques natifs sont présentées sur la Figure II - 5.

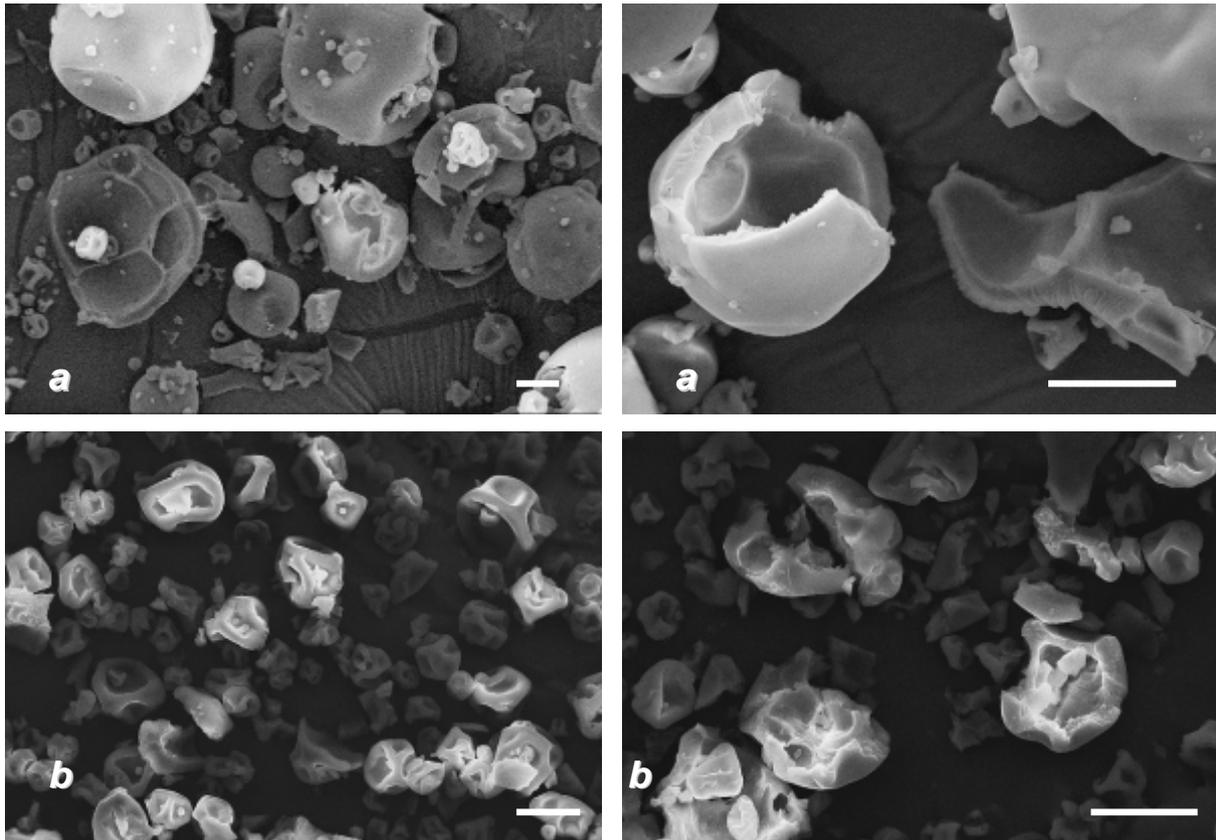


Figure II - 5. Images MEB de la morphologie des extraits protéiques natifs ; (a) PS et (b) PT. Barre d'échelle - 10 µm.

L'étape finale dans la production des extraits protéiques est un séchage par atomisation. Cette étape est à l'origine de la structure sphérique des particules des extraits protéiques natifs, car l'évaporation d'eau pendant l'atomisation a lieu à partir de gouttelettes dispersées. Grâce à leurs propriétés tensioactives, les chaînes protéiques se placent à la surface air/eau dans ces gouttelettes lors de l'atomisation, ce qui explique que les particules soient creuses et aient une enveloppe relativement poreuse. Leur aspect fripé est lui dû à l'effet du vide généré lors de l'observation au MEB.

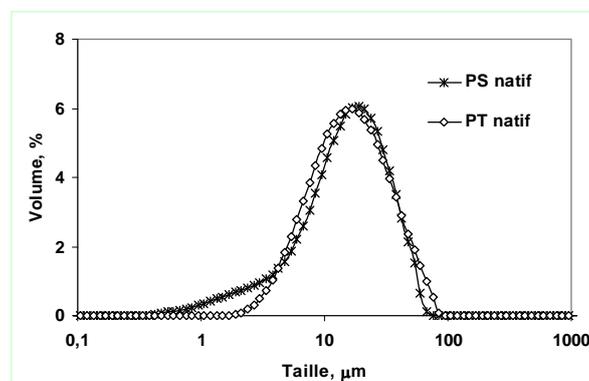


Figure II - 6. Distributions de taille des microparticules dans les extraits protéiques de soja et de tournesol natifs.

D'après les images obtenues par MEB, les particules de l'extrait protéique de soja ont des tailles supérieures à celles de l'extrait protéique de tournesol (5-50 μm et 2-20 μm respectivement). Néanmoins, les distributions granulométriques présentées sur la [Figure II - 6](#) sont relativement proches pour les deux extraits protéiques avec un diamètre moyen de 18,2 μm et de 20,0 μm pour l'extrait protéique de soja et de tournesol respectivement.

II.4. Atomisation des solutions protéiques : optimisation du procédé

Une première étude d'atomisation sur les solutions protéiques seules (sans matière active) a été réalisée afin d'optimiser les conditions d'atomisation et de définir le mode opératoire qui sera utilisé pour les essais de microencapsulation.

II.4.1. Etape de préparation des solutions protéiques

Les extraits protéiques sont mis en solution suivant le mode opératoire présenté dans le [Paragraphe VI.2.3.1](#). Différentes concentrations ont été testées afin de choisir la concentration optimale en isolat protéique qui sera utilisée par la suite. Une concentration trop faible n'est pas pertinente d'un point de vue application industrielle, mais une concentration trop élevée entraîne une augmentation significative de la viscosité de la solution. Or, une viscosité trop élevée de la solution à atomiser se traduit par un rendement d'atomisation réduit, mais aussi par des efficacités d'encapsulation moindres [145,300,301].

L'influence sur la viscosité des solutions protéiques d'une étape d'homogénéisation sous haute pression (50 MPa) après la mise en solution des extraits protéiques a également été étudiée. Les résultats sont rassemblés dans le [Tableau II - 5](#). Lors de la solubilisation des extraits protéiques, une augmentation drastique de la viscosité avec la concentration est observée à partir de 10 % w/w pour l'extrait protéique de soja, et dès 8 % w/w pour l'extrait protéique de tournesol. Nous observons également une diminution de la viscosité des solutions après l'étape d'homogénéisation, quel que soit l'extrait protéique, qui est d'autant plus forte que la viscosité initiale est élevée.

Tableau II - 5. Influence de l'homogénéisation sous haute pression (50 MPa) sur la viscosité des solutions protéiques.

Concentration, % w/w	Viscosité , mPa*s			
	PS		PT	
	Avant	Après	Avant	Après
2	2	2	2	2
4	5	4	4	3
6	14	10	9	7
8	44	15	250	9
10	340	28	-	-

La différence en viscosité des solutions protéiques concentrées à 8 % w/w avant homogénéisation peut être liée au pH utilisé pour la préparation des solutions. En effet, pour atteindre le maximum de dissolution des protéines (selon les profils de solubilité, [Figure II - 2](#)), les solutions protéiques de soja ont été préparées à pH 10,0-10,5 et celles de tournesol à pH 8,5-9,0. A pH fortement basique (10,0-10,5), l'accumulation des charges négatives (COO⁻) sur les protéines de soja entraîne une répulsion de chaînes plus importante. Ainsi, la densité du réseau protéique de soja dans la solution est moindre, ce qui explique la plus faible viscosité.

L'influence de la pression d'homogénéisation sur les différents polymères en solution a été étudiée dans la littérature. Un comportement similaire à nos observations, c'est-à-dire la diminution de la viscosité avec l'homogénéisation sous haute pression, est décrit pour la carbométhylcellulose, la gomme de lin, la gomme de xantane, l'alginate et le carraghénane [302]. L'avis des auteurs sur l'origine de ce phénomène est partagé. Ils observent une diminution de la masse molaire de la méthylcellulose [303] ou de la pectine [304] après une homogénéisation à des pressions très élevées (350 MPa et 124 MPa respectivement). Ce comportement est expliqué par les ruptures des liaisons covalentes dû au fait de la forte énergie apportée par l'étape d'homogénéisation. D'un autre côté, pendant l'homogénéisation des protéines en solution, la diminution de la viscosité est associée à la désagrégation et la dissociation des macromolécules, le déploiement des chaînes, le changement de la conformation moléculaire et des propriétés interfaciales [238,305]. Il a été démontré que ce traitement a une influence destructive sur la structure quaternaire et tertiaire des protéines, et un effet mineur sur les changements dans la structure secondaire [306].

Dans le cas des extraits protéiques étudiés, l'explication de la chute de viscosité après l'homogénéisation à haute pression (50 MPa) qui nous semble la plus convaincante est la suivante : la force mécanique appliquée génère la rupture des liaisons hydrogènes intermoléculaires, des forces attractives électrostatiques et de Van der Waals entre les protéines

et les molécules d'eau, ou entre les deux chaînes des protéines. Ainsi, le réseau de polymère formé dans la solution se brise, en laissant les molécules d'eau circuler plus librement entre les chaînes. De plus, sous cette action mécanique, les chaînes protéiques subissent un déploiement grâce auquel elles deviennent plus mobiles.

Ce phénomène est observé pour des solutions aux concentrations supérieures à 4 % w/w. Dans le cas des faibles concentrations, l'homogénéisation n'a pas d'influence sur la viscosité des solutions protéiques, car ces solutions sont initialement peu visqueuses. Cela confirme l'explication donnée précédemment pour l'action de l'homogénéisation sur le réseau protéique. Aux faibles concentrations, l'association des protéines est moins importante et la création d'un réseau intermoléculaire est moins probable.

Afin de vérifier que les chaînes protéiques ne sont pas rompues pendant l'étape d'homogénéisation, les extraits protéiques de tournesol natif et homogénéisé à 50 MPa sont analysés par la technique AsFIFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, [Paragraphe IV.2.4.3](#) et [Annexe VI](#)). Les fractogrammes obtenus sont présentés sur la [Figure II - 7](#). Ces résultats nous permettent de constater que les profils des extraits protéiques de tournesol avant et après homogénéisation sont comparables. On observe cependant une quantité plus importante de molécules de petite taille, entre 15 min et 17 min, dans les protéines homogénéisées.

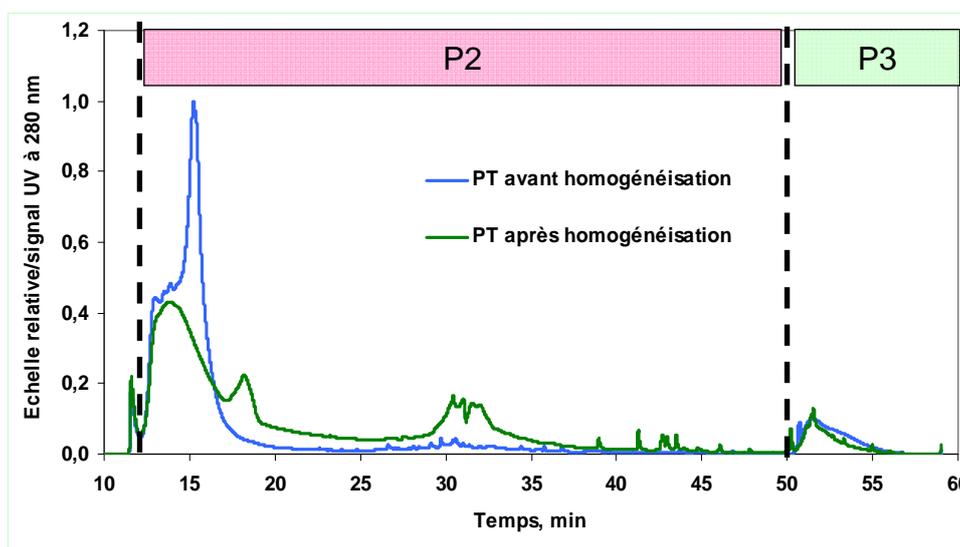


Figure II - 7. Fractogrammes AsFIFFF des extraits protéiques de tournesol avant et après homogénéisation sous haute pression (50 MPa ; méthode I, [Paragraphe IV.2.4.3](#), [Annexe VI](#)).

D'autre part, le taux de petites particules (fraction P1 déterminée comme décrit dans [l'Annexe VI](#)) est de 29 % pour l'extrait protéique avant homogénéisation et de seulement 16 %

après homogénéisation. Cela confirme que les chaînes macromoléculaires n'ont pas été rompues pendant l'étape d'homogénéisation. Au contraire, le déploiement des chaînes sous haute pression conduit à l'augmentation de leur volume hydrodynamique et la fraction de petites molécules diminue.

La concentration critique à laquelle on observe une augmentation brusque de la viscosité est de 10 % w/w pour l'extrait protéique de soja et de 8 % w/w pour l'extrait protéique de tournesol. Néanmoins, après homogénéisation, les valeurs de la viscosité baissent significativement de 340 mPa*s à 28 mPa*s pour l'extrait protéique de soja et de 250 mPa*s à 9 mPa*s pour l'extrait protéique de tournesol. Après le traitement par homogénéisation, toutes les solutions ont une viscosité relativement basse, ce qui nous permet de les atomiser efficacement.

II.4.2. Etape d'atomisation des solutions protéiques

Les solutions présentées dans le paragraphe précédent (homogénéisées à 50 MPa) sont atomisées suivant le protocole présenté dans le [Paragraphe IV.2.3.4](#). La température de séchage (température de l'air chaud à l'entrée de la chambre d'atomisation) est fixée à 120 °C. On considère que dans le cas des solutions aqueuses, où le solvant s'évapore à 100 °C à pression atmosphérique, la température de 120 °C est suffisante pour éliminer l'eau et produire des microparticules. Le choix d'une température relativement basse se justifie par la nécessité d'éviter la dénaturation des protéines et la dégradation des matières actives sensibles utilisées. Au moment de l'évaporation du solvant, les gouttelettes dispersées par la buse d'atomiseur subissent un refroidissement, ainsi les composés présents dans les gouttelettes ne sont exposés qu'à des températures de l'ordre de 50-70 °C, ce qui limite leur dénaturation thermique pendant l'atomisation [145].

Le débit de la pompe d'atomisation est fixé à 330 mL/h. Ce débit de la solution d'alimentation relativement faible a été choisi afin d'assurer un séchage efficace. En effet, un débit trop important peut empêcher l'évaporation de la totalité de l'eau, notamment dans le cas des préparations liquides relativement visqueuses. En outre, dans le cas de microencapsulation, les conditions choisies doivent permettre la production de microparticules sans fissures et de mieux protéger la matière active.

Nous avons étudié l'influence de la concentration en extraits protéiques sur le taux d'humidité des microparticules ([Paragraphe IV.2.4.9](#)), ainsi que sur le rendement d'atomisation (RA), défini comme le rapport de la quantité de matière sèche obtenue après atomisation sur la quantité de matière sèche atomisée ([Paragraphe IV.2.3.4](#)). Les résultats obtenus après atomisation sont rassemblés dans le [Tableau II - 6](#).

Tableau II - 6. Evolution du rendement d'atomisation et du taux d'humidité de poudre avec la concentration des solutions protéiques.

Concentration, % w/w	PS		PT	
	RA, %	Taux d'humidité*, %	RA, %	Taux d'humidité*, %
2	55,5	11,7	60,3	5,9
4	69,3	11,8	62,7	7,3
6	77,9	10,0	65,7	5,4
8	83,3±2,5	10,0±1,1	70,1±2,2	6,5±0,8
10	72,9	9,6	-	-

* - taux d'humidité est mesuré le lendemain de l'atomisation

La concentration des solutions protéiques n'a pas d'influence significative sur l'humidité des poudres obtenues par atomisation. Le taux d'humidité mesuré est de l'ordre de 9-11 % pour les extraits protéiques de soja et de 5-7 % pour ceux de tournesol. Ces valeurs sont comparables à celles des taux d'humidité des extraits protéiques bruts (avant atomisation) : 8 % pour l'extrait protéique de soja et 6 % pour celui de tournesol (Tableau II - 1).

Nous observons que le rendement d'atomisation augmente avec la hausse de la concentration jusqu'à 8 % w/w pour les deux extraits protéiques, et de façon plus marquée pour l'extrait protéique de soja. Cela peut s'expliquer par des pertes en matière sur les parois de l'atomiseur, ou encore dans le filtre, d'autant plus importantes proportionnellement que la quantité de matière atomisée (et donc la concentration) est faible.

En comparant le rendement d'atomisation des deux extraits protéiques, on observe que pour la majorité des concentrations, le rendement du procédé est plus élevé dans le cas de l'extrait protéique de soja. Par exemple, pour une concentration de 8 % w/w, les viscosités des solutions protéiques de soja et de tournesol sont de 15 mPa*s et de 9 mPa*s, alors que les rendements obtenus s'élèvent à 83,3 % et 70,1 % respectivement. Ce phénomène peut être expliqué par la présence d'une quantité importante de polysaccharides dans l'extrait protéique de tournesol (15,9 % contre 3,5 % pour l'extrait protéique de soja). Les polysaccharides sont connus pour leurs bonnes propriétés adhésives [307-309] et peuvent donc influencer les propriétés adhésives de l'extrait protéique. Cela explique la plus forte adhésion des gouttelettes de l'extrait protéique de tournesol (par rapport à celles de l'extrait protéique de soja) sur les parois de l'atomiseur et un plus faible rendement d'atomisation.

La concentration optimale, à laquelle le meilleur rendement d'atomisation est obtenu, est de 8 % w/w, pour les deux extraits protéiques. Afin de valider la reproductibilité du procédé, l'expérience d'atomisation pour chaque extrait protéique a été effectuée à cette concentration en quadruplet. La valeur moyenne ainsi que l'écart type sont présentés dans le Tableau II - 6.

Pour résumer cette partie, la concentration optimale pour obtenir le meilleur rendement d'atomisation à une viscosité raisonnable est de 8 % w/w pour les deux extraits protéiques étudiés. Cette concentration en solutions protéiques sera utilisée par la suite pour toutes les expériences de microencapsulation.

II.5. Microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques

II.5.1. α -Tocophérol : matière active hydrophobe modèle

L' α -tocophérol est une des formes de la vitamine E, constitué d'un noyau chromanol hydrophile et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone hydrophobe (Figure II - 8) [310]. Cette molécule est liposoluble, biologiquement active et possède essentiellement des propriétés antioxydantes. Issu d'huiles végétales (olive, tournesol, cacahuète, maïs, soja ou blé), l' α -tocophérol est un inhibiteur naturel d'auto-oxydation et de photo-oxydation. Il se présente sous la forme d'un liquide jaune-brun très visqueux ($T_{\text{ébullition}}$ de 200-220 °C).

L' α -tocophérol appartient au groupe des antioxydants hydrogène-donneur et peut donner son atome d'hydrogène aux radicaux peroxydes et alkoxydes des lipides en protégeant efficacement ces molécules hydrophobes contre l'oxydation [311]. Il est utilisé principalement dans les formulations cosmétiques, les produits alimentaires et pharmaceutiques.

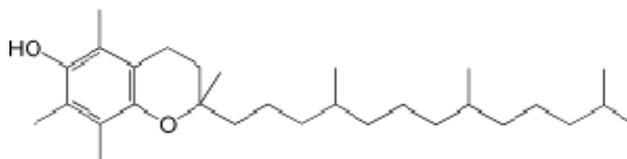


Figure II - 8. Représentation de la molécule d' α -tocophérol.

En raison de ses propriétés antioxydantes, l' α -tocophérol est très sensible à l'environnement et s'oxyde rapidement [90]. Il est considéré comme instable en présence d'oxygène, d'irradiation UV et de chaleur, car il se transforme de manière irréversible en composés quinones via la formation d'un époxyde et perd ses propriétés bénéfiques (Figure II - 9) [312].

La microencapsulation de l' α -tocophérol permet d'augmenter sa stabilité, tant lors de sa conservation que lors de son utilisation dans différentes formulations (alimentaires, cosmétiques) [89,90,313,314]. De plus, cette molécule est relativement facile à doser par spectrométrie UV. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi l' α -tocophérol comme molécule active hydrophobe modèle pour les essais de microencapsulation.

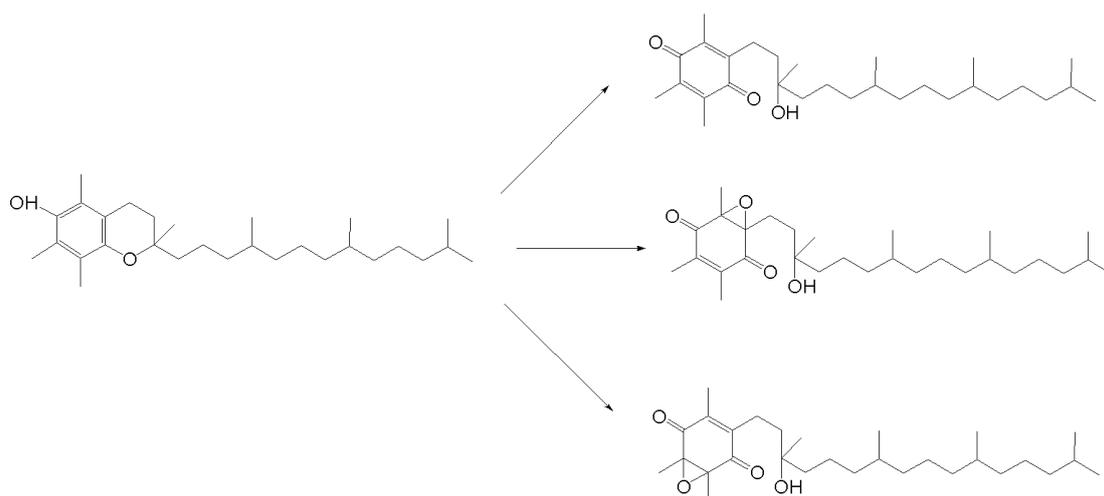


Figure II - 9. Représentation schématique de la dégradation de l'α-tocophérol [312].

II.5.2. Elaboration du procédé

Le procédé de microencapsulation de l'α-tocophérol (T) par les extraits protéiques de soja et de tournesol (PS et PT) est constitué de trois étapes : la préparation d'une solution aqueuse d'extraits protéiques (Paragraphe II.4.1), l'émulsification de l'α-tocophérol (de la matière active) dans la solution protéique et le séchage de l'émulsion par atomisation.

II.5.2.1. Etape d'émulsification

L'émulsification est effectuée après la préparation de la solution protéique. C'est une étape clé dans le procédé de microencapsulation. Une bonne dispersion du principe actif dans la solution de matière enrobante avant atomisation est primordiale pour une encapsulation efficace.

Dans le cas de microencapsulation par atomisation, le procédé d'homogénéisation sous haute pression est largement utilisé pour préparer des émulsions [15,18,168,169,226]. Cette technique a montré son efficacité pour la production d'émulsions stables avec des gouttelettes de petite taille.

Nous avons donc choisi la technique d'homogénéisation sous haute pression pour préparer et stabiliser les émulsions étudiées. Ces émulsions sont caractérisées notamment par leur viscosité et la taille des gouttelettes.

II.5.2.2. Etape d'atomisation

L'étape finale du procédé de microencapsulation est la transformation de la phase liquide en microparticules solides. Les particules sont produites par atomisation (Paragraphe I.1.5.3.4,

Paragraphe IV.2.3.4) à partir d'une émulsion stabilisée par l'homogénéisation sous haute pression.

Comme dans le cas de l'atomisation des extraits protéiques seuls, l'efficacité du procédé est caractérisée par le rendement d'atomisation (RA). Les microparticules obtenues sont quant à elles caractérisées par l'efficacité de microencapsulation et le taux de microencapsulation, mais aussi par leur taille et leur morphologie.

L'efficacité de microencapsulation (EME) de l' α -tocophérol par les extraits protéiques de soja et de tournesol est le paramètre le plus important du point de vue de la faisabilité du procédé. Il définit le degré de rétention de la matière active par la matière enrobante. La méthode employée pour le dosage de l' α -tocophérol par spectroscopie UV (Paragraphe IV.2.4.2.1) permet de mesurer la totalité de la matière active dans la poudre, c'est à dire celle qui se trouve à l'intérieur des microparticules, ainsi que celle localisée à la surface.

La valeur du taux de microencapsulation (TME) est reliée à l'EME et correspond au pourcentage de la matière active dans la poudre finale.

II.5.3. Propriétés thermiques des microparticules

Les propriétés thermiques des microparticules extrait protéique/ α -tocophérol, ainsi que de chaque constituant ont été étudiées par analyse thermogravimétrique (ATG). Les courbes thermogravimétriques des extraits protéiques, de l' α -tocophérol et des microparticules préparées par atomisation sont présentées sur la Figure II - 10.

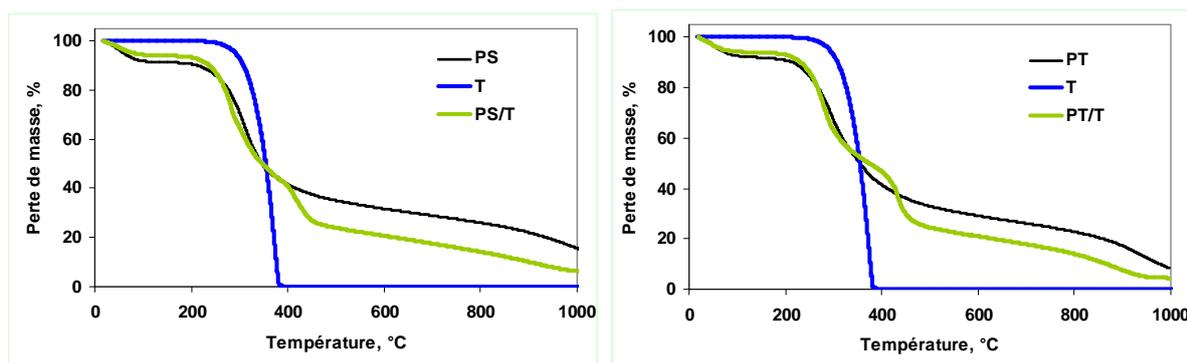


Figure II - 10. Courbes thermogravimétriques de l' α -tocophérol, des extraits protéiques de soja et de tournesol ainsi que des microparticules PS/T et PT/T (ratio extrait protéique/ α -tocophérol de 1/0,5).

En ce qui concerne la matière active encapsulée, l' α -tocophérol, aucune dégradation n'est observée aux températures inférieures à 200 °C. Ce résultat confirme que la matière active n'est

pas affectée pendant l'atomisation à 120 °C. Le produit commence à se dégrader à partir de 220 °C (ce qui correspond à sa température d'ébullition) et est totalement décomposé entre 220 °C et 380 °C.

Les courbes thermogravimétriques des extraits protéiques et des microparticules démontrent un premier palier de perte de masse vers 100 °C, correspondant à l'évaporation des molécules d'eau résiduelles. Une diminution marquée de la masse des microparticules par rapport à celle des extraits protéiques est observée dans l'intervalle de température entre 420 °C et 470 °C. Elle est attribuée à la dégradation de la matière active enrobée à l'intérieur des particules. Ce résultat confirme que l' α -tocophérol est protégé par l'enrobage de protéines et se décompose à une température plus élevée qu'à l'état libre. La fraction majoritaire de l'extrait protéique, plus de 50 %, est dégradée entre 200 °C et 450 °C. Elle est suivie par une dégradation progressive jusqu'à 1000 °C. Un comportement thermique similaire pour les protéines végétales a été rapporté dans la littérature [315-317].

On remarque qu'aux températures plus élevées, proches de 1000 °C, il reste encore 15 % en masse de l'extrait protéiques de soja et 8 % de celui de tournesol. Ce résidu peut être attribué aux cendres. La différence entre les valeurs du taux de cendres déterminées précédemment à 550 °C pendant 24 h (5 % pour l'extrait protéique de soja et 3 % pour celui de tournesol, [Tableau II - 1](#)) est liée au temps du chauffage. En effet, la courte durée de résidence des protéines à haute température pendant l'analyse thermogravimétrique (1h30) n'est pas suffisante pour les dégrader totalement.

La stabilité thermique des microparticules peut être représentée par la courbe de différence de masses entre les courbes expérimentale et théorique ([Paragraphe IV.4.2.4.6](#)) [52]. Les valeurs négatives sur la courbe correspondent à une faible stabilité des particules. En revanche, plus les valeurs sont importantes, plus la stabilité thermique des microparticules est grande ([Figure II - 11](#)).

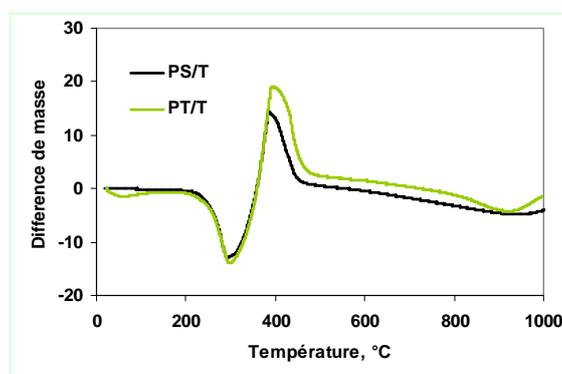


Figure II - 11. Courbes de la différence de la masse résiduelle des microparticules PS/T et PT/T.

Ces courbes nous permettent de confirmer la stabilité thermique des microparticules jusqu'à des températures de l'ordre de 200 °C.

II.5.4. Influence de la pression d'homogénéisation

Au cours de ce travail, l'étape d'émulsification de l' α -tocophérol dans la phase aqueuse est effectuée à l'aide d'un homogénéisateur sous haute pression. Ainsi, pour évaluer l'influence de l'étape d'homogénéisation sur le procédé de microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques de soja et de tournesol, différentes conditions opératoires ont été étudiées. Les pré-émulsions extrait protéique/ α -tocophérol avec un ratio des composants respectifs de 1/0,5 (solution protéique de 8 % w/w) ont été homogénéisées

- à 30 MPa, 50 MPa ou 80 MPa et 2 passages à l'homogénéisateur ;
- à 50 MPa et 2, 4 ou 6 passages à l'homogénéisateur.

Les émulsions obtenues après homogénéisation ont été atomisées. Quelques mL de chaque émulsion ont été prélevés pour la caractérisation des émulsions.

II.5.4.1. Influence sur les propriétés des émulsions

II.5.4.1.1. Influence sur la viscosité des émulsions

Plusieurs paramètres peuvent influencer la viscosité des émulsions étudiées : la concentration en matière sèche, la pression d'homogénéisation, le ratio matière enrobante/matière active ou encore le pH de la solution protéique du départ.

Les résultats de l'influence de la pression d'homogénéisation sur la viscosité des émulsions extrait protéique/ α -tocophérol sont présentés dans le [Tableau II - 7](#). Nous pouvons constater que dans le cas des deux extraits protéiques, l'augmentation de la pression, ainsi que du nombre des passages par l'homogénéisateur, entraînent une diminution de la viscosité des émulsions. Cette réduction de viscosité est plus importante dans le cas d'extrait protéique de tournesol pour lequel le changement de pression de 30 MPa à 80 MPa provoque une diminution de la viscosité d'émulsion de 4 fois. Concernant les émulsions à base d'extrait protéique de soja, cette variation est beaucoup moins marquée et les valeurs de viscosité sont nettement plus faibles.

Des comportements similaires pour des émulsions huile dans eau à base d'autres polymères naturels ont été observés et décrits dans la littérature. Yu *et al.* [226] remarquent la variation de viscosité d'émulsions à base de protéines de soja/maltodextrine et de phospholipide de 100 mPa*s à 70 mPa*s quand la pression d'homogénéisation augmente de 15 MPa à 55 MPa. Le même comportement a été observé dans le cas d'émulsions préparées avec du son d'avoine et de

l'huile de colza [318], avec de la méthylcellulose et de l'huile de tournesol [319] ou avec des protéines de lait et de l'huile de tournesol [320].

Tableau II - 7. Influence de l'homogénéisation sous haute pression sur la viscosité des émulsions extrait protéique/ α -tocophérol.

Pression d'homogénéisation	Viscosité de l'émulsion, mPa*s	
	PS/T*	PT/T*
30 MPa, 2 pass.	17,1	85,2
50 MPa, 2 pass.	15,1	36,1
50 MPa, 4 pass.	13,3	25,4
50 MPa, 6 pass.	12,5	16,5
80 MPa, 2 pass.	14,4	20,4

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

Cependant, dans le cas d'émulsions à base de protéines, certains auteurs ont observé le comportement inverse, c'est-à-dire l'augmentation de la viscosité avec la pression. Par exemple, Puppo *et al.* [293] constatent que pour une émulsion préparée à partir de protéines de soja et d'huile de tournesol, la viscosité augmente de 58 Pa*s à 727 Pa*s, quand la pression passe de 0,1 MPa à 600 MPa. Ce phénomène est la conséquence du déploiement des chaînes protéiques pendant l'homogénéisation et l'association des pelotes 7S et 11S des protéines. Les protéines non adsorbées à la surface des gouttelettes d'huile forment une matrice ou un réseau continu gélifié. En revanche, quand le traitement sous haute pression est combiné avec un chauffage à 60 °C, une augmentation de la viscosité avec la pression d'homogénéisation est observée jusqu'à des valeurs de pression de l'ordre de 400 MPa, puis pour des pressions plus élevées, la viscosité diminue. Cela est dû à la dissociation des agrégats de protéines et la diminution du phénomène de gélification [293].

Anton *et al.* [321] observent que cette augmentation de la viscosité avec la pression est d'autant plus forte que la concentration en protéines dans l'émulsion augmente. La quantité des protéines non adsorbées sur des gouttelettes d'huile augmente avec la concentration. Ainsi, la probabilité de floculation et de formation d'un réseau protéique entre les gouttelettes est plus grande.

Dans notre cas, nous avons observé la diminution de la viscosité des émulsions à base d'extraits protéiques avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation, ainsi qu'avec le nombre de passages par l'homogénéisateur. Ces résultats peuvent être expliqués comme suit. Avant l'étape d'émulsification, les extraits protéiques sont traités à une température de 70 °C et à pH alcalin. Cette étape de la solubilisation permet le déploiement partiel des chaînes protéiques. L'étape d'homogénéisation consiste surtout à émulsionner l' α -tocophérol dans la phase aqueuse, mais

aussi à déployer les chaînes protéiques qui restent agglomérées. Cette action assure la dispersion des gouttelettes de l' α -tocophérol grâce à l'importante force mécanique appliquée et une taille de gouttelettes assez faible (quelques micromètres). Ensuite, les chaînes protéiques s'adsorbent à l'interface huile/eau autour des gouttelettes hydrophobes, ce qui stabilise l'émulsion. Ainsi, la quantité de chaînes libres dans la phase aqueuse diminue en provoquant la réduction de la viscosité de l'émulsion.

II.5.4.1.2. Influence sur la taille des gouttelettes en émulsion

Afin de vérifier la stabilité dans le temps des émulsions obtenues, celles-ci sont caractérisées une heure, un jour et une semaine après homogénéisation sous haute pression. Les tailles moyennes des gouttelettes en émulsion mesurées par granulométrie sont présentées dans le **Tableau II - 8**. Ces émulsions possèdent des tailles moyennes comprises entre 1 μ m et 2 μ m de diamètre dans le cas de deux extraits protéiques. D'après ces résultats, nous pouvons remarquer que dans la gamme étudiée (30 MPa à 80 MPa), la pression d'homogénéisation n'a pas d'influence remarquable sur la taille des gouttelettes en émulsion.

Tableau II - 8. Influence de l'homogénéisation sous haute pression et du temps sur le diamètre moyen des gouttelettes de l' α -tocophérol dans les émulsions.

Pression d'homogénéisation	Diamètre moyen, μ m					
	PS/T*			PT/T*		
	1 heure	1 jour	1 semaine	1 heure	1 jour	1 semaine
30 MPa, 2 pass.	1,16	1,02	0,91	1,09	1,29	1,98
50 MPa, 2 pass.	1,06	0,84	0,95	1,28	1,49	1,87
50 MPa, 4 pass.	0,89	0,78	0,92	1,25	1,11	1,24
50 MPa, 6 pass.	0,75	1,08	0,76	0,92	0,92	1,39
80 MPa, 2 pass.	0,92	0,87	0,87	1,26	1,53	1,74

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

Il est connu que le premier passage par l'homogénéisateur assure la dispersion de la totalité de l'huile ou presque, alors que les passages suivants servent à casser les gouttelettes agglomérées, coalescées et celles qui n'ont pas été dispersées lors du premier passage [226]. De la même manière, l'augmentation de la pression d'homogénéisation ne permet pas une meilleure dispersion de l'huile par rapport aux faibles pressions. En effet, plus le rayon des gouttelettes est faible, plus la surpression à l'intérieur est importante et plus leur fragmentation devient difficile [322]. Ainsi, une fois dispersées dans l'émulsion, les gouttelettes gardent leur taille constante quelle que soit la pression appliquée.

Les résultats obtenus corroborent les données rapportées dans la littérature. Pour les émulsions à base de protéines de soja, Puppo *et al.* [293] observent que, quelle que soit la pression d'homogénéisation appliquée entre 0,1 MPa et 600 MPa, les émulsions formées sont stables, homogènes, sans floculation ni coalescence et avec une taille moyenne des gouttelettes de 1,1 μm . Aucun décalage de distribution de taille remarquable ou de variation des valeurs moyennes n'est observé avec l'augmentation de la pression. Il est également montré que l'addition d'agent tensioactif SDS (dodécylsulfate de sodium) ne change pas la taille des gouttelettes dans l'émulsion. La présence des molécules de protéines de soja seules suffit pour obtenir une émulsion stable.

D'autres études démontrent que les émulsions d'huile dans l'eau à base de protéines de soja stabilisées par homogénéisation sous haute pression ont une taille moyenne des gouttelettes de $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ [15,18,168,169,226] (Tableau I - 5). Dans le cas des émulsions préparées par homogénéisation sous une pression de 6 MPa à base de protéines de tournesol, la taille moyenne des gouttelettes est de 0,6-1,0 μm [323].

Les distributions de taille des gouttelettes de l' α -tocophérol dans les émulsions homogénéisées sous différentes pressions sont présentées sur la Figure II - 12. Pour la majorité des échantillons étudiés, nous observons une distribution de taille trimodale, avec une population majoritaire située autour de 1 μm et deux populations présentes en faible proportion situées à 0,1-0,4 μm et à 5-6 μm .

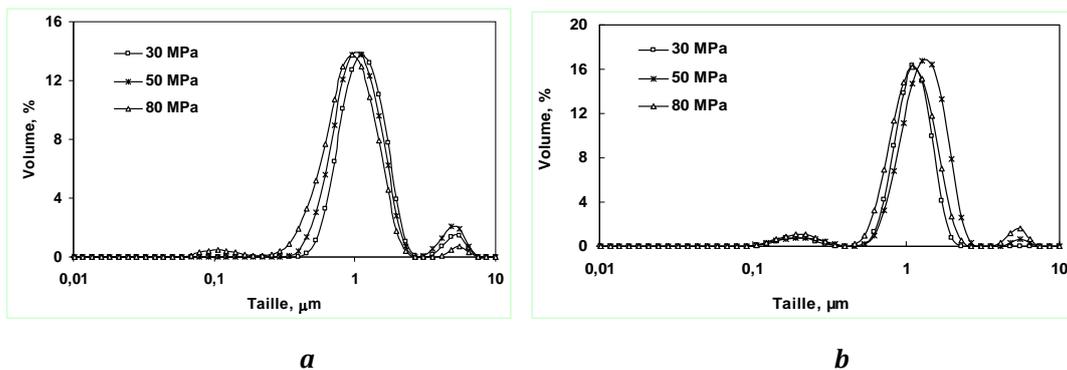


Figure II - 12. Influence de l'homogénéisation sous haute pression sur les distributions de taille des gouttelettes de l' α -tocophérol en émulsion (analyse 1 heure après homogénéisation) ; (a) PS/T et (b) PT/T.

On peut supposer que la première population autour de 0,1-0,4 μm correspond aux chaînes de l'extrait protéique présentes dans l'émulsion. La solution de l'isolat protéique de soja est analysée dans les mêmes conditions que les émulsions et une distribution avec le diamètre

moyen de 0,16 μm est obtenue **Figure II - 13**. Sur la distribution de taille de l'émulsion, cette population de petite taille est présente en faible quantité, variant de 1 % à 5 %.

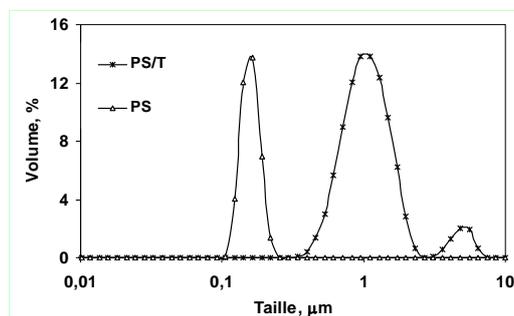


Figure II - 13. Distribution de taille de PS et de l'émulsion PS/T homogénéisée à 50 MPa.

La deuxième et la plus importante population se retrouve entre 1 μm et 2 μm . Elle représente une fraction de 91 % à 96 % de la quantité totale des particules en émulsion. Cette population correspond à la taille des gouttelettes de l' α -tocophérol dans l'émulsion. Enfin, la troisième population de tailles comprises entre 5 μm et 6 μm correspond à la fraction des gouttelettes coalescées dans l'émulsion (de 1 % à 6 %). Il faut mentionner que la limite de la détection de l'appareillage utilisé est de 6 μm . Toutes les particules ayant des tailles comprises au-dessus de cette limite ne sont pas analysées et ne sont pas présentées sur les distributions.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons également noter une augmentation de la taille moyenne des gouttelettes dans le temps pour les émulsions à base d'extrait protéique de tournesol (**Tableau II - 8**, **Figure II - 14**). Au contraire, les émulsions à base d'extrait protéique de soja restent stables dans le temps.

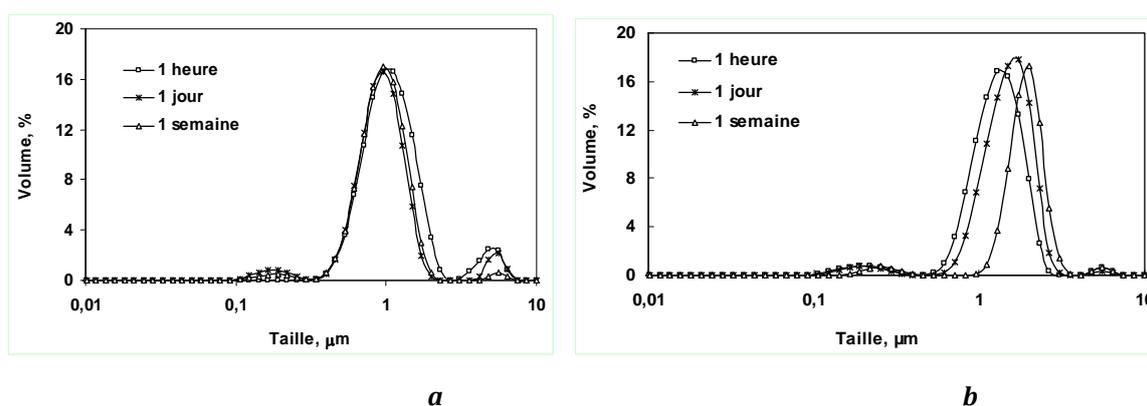


Figure II - 14. Evolution dans le temps des distributions de taille des gouttelettes de l' α -tocophérol en émulsion (50 MPa, 2 passages) ; (a) PS/T et (b) PT/T.

L'augmentation de la taille des gouttelettes dans les émulsions à base d'extrait protéique de tournesol est d'autant plus forte que la pression est faible. Cela est très probablement lié à la composition de l'extrait protéique de tournesol. La présence de polysaccharides en plus grande quantité (15,9 % contre 3,5 % dans l'extrait protéique de soja) entraîne des interactions plus fortes entre les gouttelettes de l' α -tocophérol et les chaînes du matériau enrobant. Ainsi, les gouttelettes sont plus proches les unes des autres et leur coalescence est favorisée.

II.5.4.1.3. Influence sur la morphologie des émulsions

Afin de confirmer les valeurs de la taille des gouttelettes de l' α -tocophérol et de vérifier l'homogénéité des émulsions, ces dernières ont également été étudiées par microscopie optique.

Pour démontrer l'effet de l'homogénéisation sous haute pression sur la dispersion de la matière active dans l'émulsion, cette dernière a été analysée avant et après homogénéisation (Figure II - 15). Il faut noter qu'avant l'homogénéisation, l'échantillon est analysé immédiatement après addition de l' α -tocophérol dans la solution protéique (sous agitation mécanique), car l'émulsion ainsi réalisée n'est pas stable dans le temps. En effet, les gouttelettes de l' α -tocophérol coalescent très rapidement.

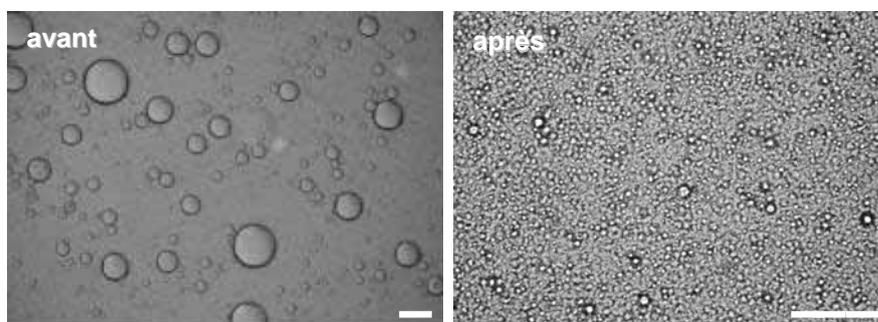


Figure II - 15. Microscopie optique : émulsion PS/T avant et après homogénéisation sous haute pression (50 MPa, 2 passages). Barre d'échelle - 25 μ m.

Les images de microscopie optique confirment l'importance de l'étape d'émulsification. L'énergie appliquée pendant l'homogénéisation sous haute pression permet la dispersion de la phase huileuse dans la phase aqueuse et la formation d'une émulsion stable avec des fines gouttelettes de taille homogène.

L'évolution de la morphologie des émulsions extrait protéique/ α -tocophérol avec la pression d'homogénéisation et avec le temps est présentée sur la Figure II - 16 et Figure II - 17. Les images obtenues montrent des émulsions avec une dispersion homogène de gouttelettes de l' α -tocophérol dans les solutions protéiques et stables dans le temps. Aucune influence significative

de la pression d'homogénéisation sur la taille des gouttelettes et la morphologie des émulsions n'est observée.

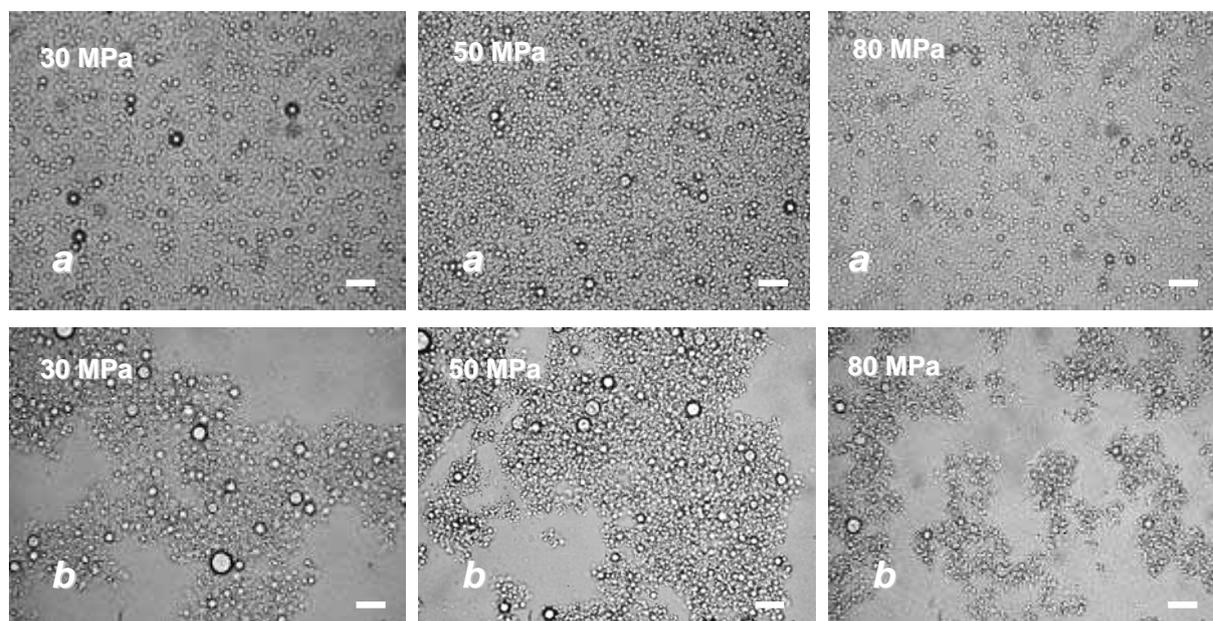


Figure II - 16. Microscopie optique : influence de l'homogénéisation sous haute pression sur la morphologie des émulsions, analyse effectuée 1 heure après homogénéisation ; (a) PS/T et (b) PT/T. Barre d'échelle - 10 µm.

Nous pouvons également remarquer la structure plus agglomérée des émulsions à base d'extrait protéique de tournesol par rapport à celles à base d'extrait protéique de soja. Ces agglomérations donnent lieu à la formation d'un réseau protéique plus dense emprisonnant les gouttelettes de l' α -tocophérol. Une explication possible est la différence de composition des extraits protéiques, et notamment la proportion non négligeable de polysaccharides dans l'extrait protéique de tournesol, qui favorise des interactions plus marquées entre les chaînes polymériques (interaction protéine/polysaccharide).

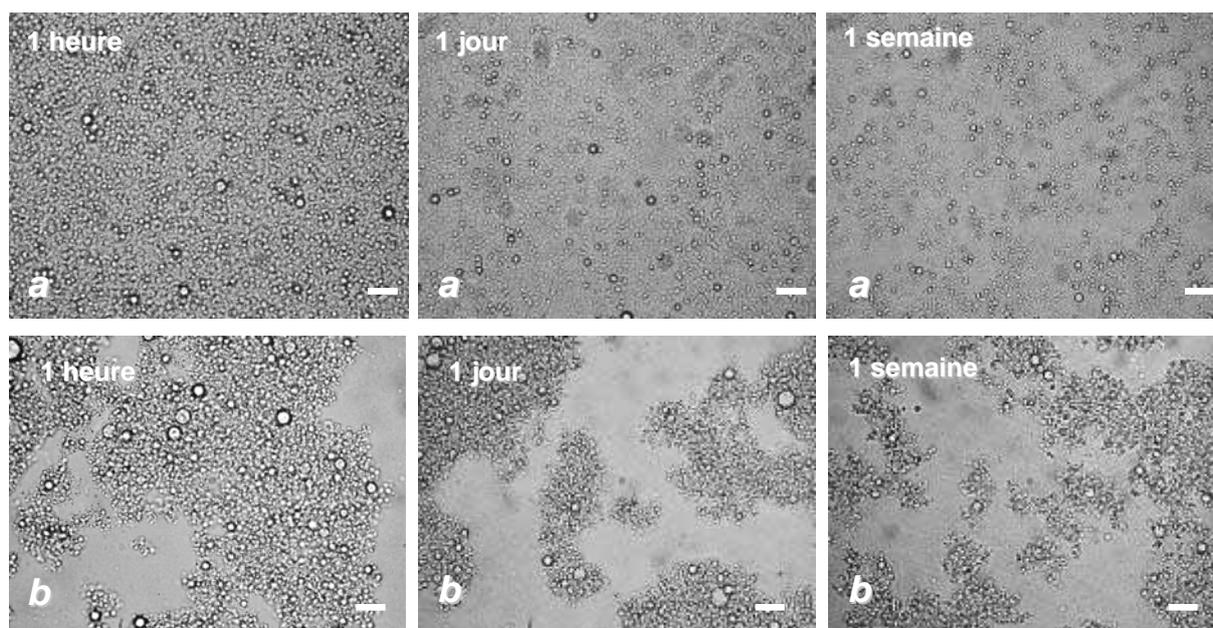


Figure II - 17. Microscopie optique : évolution dans le temps de la morphologie des émulsions (50 MPa, 2 passages) ; (a) PS/T et (b) PT/T. Barre d'échelle - 10 µm.

Néanmoins, grâce aux propriétés tensioactives des protéines, toutes les émulsions se montrent bien stabilisées avec une bonne dispersion de l' α -tocophérol dans les solutions protéiques. Les images de microscopie optique confirment que les tailles des gouttelettes sont relativement faibles, et ne font pas apparaître de population de plus grosse taille que celles observées en granulométrie.

II.5.4.2. Influence sur les propriétés des microparticules

Les émulsions obtenues dans les différentes conditions d'homogénéisation sont ensuite atomisées à une température de 120 °C.

II.5.4.2.1. Influence sur le rendement d'atomisation et sur l'efficacité de microencapsulation

Les résultats des expériences de microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques sont présentés dans le **Tableau II - 9**. Les valeurs obtenues au cours de ces expériences montrent que ni la pression d'homogénéisation, ni le nombre de passages n'ont d'influence significative sur le rendement d'atomisation (RA), l'efficacité de microencapsulation (EME) et le taux de microencapsulation (TME).

Tableau II - 9. Influence de l'homogénéisation sous haute pression sur le rendement d'atomisation et l'efficacité de microencapsulation.

Pression d'homogénéisation	RA, %		EME, %		TME, %	
	PS/T*	PT/T*	PS/T*	PT/T*	PS/T*	PT/T*
30 MPa, 2 pass.	65,4	69,1	77,3±1,8 ^a	91,0±1,9 ^a	25,5±0,6 ^a	30,0±0,7 ^a
50 MPa, 2 pass.	67,9	70,0	79,7±1,0 ^a	92,6±1,8 ^a	26,3±0,3 ^a	30,5±0,6 ^a
50 MPa, 4 pass.	64,5	72,3	77,7±0,7 ^a	92,7±1,1 ^a	25,7±0,2 ^a	30,6±0,4 ^a
50 MPa, 6 pass.	67,8	75,1	77,7±0,2 ^a	93,3±0,8 ^a	25,7±0,1 ^a	30,8±0,3 ^a
80 MPa, 2 pass.	69,1	71,8	80,4±2,0 ^a	91,6±3,2 ^a	26,5±0,7 ^a	30,2±1,1 ^a

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

^a - même lettre dans chaque colonne indique qu'il n'y a pas de différence statistique entre les valeurs moyennes

Les émulsions atomisées sont constituées de trois composants : l'eau, l'extrait protéique et l' α -tocophérol. Au moment de la dispersion de cette formulation liquide par la buse de l'atomiseur et la formation des microgouttes, les molécules qui s'accumulent à la surface air/liquide sont les molécules avec les meilleures propriétés tensioactives [324]. Dans notre cas, ces molécules sont les chaînes protéiques. Les pertes d'eau pendant le séchage influencent le rétrécissement du film protéique formé à la surface des gouttes. Ce film permet de garder le maximum de matière active à l'intérieur des microparticules. Cela nous laisse supposer que la quantité d' α -tocophérol qui reste à la surface des microparticules formées par atomisation est minime.

Malgré la différence de viscosité des émulsions de départ (Tableau II - 7), le rendement du procédé d'atomisation n'est pas particulièrement influencé par l'homogénéisation sous pression. Les rendements d'atomisation obtenus dans le cadre de ce travail (64,5-75,1 %) sont comparables voire meilleurs que ceux décrits dans la littérature pour les préparations avec des biopolymères (30-70 %) [325-328].

La variation de la pression d'homogénéisation ne semble pas non plus affecter l'efficacité de microencapsulation, du moins dans la gamme de pression étudiée. En revanche, en comparant les microparticules à base d'extrait protéique de soja à celles à base d'extrait protéique de tournesol, on observe que les protéines de tournesol sont plus efficaces comme matériau enrobant. L'efficacité de rétention de la matière active par l'extrait protéique de soja est comprise entre 77,3 % et 80,4 %, alors que pour l'extrait protéique de tournesol, ces valeurs s'élèvent à 91,0-93,3 %.

La différence d'efficacité de microencapsulation entre les deux extraits protéiques peut être liée à la morphologie différente des chaînes protéiques, mais aussi à la composition des extraits protéiques. Rappelons que la quantité estimée de polysaccharides dans l'extrait protéique de soja est de 3,5 %, et de 15,9 % dans l'extrait protéique de tournesol (Tableau II - 1). L'utilisation de la combinaison protéine/polysaccharide en tant que matière enrobante en

microencapsulation est connue pour son effet synergique. Ainsi, l'incorporation des carbohydrates dans le mélange protéique augmente l'efficacité de microencapsulation d'une matière hydrophobe, sa stabilité antioxydante dans la poudre, ainsi que les propriétés de séchage pendant l'atomisation [168]. Cette meilleure rétention de la matière active par l'extrait protéique de tournesol se traduit également par un rendement d'atomisation plus élevé par rapport aux préparations avec l'extrait protéique de soja (Tableau II - 9).

L'encapsulation de l' α -tocophérol par l'extrait protéique de pois par la technique d'atomisation a été étudiée par Pierucci *et al.* [224]. Les auteurs obtiennent une rétention de matière active par les protéines de 86,8 %. Les protéines de soja étudiées comme matière enrobante pour la microencapsulation des huiles essentielles par atomisation démontrent une efficacité variant entre 16,9 % et 73,3 % en fonction de la matière active et de la concentration en matières sèches utilisées [12]. Nos résultats sont donc tout à fait cohérents avec les travaux déjà publiés et démontrent la pertinence de l'utilisation des extraits protéiques de soja mais aussi de tournesol en microencapsulation de matières actives hydrophobes par atomisation.

II.5.4.2.2. Influence sur la taille et le taux d'humidité des microparticules

Les résultats obtenus pour des microparticules préparées à partir des émulsions homogénéisées à différentes pressions sont présentés dans le Tableau II - 10. On observe que l'augmentation de la pression d'homogénéisation entraîne une légère diminution de la taille moyenne des microparticules, qui est plus marquée dans le cas de l'extrait protéique de soja. D'autre part, aucune influence remarquable de la pression d'homogénéisation ni du nombre de passages par l'homogénéisateur sur le taux d'humidité des microparticules n'est observée.

Tableau II - 10. Influence de l'homogénéisation sous haute pression sur les propriétés des microparticules.

Pression d'homogénéisation	Taux d'humidité, %		Diamètre moyen, μm	
	PS/T*	PT/T*	PS/T*	PT/T*
30 MPa, 2 pass.	5,3	5,1	9,6 \pm 0,2 ^a	7,3 \pm 0,1 ^a
50 MPa, 2 pass.	5,5	5,5	9,3 \pm 0,2 ^{ab}	6,9 \pm 0,03 ^b
50 MPa, 4 pass.	6,5	5,4	8,7 \pm 0,3 ^b	6,8 \pm 0,1 ^b
50 MPa, 6 pass.	5,9	4,2	8,9 \pm 0,3 ^b	7,0 \pm 0,1 ^b
80 MPa, 2 pass.	5,3	4,9	7,7 \pm 0,1 ^c	7,0 \pm 0,01 ^b

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

^{a-c} - différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

En ce qui concerne les valeurs de diamètre moyen des microparticules, aucune influence du nombre de passages dans l'homogénéisateur n'est observée. En revanche, nous remarquons une

légère diminution de la taille avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation, surtout pour des microparticules à base de protéines de soja. Cette évolution peut être corrélée à celle observée sur les mesures de viscosité des émulsions à atomiser (Tableau II - 7). La relation entre la taille des microparticules et la viscosité des émulsions peut être expliquée de la manière suivante. Grâce à la force mécanique appliquée aux émulsions pendant l'homogénéisation, la dissociation des chaînes protéiques et leur mobilité deviennent plus importantes. Par conséquent, avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation, la viscosité des émulsions diminue [226,318]. Parallèlement, pendant la dispersion de l'émulsion moins visqueuse par la buse de l'atomiseur, les microgouttes (et donc les microparticules) formées ont des tailles plus petites. Xie *et al.* [329] ont observé que la diminution de la viscosité des préparations atomisées permet de réduire la taille des microparticules formées.

Les valeurs du diamètre moyen que nous avons obtenues (6,8-9,6 μm) sont tout à fait comparables à celles citées dans la littérature pour les microparticules à base de protéines de soja produites par atomisation : 9-11 μm pour les microparticules protéines de soja/hydrolysat de caséine [17] et 10,3-17,7 μm pour les microparticules protéines de soja/gélatine/hydrolysat de caséine [68].

Les distributions de taille des microparticules issues des solutions protéiques atomisées sans matière active et celles issues des émulsions extrait protéique/ α -tocophérol sont présentées sur la Figure II - 18. Ces distributions sont bimodales, avec une population autour de 0,4-0,5 μm en quantité très faible (inférieure de 1 %) et une deuxième population plus large, de taille variant entre 1 μm et 25 μm . On observe que les particules issues des extraits protéiques seuls ont un diamètre moyen plus faible que les particules obtenues à partir des émulsions : 5,5 μm et 9,3 μm respectivement pour l'extrait protéique de soja, et 5,9 μm et 6,9 μm respectivement pour l'extrait protéique de tournesol.

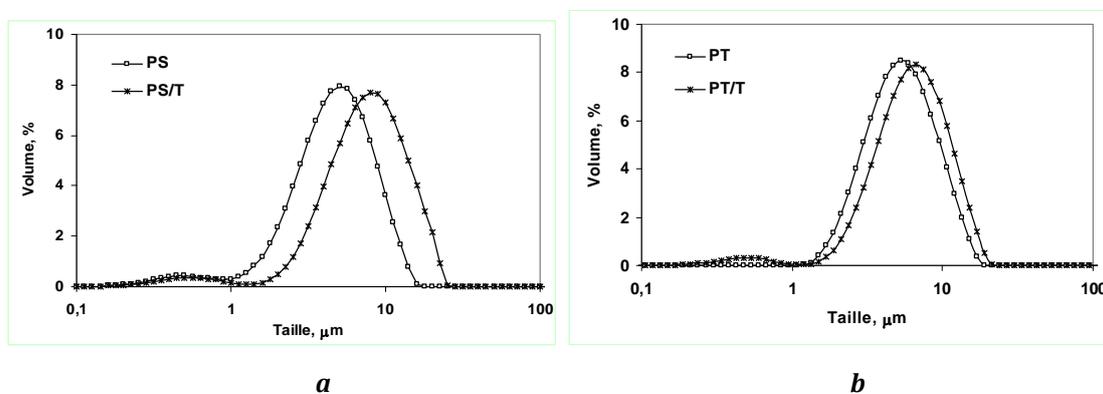


Figure II - 18. Distributions de taille de microparticules issues des solutions protéiques, (a) PS et (b) PT, et des émulsions, (a) PS/T et (b) PT/T (préparations homogénéisées à 50 MPa avec 2 passages).

Cette différence peut s'expliquer par la nature de la matière active encapsulée. La viscosité élevée et le caractère "collant" de l' α -tocophérol peut provoquer une plus grande agglomération des microparticules en formation, même s'il n'est présent qu'en petite quantité à la surface des microgouttes atomisées.

Si nous comparons les tailles des microparticules obtenues avec les deux extraits protéiques différents, on observe que les tailles des particules à base d'extrait protéique de soja sont plus élevées que celles de particules à base d'extrait protéique de tournesol (7,7-9,6 μm et 6,8-7,3 μm respectivement). Néanmoins cet écart de taille moyenne reste minime au regard des distributions de taille qui sont très similaires (Figure II - 19).

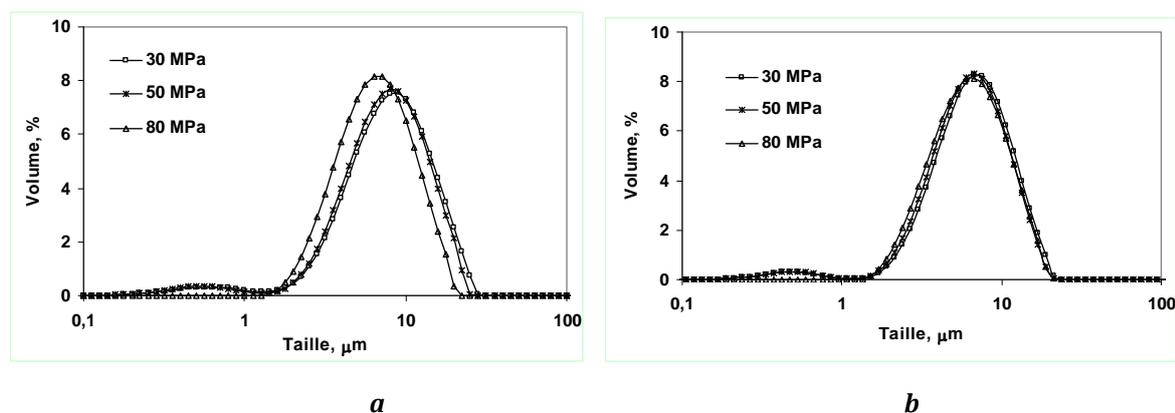


Figure II - 19. Influence de l'homogénéisation sous haute pression sur les distributions de taille des microparticules ; (a) PS/T et (b) PT/T.

En résumé de cette partie, nous pouvons conclure que l'étape d'homogénéisation sous haute pression est indispensable pour l'obtention d'une émulsion stable de type huile dans eau (α -tocophérol dans la solution protéique) avec une bonne distribution et une bonne homogénéité des gouttelettes. L'atomisation à 120 °C des émulsions produites par homogénéisation permet d'obtenir des microparticules avec un diamètre moyen variant entre 6,8 μm et 9,6 μm et des efficacités de microencapsulation élevées variant de 77 % à 93 %. Dans le cas des deux extraits protéiques étudiés, l'augmentation de la pression d'homogénéisation entraîne une diminution de la viscosité de l'émulsion et de la taille des microparticules (surtout dans le cas de l'extrait protéique de soja). D'autre part, ce paramètre mécanique n'a pas d'influence remarquable sur la taille des gouttelettes dans l'émulsion, le taux d'humidité des microparticules obtenues ni sur l'efficacité de microencapsulation. Enfin, les deux extraits protéiques se révèlent être des matériaux enrobants efficaces pour l'encapsulation de l' α -tocophérol par la technique d'atomisation. De plus, l'extrait protéique de tournesol montre de meilleurs résultats en terme d'efficacité de microencapsulation (par rapport à l'extrait protéique de soja), ce qui est encourageant pour la suite de notre étude.

Pour la suite de ce travail, nous avons choisi de travailler dans des conditions intermédiaires d'homogénéisation sous haute pression (50 MPa avec 2 passages par homogénéisateur). Les propriétés des émulsions, telles que la viscosité, la taille des gouttelettes et la morphologie sont analysées 1 heure après homogénéisation.

II.5.5. Influence du ratio matière enrobante/matière active (extrait protéique/ α -tocophérol)

Le taux d'encapsulation des microparticules peut être variable en fonction de l'application envisagée. Par exemple, pour les médicaments et les produits pharmaceutiques, ces quantités sont très faibles, alors que pour les produits alimentaires elles peuvent être plus importantes.

Afin d'étudier l'influence du ratio matière enrobante/matière active sur le procédé de microencapsulation et sur les propriétés des microparticules, quatre rapports extrait protéique/ α -tocophérol différents ont été utilisés : 1/0,5, 1/1, 1/2 et 1/4. Pour ces expériences, différentes quantités d' α -tocophérol ont été ajoutées dans la préparation aqueuse. La concentration de la solution protéique a été fixée à 8 % w/w.

II.5.5.1. Influence sur les propriétés des émulsions

Toutes les émulsions ont été stabilisées par homogénéisation sous haute pression (50 MPa, 2 passages). Les propriétés de ces émulsions sont rassemblées dans le **Tableau II - 11**. Les résultats obtenus montrent que dans le cas des deux extraits protéiques, l'ajout d'une quantité importante de matière active dans l'émulsion augmente sa viscosité, ainsi que la taille moyenne des gouttelettes d'huile.

Tableau II - 11. Influence du ratio extrait protéique/ α -tocophérol sur les propriétés des émulsions.

	Ratio extrait protéique/T*	Viscosité, mPa*s	Diamètre moyen des gouttelettes, μ m
PS/T	1/0,5	15,1	1,06
	1/1	18,2	0,95
	1/2	19,4	1,11
	1/4	59	1,32
PT/T	1/0,5	36,1	1,28
	1/1	61,2	1,51
	1/2	96,5	2,20
	1/4	159	2,24

* - solution protéique à 8 % w/w

Lors du passage du ratio matière enrobante/matière active de 1/0,5 à 1/4, la concentration massique en matière sèche dans l'émulsion augmente de 11,5 % à 30 % respectivement. Cela peut expliquer les valeurs de viscosité élevées. D'autre part, l'augmentation de la viscosité d'une émulsion après l'ajout d'huile est liée aux propriétés d'écémage. L'écémage est le phénomène de flottabilité des gouttelettes dispersées dans une émulsion [330]. Dépendant de la densité de la phase dispersée par rapport à la phase continue, les gouttelettes se déplacent en flottant vers le haut ou descendent vers le bas. La migration continue des gouttes en émulsion différencie l'écémage de la floculation (agrégation des gouttelettes) et de la coalescence (fusion des gouttelettes). Plus l'écémage est important dans une émulsion, plus elle s'approche de l'état inverse, quand la phase dispersée devient la phase continue et inversement. Cependant quand la viscosité de la phase dispersée est plus élevée que celle de la phase continue, comme c'est le cas dans notre étude, l'augmentation de la fraction de la phase dispersée influence la hausse de la viscosité totale de l'émulsion.

Une corrélation similaire entre la fraction d'huile dans l'émulsion et la viscosité a été observée et décrite dans la littérature pour des préparations à base de pectine et d'huile de tournesol [331], de protéines de sérum bovin et d'huile de maïs [332] ou encore de protéines de petit lait et d'huile de soja [333].

Une augmentation de la taille moyenne des gouttelettes est observée quand le ratio matière enrobante/matière active augmente de 1/0,5 à 1/4. Pour les émulsions à base d'extrait protéique de soja, le diamètre moyen augmente de 1,06 μm à 1,32 μm et pour les émulsions à base d'extrait protéique de tournesol, cette augmentation est de 1,28 μm à 2,24 μm . Ce comportement est illustré par les distributions de taille des gouttelettes en émulsion, ainsi que par les images obtenues par microscopie optique (Figure II - 20, Figure II - 21). Pour la majorité des échantillons, on obtient des distributions de taille trimodales, avec des populations de taille allant des plus petites vers les plus élevées comme suit : les chaînes protéiques, les gouttelettes simples et les gouttelettes coalescées.

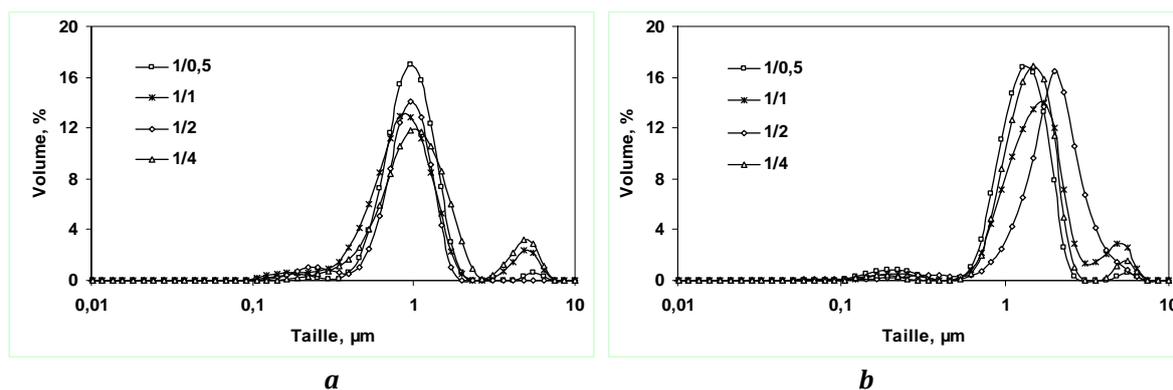


Figure II - 20. Influence du ratio extrait protéique/ α -tocophérol sur les distributions de taille des gouttelettes en émulsion ; (a) PS/T et (b) PT/T.

Avec l'augmentation de la quantité d' α -tocophérol dans la solution protéique, la densité des gouttelettes par unité de volume de l'émulsion augmente. Même si pendant l'étape d'homogénéisation sous haute pression, l' α -tocophérol est bien dispersé, la proximité des gouttelettes dans la formulation liquide fait qu'elles coalescent entre elles plus facilement, d'autant plus que la concentration en extrait protéique, elle, reste constante.

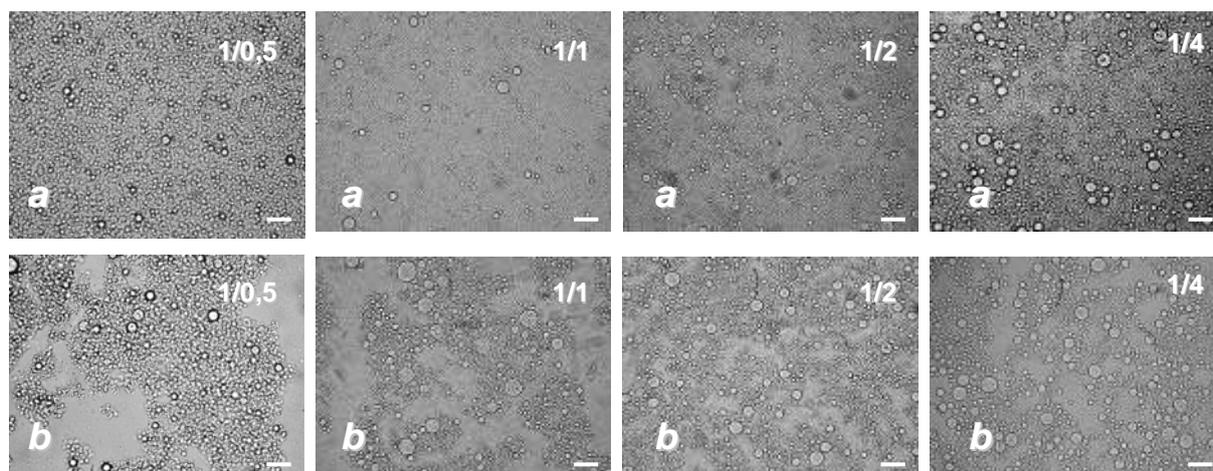


Figure II - 21. Microscopie optique : influence du ratio extrait protéique/ α -tocophérol sur la morphologie des émulsions ; (a) PS/T et (b) PT/T. Barre d'échelle - 10 μ m.

Sur les images obtenues en microscopie optique, nous pouvons remarquer la présence d'un nombre assez important de gouttelettes de l' α -tocophérol dont la taille est d'environ 5 μ m. Il faut rappeler qu'avant d'être analysée sous microscope, l'émulsion est placée entre deux lamelles en verre. Ainsi après écrasement, les gouttelettes observées n'ont plus une forme sphérique. Elles sont déformées vers une morphologie plate, ce qui entraîne une augmentation de leur taille pendant la visualisation. Néanmoins l'homogénéité et la stabilité des émulsions sont bonnes, la

taille des gouttelettes reste de l'ordre de quelques micromètres et n'empêche pas l'atomisation des émulsions.

II.5.5.2. Influence sur les propriétés des microparticules

Les propriétés des microparticules obtenues après atomisation sont rassemblées dans le **Tableau II - 12**. Nous pouvons remarquer que l'augmentation de la proportion de l' α -tocophérol dans l'émulsion provoque une diminution du rendement d'atomisation et du taux d'humidité des microparticules, mais aussi une hausse de l'efficacité de microencapsulation et de la taille des microparticules. Ces tendances sont observées quel que soit l'extrait protéique utilisé.

Tableau II - 12. Influence du ratio extrait protéique/ α -tocophérol sur le procédé d'atomisation et sur les propriétés des microparticules.

	Ratio extrait protéique/T*	RA, %	EME, %	TME, %	Taux d'humidité, %	Diamètre moyen, μm
PS/T	1/0,5	67,9	79,7 \pm 1,0 ^d	26,3 \pm 0,3 ^e	5,5	9,3 \pm 0,2 ^e
	1/1	59,6	92,6 \pm 3,1 ^c	46,6 \pm 1,5 ^c	5,0	12,0 \pm 0,3 ^d
	1/2	58,4	96,4 \pm 2,4 ^{bc}	63,6 \pm 1,5 ^b	3,5	15,9 \pm 0,2 ^c
	1/4	46,9	103,7 \pm 0,7 ^a	83,0 \pm 0,5 ^a	2,1	80,6 \pm 1,0 ^a
PT/T	1/0,5	70,0	92,6 \pm 1,8 ^c	30,5 \pm 0,6 ^d	5,5	6,9 \pm 0,03 ^f
	1/1	68,5	93,4 \pm 1,6 ^{bc}	46,7 \pm 0,8 ^c	4,5	8,3 \pm 0,3 ^{ef}
	1/2	62,6	99,7 \pm 3,2 ^{ab}	65,8 \pm 2,1 ^b	3,0	8,8 \pm 0,5 ^{ef}
	1/4	55,6	99,0 \pm 3,5 ^{ab}	79,2 \pm 2,8 ^a	2,6	42,2 \pm 1,4 ^b

* - solution protéique à 8 % w/w

^{a-f} -différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

La réduction du rendement d'atomisation peut être expliquée de la manière suivante. Plus la proportion d' α -tocophérol est élevée, plus les gouttelettes dispersées par atomiseur sont chargées en huile. Une fraction importante d' α -tocophérol peut donc se retrouver en surface des microparticules, surtout dans les préparations qui sont plus concentrées en α -tocophérol qu'en protéines (ratios 1/2 et 1/4). A cause de la présence de cette huile de surface, les particules deviennent plus collantes et adhèrent aux parois de l'appareil plus facilement.

Ce raisonnement est également valable pour l'augmentation de la taille moyenne des microparticules. En raison de la présence de l'huile à la surface des particules, leur agglomération est facilitée (**Figure II - 22**). Cette agglomération est peu marquée et progressive jusqu'au ratio extrait protéique/ α -tocophérol de 1/2. Pour les ratios les plus élevés (1/4), on observe une agglomération beaucoup plus forte et un diamètre moyen de particules multiplié par plus de 5 par rapport à celui des particules réalisées avec un ratio 1/0,5.

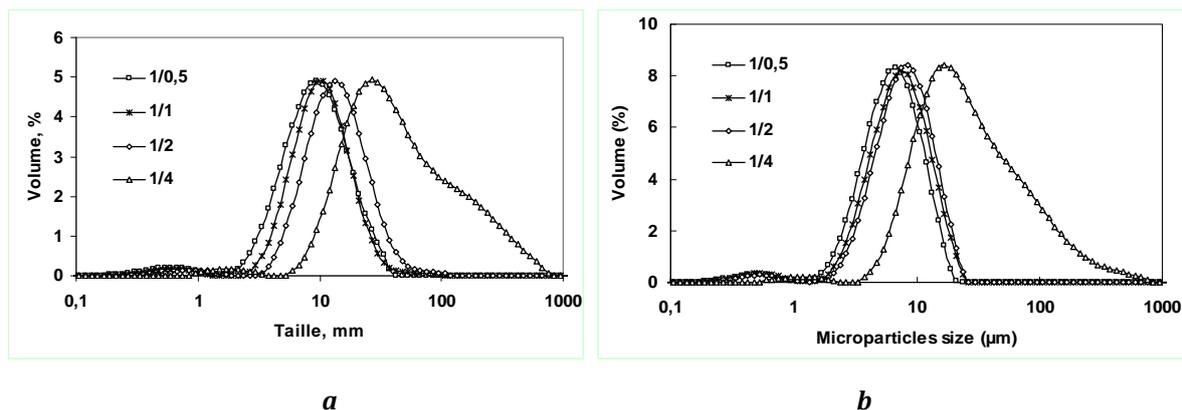


Figure II - 22. Influence du ratio extrait protéique/ α -tocophérol sur les distributions de taille des microparticules ; (a) PS/T et (b) PT/T.

La fraction d'extrait protéique dans les microparticules diminue avec l'augmentation de la proportion d' α -tocophérol. Cela entraîne la réduction du taux d'humidité des microparticules car seules les chaînes protéiques (et les polysaccharides présents dans l'extrait protéique) retiennent les molécules d'eau.

En ce qui concerne l'efficacité de microencapsulation, nous observons son augmentation jusqu'à des valeurs proches ou supérieures à 100 %. La rétention de la matière active par les deux matières enrobantes protéiques utilisées est efficace, d'autant plus que la concentration en matière active est élevée.

Les valeurs du taux de microencapsulation montrent que les microparticules préparées par atomisation à base d'extraits protéiques peuvent être chargées en matière active jusqu'à 79-83 %. Cela signifie que les microparticules contiennent quatre fois plus d' α -tocophérol que de protéines, tout en restant bien individualisées. Ce résultat peut être très intéressant à exploiter ; il permet, par exemple, de convertir les matières liquides sous forme de poudres hautement chargées. En comparant nos résultats avec ceux décrits dans la littérature, le taux de chargement en matière active des microparticules préparées par atomisation varie de 10 % à 50 % [12,17,68,103,224]. Ainsi, le procédé mis en place dans notre étude permet d'obtenir des résultats nouveaux avec des efficacités élevées.

Les images obtenues par MEB permettent de visualiser la morphologie des microparticules et leur structure interne (Figure II - 23). Les particules sont sphériques avec une surface lisse sans fissure. Après broyage dans l'azote liquide, une structure poreuse peut être observée pour les microparticules avec un ratio en matière active élevé.

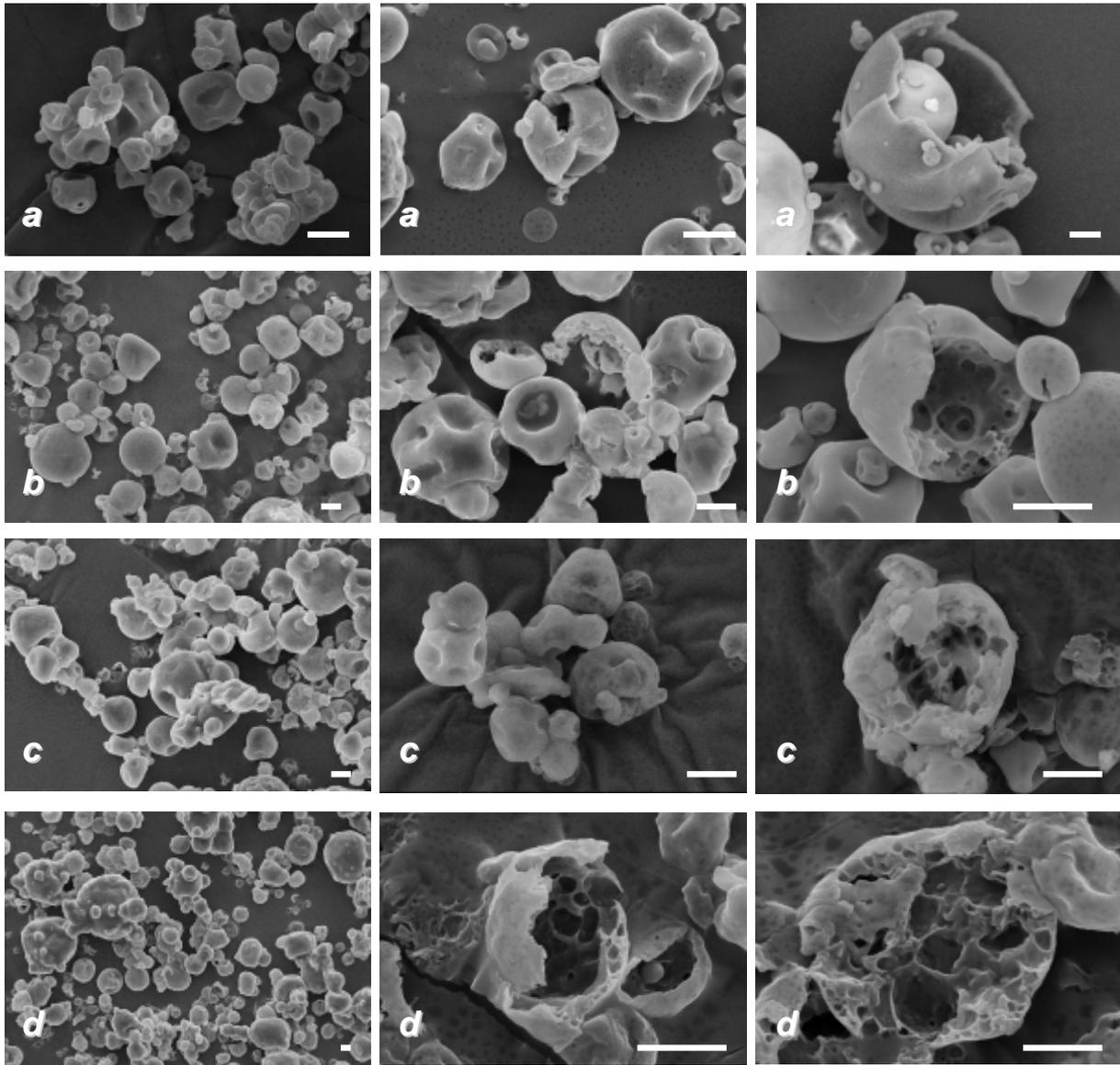


Figure II - 23. Images MEB de la morphologie des microparticules (a) PS/T ratio 1/0,5, (b) PS/T ratio 1/1, (c) PT/T ratio 1/2 et (d) PT/T ratio 1/4. Barre d'échelle – 3 μm .

La structure interne des particules cassées confirme les hypothèses avancées précédemment (Paragraphe II.3.6). Lors de la phase d'atomisation, les protéines (grâce aux propriétés tensioactives) se placent à l'interface air/eau. Après l'évaporation de l'eau, elles forment à la surface des microparticules une enveloppe poreuse, où sont dispersées les gouttelettes d' α -tocophérol. Avec l'augmentation de la proportion d' α -tocophérol, les microgouttes dispersées par la buse de l'atomiseur sont plus concentrées en huile. Chaque gouttelette d'huile est entourée par des chaînes protéiques, ainsi pendant le séchage, la matrice formée est plus poreuse. Cette porosité est plus élevée quand le pourcentage d' α -tocophérol augmente. Selon les images MEB, la taille de la majorité des microparticules varie entre 2 μm et 20 μm , ce qui confirme les mesures effectuées par granulométrie.

Les courbes thermogravimétriques des microparticules avec différents ratios matière enrobante/matière active sont présentées sur la Figure II - 24. L'augmentation de la proportion de matière dégradée après 300 °C confirme l'augmentation de la proportion d' α -tocophérol dans les microparticules.

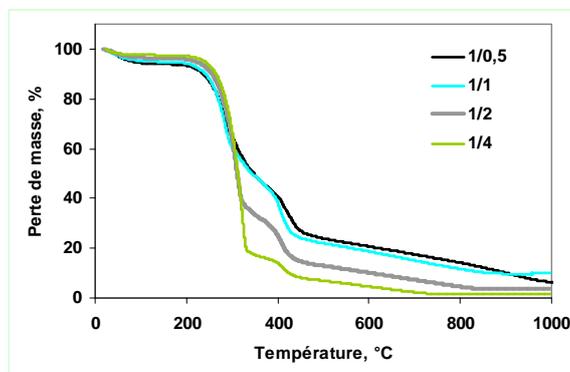


Figure II - 24. Courbes thermogravimétriques des microparticules PS/T avec des ratios matière enrobante/matière active de 1/0,5, 1/1, 1/2 et 1/4.

Pour conclure sur cette partie, le ratio matière enrobante/matière active joue un rôle très important dans le procédé de microencapsulation. Ce ratio influence les propriétés essentielles des émulsions (taille des gouttelettes, viscosité) et des microparticules (taille des particules, efficacité de microencapsulation). L'augmentation de la proportion d' α -tocophérol dans le système entraîne une augmentation de tous les paramètres mentionnés. Les extraits protéiques de soja et de tournesol permettent d'obtenir des microparticules hautement chargées en matière active liquide (jusqu'à 80 % w/w).

II.5.6. Influence de la concentration de solution protéique

Toutes les émulsions étudiées auparavant ont été préparées à partir d'une solution protéique concentrée à 8 % w/w. Cependant, nous avons observé une morphologie agglomérée des émulsions à base d'extrait protéique de tournesol par rapport à celles à base d'extrait protéique de soja (Figure II - 16, Figure II - 17). Ainsi, pour mieux comprendre l'origine de cette agglomération, une émulsion a été préparée à partir d'une solution protéique de tournesol à 6 % w/w. Le même ratio extrait protéique/ α -tocophérol que précédemment de 1/0,5 a été utilisé. Les émulsions sont stabilisées par homogénéisation sous haute pression (50 MPa, 2 passages).

II.5.6.1. Influence sur les propriétés des émulsions

Les résultats des essais réalisés sont présentés dans le **Tableau II - 13** et sur la **Figure II - 25**. Nous pouvons constater que la diminution de la concentration en extrait protéique dans la solution se traduit par la réduction de la viscosité de l'émulsion et du diamètre moyen des gouttelettes d'huile.

Tableau II - 13. Influence de la concentration de la solution protéique sur les propriétés des émulsions PT/T.

Concentration de la solution protéique*, % w/w	Viscosité, mPa*s		Diamètre moyen des gouttelettes, μm
	Solution protéique	Emulsion	
	Avant homogénéisation	Après homogénéisation	
8	250	36,1	1,28
6	9	4,2	0,81

* - ratio extrait protéique/T de 1/0,5

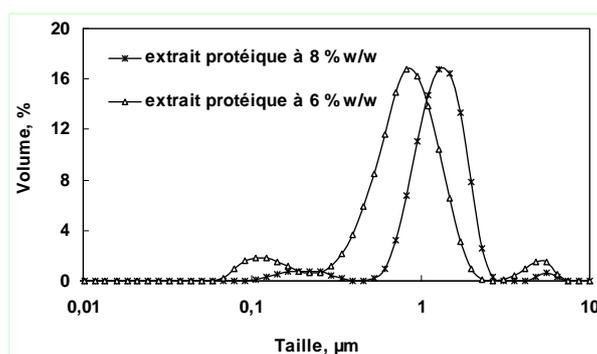


Figure II - 25. Distribution de taille des gouttelettes de l' α -tocophérol dans les émulsions PT/T préparées à partir de la solution de PT à 6 % w/w et à 8 % w/w.

Nous observons, comme on pouvait s'y attendre, une viscosité tant de la solution protéique que de l'émulsion plus faible lorsque la concentration initiale en extrait protéique est de 6 % w/w, en raison d'un taux de matières sèches sensiblement plus faible. La dispersion des gouttelettes d' α -tocophérol est favorisée et la formation des agglomérats est réduite (**Figure II - 26**) (par rapport à une concentration initiale en extrait protéique de 8 % w/w) comme le montrent les images obtenues précédemment par microscopie optique (**Figure II - 16**, **Figure II - 17**). Le diamètre moyen des gouttelettes en émulsion est lui aussi réduit de 1,28 μm à 0,81 μm lorsque la concentration initiale en extrait protéique est plus faible. Il est probable que dans l'émulsion plus concentrée, la coalescence des gouttelettes est légèrement plus importante du fait de leur proximité dans le réseau polymérique aggloméré.

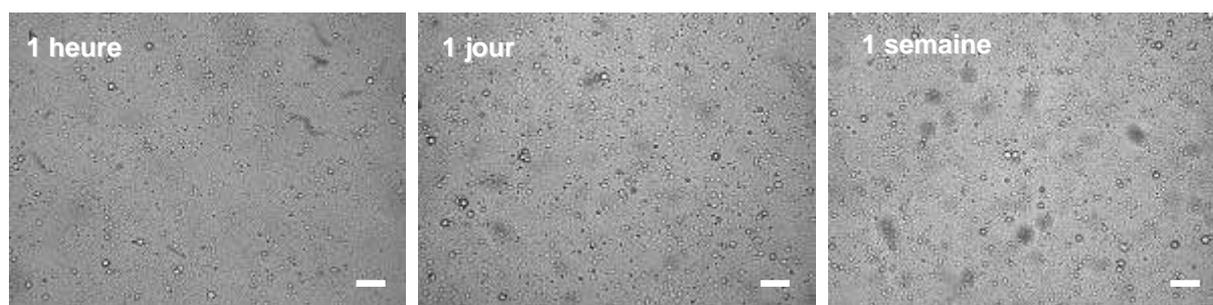


Figure II - 26. Microscopie optique : évolution dans le temps de la morphologie de l'émulsion PT/T préparée à partir de la solution protéique à 6 % w/w. Barre d'échelle - 10 μm .

Malgré tout, tant que l'émulsion reste stable, sans coalescence importante des gouttelettes de la phase dispersée, l'agglomération des gouttelettes par le réseau protéique observée dans l'émulsion réalisée à partir d'une solution protéique à 8 % w/w n'empêche pas l'atomisation de l'émulsion.

II.5.6.2. Influence sur les propriétés des microparticules

Le **Tableau II - 14** présente le rendement d'atomisation et les propriétés des microparticules obtenues à partir des émulsions étudiées dans le paragraphe précédent. Les résultats obtenus après atomisation démontrent que la concentration de la solution protéique n'a pas d'influence remarquable sur le rendement d'atomisation ni sur la taille moyenne des microparticules, du moins dans la gamme de concentration étudiée. Par contre, l'efficacité de microencapsulation est plus faible lorsque la concentration en extrait protéique est réduite à 6 % w/w.

Tableau II - 14. Influence de la concentration de la solution protéique sur le rendement d'atomisation et les propriétés des microparticules PT/T.

Concentration de la solution protéique*, % w/w	RA, %	EME, %	TME, %	Diamètre moyen, μm
8	70,0	92,6 \pm 1,8	30,5 \pm 0,6	6,9 \pm 0,03
6	67,4	70,5 \pm 2,8	23,3 \pm 0,9	6,7 \pm 0,05

* - ratio extrait protéique/T de 1/0,5

Pendant l'étape d'émulsification, de par leurs propriétés tensioactives, les chaînes protéiques s'adsorbent à la surface des gouttelettes de l' α -tocophérol. La matière active ainsi entourée par les chaînes polymériques de la matière enrobante est protégée pendant l'atomisation. Il est probable que, pour le même ratio matière enrobante/matière active, cette protection est meilleure dans le cas d'une émulsion plus visqueuse. Selon Ré [334], dans une émulsion à faible viscosité, le mouvement des gouttelettes de la matière active liquide est plus rapide, ce qui

provoque le déplacement de ces gouttelettes vers la surface des microgouttes atomisées et donc la perte de la matière active plus importante pendant atomisation.

La **Figure II - 27** représente les images obtenues par MEB des microparticules extrait protéique/ α -tocophérol préparées à partir des émulsions avec les solutions protéiques concentrées à 6 % w/w ou à 8 % w/w. Dans les deux cas, les particules ont une morphologie sphérique, avec une surface lisse sans fissures ni ruptures. La taille des microsphères allant de 2 μ m à 15 μ m confirme les valeurs obtenues par granulométrie. Aucune différence remarquable de morphologie n'est observée entre les deux essais.

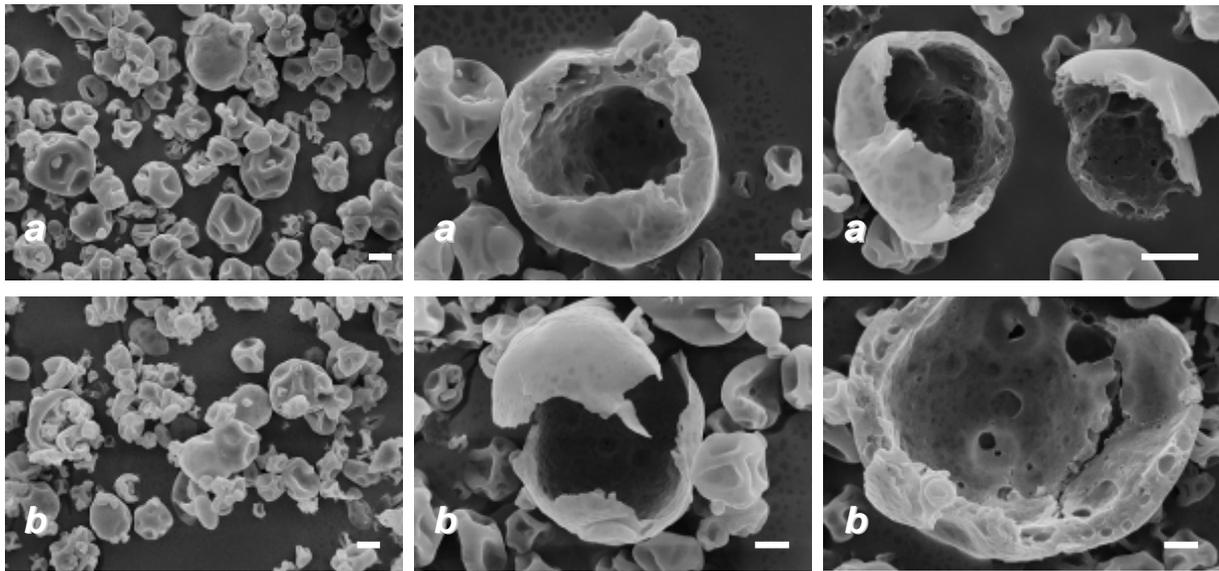


Figure II - 27. Images MEB de la morphologie des microparticules de l' α -tocophérol encapsulé par l'extrait protéique de tournesol ; (a) PT/T préparé à partir d'une solution protéique à 8 % w/w et (b) PT/T préparé à partir d'une solution protéique à 6 % w/w. Barre d'échelle - 2 μ m.

Pour récapituler, la concentration de matière enrobante a une influence importante sur le procédé d'encapsulation. Un pourcentage plus élevé en matériau enrobant permet d'obtenir une microencapsulation plus efficace tant du point de vue du rendement d'atomisation que du taux de microencapsulation.

II.6. Microencapsulation de l'acide ascorbique par l'extrait protéique de soja

Après avoir étudié et démontré les bonnes propriétés de microencapsulation des extraits protéiques de soja et de tournesol vis-à-vis d'une matière active hydrophobe, nous avons également voulu tester leur comportement vis-à-vis d'une matière active hydrophile et hydrosoluble modèle : l'acide ascorbique.

II.6.1. Acide ascorbique : matière active hydrophile modèle

La vitamine C est le nom plus commun donné à l'acide ascorbique. Dans la nature, cette vitamine est présente dans la majorité des fruits et légumes existants. Les propriétés bénéfiques de l'acide ascorbique sont principalement sa bioactivité et ses propriétés antioxydantes. Cependant, cette molécule est instable sous l'action de l'oxygène, de la lumière et de la chaleur, car elle s'oxyde rapidement [335]. L'effet antioxydant de l'acide ascorbique est illustré sur la Figure II - 28.

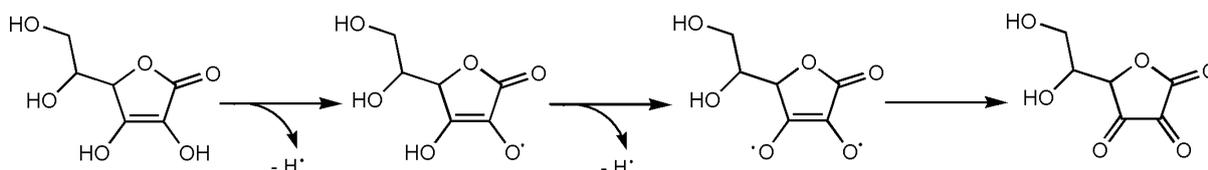


Figure II - 28. Représentation schématique de l'oxydation (effet antioxydant) de l'acide ascorbique [336].

La microencapsulation de l'acide ascorbique est tout à fait pertinente afin de la protéger contre l'oxydation et la dégradation. La microencapsulation de ce principe actif avec différentes matières enrobantes, telles que l'amidon, la cyclodextrine, la cellulose, la gomme d'acacia ou les protéines de pois, par la technique d'atomisation a été étudiée par plusieurs auteurs [83,84,223]. Il a été démontré que l'encapsulation 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.

II.6.2. Conditions opératoires du procédé de microencapsulation

Dans cette partie, la microencapsulation de l'acide ascorbique avec l'extrait protéique de soja par atomisation est évaluée. Contrairement à l' α -tocophérol, l'acide ascorbique est un composé hydrosoluble. La préparation de la phase liquide consiste donc seulement en la solubilisation de l'acide ascorbique dans la solution protéique. Le problème rencontré pendant la réalisation de ces préparations est le caractère acide du principe actif, qui influence la conformation des protéines en milieu aqueux et favorise leur précipitation.

Pour étudier l'influence des différents facteurs tels que l'homogénéisation sous haute pression, le pH et la température de la préparation de solution sur le procédé de la microencapsulation, six préparations ont été réalisées dans différentes conditions (Tableau II - 15). Selon ces conditions :

- l'acide ascorbique est ajouté dans la solution protéique sans ajustement du pH final (PS/AA 1 et PS/AA 2) ;
- l'acide ascorbique est ajouté dans la solution protéique avec ajustement du pH final et resolubilisation de la fraction protéique (PS/AA 3 et PS/AA 4) ;
- l'extrait protéique et l'acide ascorbique sont mis en solution et le pH de la solution est ajusté à 10,5 avant l'agitation (PS/AA 5 et PS/AA 6).

Les préparations liquides sont réalisées à partir d'une solution protéique concentrée à 8 % w/w, le ratio l'extrait protéique/acide ascorbique est de 1/0,5. Les solutions (traitées par homogénéisation sous haute pression ou non) sont ensuite atomisées.

Tableau II - 15. Conditions opératoires de la réalisation de préparation liquide PS/AA avant atomisation.

Conditions		Agitation de la solution protéique, puis l'addition d'AA				Agitation PS et AA	
		PS/AA 1	PS/AA 2	PS/AA 3	PS/AA 4	PS/AA 5	PS/AA 6
Solution PS	pH	6,8	6,8	6,8	10,5	-	-
	T, °C	25	25	25	70	-	-
Solution PS+AA	pH	-	-	-	-	10,5	10,5
	T, °C	-	-	-	-	70	70
pH de la solution finale		3,8	3,8	3,8→10,4	4,4→9,4	10,2	10,2
Homogénéisation à 50 MPa		non	oui	oui	oui	oui	non

II.6.3. Microencapsulation de l'acide ascorbique et propriétés des microparticules

Le Tableau II - 16 rassemble les principaux résultats concernant l'encapsulation de l'acide ascorbique par l'extrait protéique de soja effectuée dans les différentes conditions détaillées précédemment. L'efficacité de microencapsulation est déterminée par le dosage d'oxydoréduction du diiode (Paragraphe IV.2.4.2.2, Annexe V).

D'une manière générale, les résultats obtenus montrent que le changement des conditions de préparation des solutions n'a pas d'influence notable sur la taille des microparticules et le rendement d'atomisation, à l'exception de l'échantillon PS/AA 1. Par contre, ces conditions influencent la viscosité des préparations et l'efficacité de microencapsulation.

Tableau II - 16. Caractérisation des solutions et microparticules à base d'extrait protéique de soja et d'acide ascorbique.

Paramètre mesuré	PS/AA 1*	PS/AA 2*	PS/AA 3*	PS/AA 4*	PS/AA 5*	PS/AA 6*
Viscosité de la solution, mPa*s	6,8	17,1	10,5	11,9	8,9	14,3
RA, %	51,6	78,1	80,8	80,4	80,7	86,9
EME, %	98,2±3,6 ^a	97,1±4,6 ^a	78,2±4,3 ^{bc}	74,9±4,8 ^c	88,9±5,8 ^{ab}	85,6±5,9 ^{bc}
TME, %	32,4±1,2 ^a	32,0±1,5 ^a	25,8±1,4 ^{bc}	24,7±1,6 ^c	29,3±1,9 ^{ab}	28,2±2,0 ^{bc}
Diamètre moyen des microparticules, µm	21,0±0,4 ^b	5,9±0,1 ^b	5,3±0,01 ^c	5,3±0,1 ^{bc}	5,1±0,2 ^c	5,2±0,1 ^c

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/AA de 1/0,5

^{a-c} -différentes lettres dans la même ligne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

Les valeurs d'efficacité de microencapsulation les plus élevées sont obtenues pour des préparations PS/AA 1 et PS/AA 2 réalisées avec un pH final acide (3,8). La précipitation des protéines après l'ajout d'acide ascorbique entraîne la formation d'agglomérats. La rétention de la matière active au sein de ces agglomérats protéiques est ainsi meilleure. Pierruci *et al.* [84] notent qu'au pH acide, l'exposition des charges positives des acides aminés permet les interactions favorables entre l'acide ascorbique et l'extrait protéique de pois. Ces interactions entraînent une amélioration de l'efficacité de microencapsulation par les protéines (101,9 %) par rapport à celle obtenue avec la carbométhylcellulose (84,6 %).

L'étape d'homogénéisation sous haute pression a aussi un effet favorable sur le procédé car elle permet d'augmenter le rendement d'atomisation de 51,6 % à 78,1 % (pour les préparations PS/AA 1 et PS/AA 2 respectivement). En effet, la force mécanique appliquée pendant l'homogénéisation permet de disperser les agrégats protéiques formés après la précipitation. La préparation liquide est ainsi plus homogène, ce qui diminue les pertes pendant l'atomisation.

La resolubilisation des protéines (PS/AA 3 et PS/AA 4), quel que soit le pH initial de la solution protéique (6,8 et 10,5 respectivement), entraîne une réduction de l'efficacité de microencapsulation de l'acide ascorbique par rapport aux préparations PS/AA 1 et PS/AA 2. Ainsi, la resolubilisation des protéines ne permet pas une aussi bonne protection de la matière active hydrosoluble, que dans le cas où les chaînes protéiques sont, du moins partiellement, précipitées.

D'autre part, les préparations PS/AA 5 et PS/AA 6 se montrent très efficaces tant pour le rendement d'atomisation (80,7 % et 86,9 % respectivement) que pour l'efficacité de microencapsulation (88,9 % et 85,6 % respectivement). Dans le cas de ces deux préparations, l'homogénéisation sous haute pression n'a pas d'influence remarquable sur les propriétés des microparticules.

Les résultats obtenus au cours de ces expériences sont comparables à ceux rapportés dans la littérature, voire meilleurs. Desai et Park [325] ont étudié l'encapsulation de l'acide ascorbique par du chitosane réticulé. Ils obtiennent des rendements d'atomisation compris entre 61,1 % et 62,8 %, et des efficacités de microencapsulation de 45,1 % à 58,3 %. D'autres études traitant de la microencapsulation de l'acide ascorbique par atomisation (avec différents matières enrobantes) montrent des efficacités d'encapsulation de l'ordre de 30-40 % pour des mélanges amidon/ β -cyclodextrine [337], 97 % pour la maltodextrine [338], 99 % pour la gomme arabique [339], 101,0 % pour des mélanges carbométhylcellulose/maltodextrine et 95,9 % pour des mélanges extrait protéique de pois/maltodextrine [84].

Les distributions de taille des microparticules extrait protéique/acide ascorbique préparées dans les différentes conditions sont très similaires, à l'exception de l'échantillon PS/AA 1 (Figure II - 29) qui possède des agglomérats de grande taille comme expliqué précédemment. Les diamètres moyens des microparticules (5-21 μm) sont comparables à ceux décrits dans la littérature pour des particules à base d'acide ascorbique préparées par atomisation avec des matériaux enrobants différents : 8,2 μm pour des mélanges extrait protéique de pois/maltodextrine [84], 8,0 μm pour la gomme arabique et 20,5 μm pour l'amidon [339].

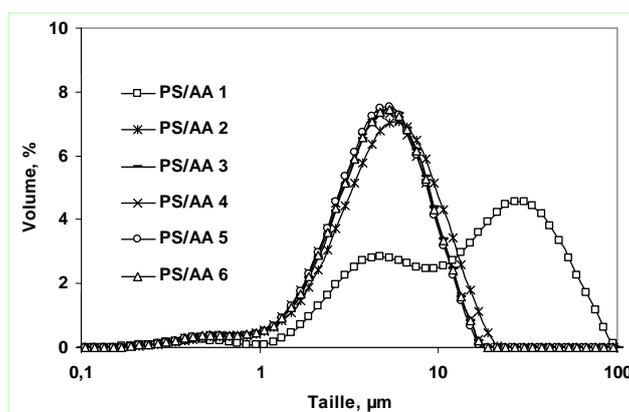


Figure II - 29. Distributions de taille des microparticules PS/AA préparées dans les différentes conditions.

Les images obtenues par MEB (Figure II - 30) montrent que les microparticules à base d'acide ascorbique sont constituées d'une enveloppe dense et d'un intérieur creux. Cette morphologie se différencie de celle des particules à base d' α -tocophérol observée précédemment. La porosité des microparticules réalisées avec des extraits protéiques et l' α -tocophérol s'explique principalement par la présence des gouttelettes de matière active hydrophobe dispersées dans les particules. Alors que dans le cas de l'acide ascorbique, la dispersion de la poudre cristalline

de la matière active dans la matrice protéique entraîne la formation d'une paroi de microparticule dense et non poreuse.

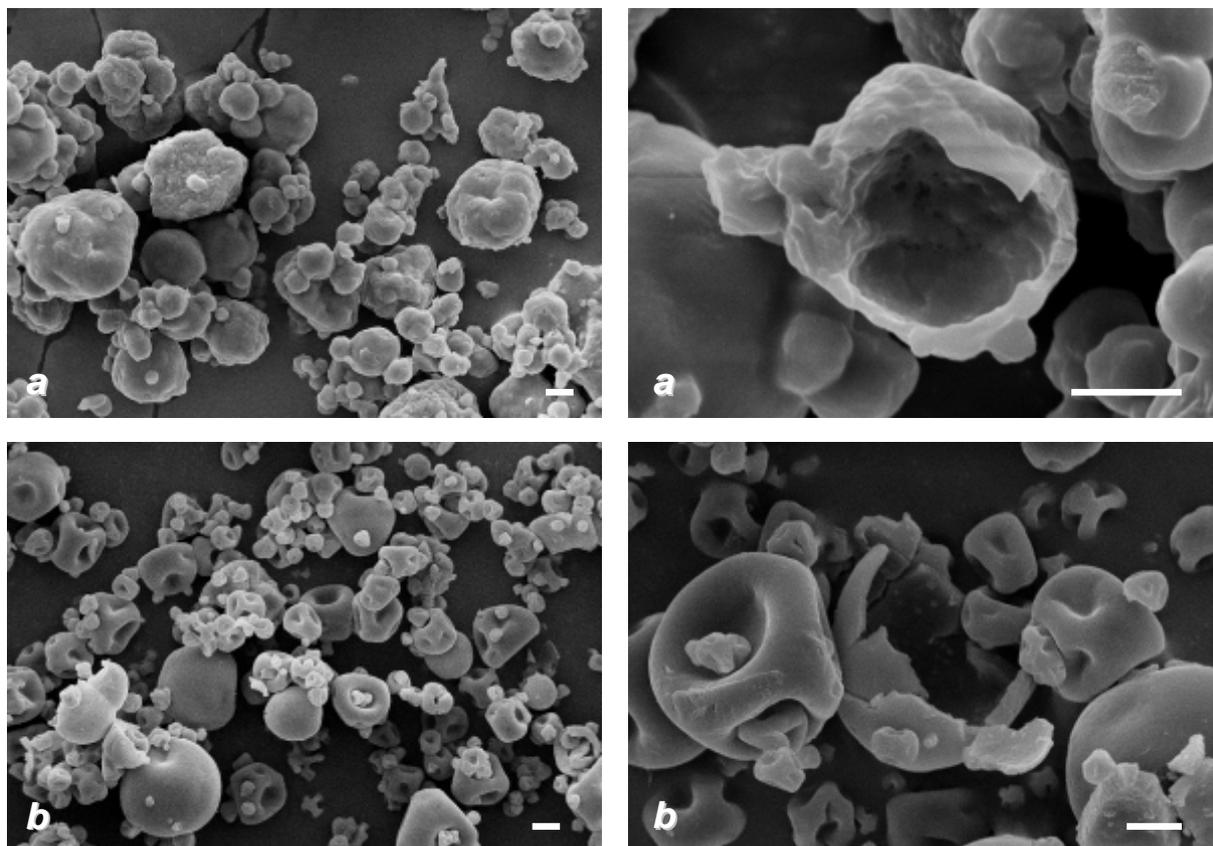


Figure II - 30. Images MEB de la morphologie des microparticules (a) PS/AA 2 et (b) PS/AA 5. Barre d'échelle – 2 μm .

Nous pouvons également constater que les microparticules issues de la préparation PS/AA 2 possèdent une surface plutôt rugueuse, ce qui prouve la présence d'agrégats protéiques, car l'échantillon est préparé avec les protéines précipitées (pH 3,8). Par contre, dans le cas de l'extrait protéique solubilisé avant atomisation (PS/AA 5), les microparticules obtenues sont sphériques avec une surface beaucoup plus lisse.

Les résultats obtenus dans cette partie démontrent l'efficacité de l'extrait protéique à encapsuler une matière active hydrosoluble. En terme de rendement d'atomisation et d'efficacité de microencapsulation, les conditions PS/AA 2 et PS/AA 5 sont les plus favorables pour encapsuler l'acide ascorbique par l'extrait protéique de soja, validant la pertinence de l'étape d'homogénéisation sous haute pression, même dans le cas d'une matière active hydrosoluble.

II.7. Conclusions

Tous les résultats obtenus au cours de ce chapitre permettent de conclure que la microencapsulation est un procédé complexe qui peut être influencé par plusieurs paramètres, notamment les conditions d'émulsification, la concentration en matériau enrobant (extrait protéique), la composition et la structure des extraits protéiques, la nature de la matière active et le ratio matière enrobante/matière active.

L'étude menée sur l'étape d'émulsification de la matière active hydrophobe dans la solution protéique a permis d'observer que la pression d'homogénéisation influence la conformation des chaînes protéiques et favorise leur déploiement dans la solution. La technique d'homogénéisation sous haute pression donne la possibilité d'obtenir des émulsions homogènes et stables jusqu'à une semaine. En outre, les bonnes propriétés de surface des protéines permettent de stabiliser des gouttelettes d'huile fines (taille proche de 1 μm) sans ajout d'agent tensioactif.

Les deux extraits protéiques utilisés ont donné des résultats très satisfaisants en terme de rendement d'atomisation et d'efficacité de microencapsulation. Nous avons montré que les microparticules obtenues peuvent être chargées en matière active hydrophobe jusqu'à 80 % w/w. Ce résultat est assez remarquable, car généralement, les particules préparées par atomisation contiennent entre 10 % et 50 % de la matière active. Les microparticules obtenues dans les différentes conditions opératoires possèdent des tailles moyennes comprises entre 5 μm et 80 μm .

La concentration du matériau enrobant et de la matière active (hydrophobe) sont les paramètres essentiels dans le procédé d'encapsulation. L'augmentation de concentration de l'extrait protéique ou de l' α -tocophérol se traduit par la hausse de la taille des gouttelettes en émulsion, de la viscosité de l'émulsion, de l'efficacité de microencapsulation et du diamètre moyen des microparticules.

L'extrait protéique de soja, déjà étudié dans la littérature et utilisé commercialement comme matière enrobante, a confirmé au cours de cette étude ses capacités à encapsuler efficacement une matière active hydrophobe (α -tocophérol) ou hydrophile (acide ascorbique).

L'extrait protéique de tournesol représente une matière enrobante nouvelle et originale pour la microencapsulation. L'utilisation de ce biopolymère en microencapsulation n'est pas encore connue, d'où la particularité et l'originalité de ce travail.

L'extrait protéique de tournesol s'avère être une matrice appropriée pour l'encapsulation de la matière active hydrophobe. La morphologie plus dense du réseau protéique de tournesol, ainsi que le taux plus élevé en polysaccharides permettent d'obtenir une meilleure efficacité de

microencapsulation par rapport à l'extrait protéique de soja (92,6 % contre 79,7 % respectivement). Les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives quant à la valorisation d'extrait protéique de tournesol.

The background of the slide is a collage of scanning electron microscope (SEM) images of microcapsules. The images show various sizes and shapes of spherical particles, some with smooth surfaces and others with porous or textured exteriors. The particles are arranged in a grid-like pattern, with larger images in the corners and smaller ones in the center. The overall color scheme is light green and white, with a dark green border at the top and bottom.

CHAPITRE III

Modifications des Extraits Protéiques et Effet sur la Microencapsulation

III.1. Introduction

Comme décrit dans l'étude bibliographique, les modifications chimiques ou enzymatiques des protéines, telles que la réaction de Maillard, l'hydrolyse, la réticulation, la déamidation et l'acylation ont été étudiées par de nombreux auteurs (Paragraphe I.2.4.2). Ces modifications permettent d'améliorer les propriétés fonctionnelles et physico-chimiques des biopolymères, afin de les rendre plus adaptés pour les applications souhaitées.

En revanche, l'influence des modifications des protéines, notamment de soja et de tournesol, sur leur utilisation en tant que matériau enrobant en microencapsulation de principes actifs n'a pas encore été étudiée dans la littérature. Ainsi, ce chapitre a pour objectif d'étudier la modification des extraits protéiques dans le but d'augmenter leur efficacité en tant qu'agents enrobants en microencapsulation de principes actifs.

Pour cela, quatre différentes voies de modification ont été effectuées sur les extraits protéiques (de soja et de tournesol) :

- l'hydrolyse enzymatique ;
- le greffage d'une chaîne hydrophobe (acylation) ;
- la réticulation enzymatique ;
- le greffage d'un groupement hydrophile (cationisation).

Ce chapitre est divisé en quatre parties majeures, chacune de ces parties étant consacrée à l'une des modifications citées ci-dessus.

Dans chacune des parties, l'influence des conditions opératoires sur le taux de modification des protéines est étudiée. Ensuite, l'effet de cette modification sur l'utilisation des extraits protéiques en tant que matériau enrobant en microencapsulation est évalué.

Nous venons d'optimiser dans le chapitre précédent les conditions opératoires du procédé avec les extraits protéiques natifs. Ces conditions sont utilisées pour les essais de microencapsulation avec les extraits protéiques modifiés.

La dernière partie de ce chapitre concerne une étude du relargage de la matière active. Les propriétés de libération des microparticules à base d'extraits protéiques natifs sont comparées avec celles à base d'extraits protéiques modifiés.

III.2. Microencapsulation par les extraits protéiques hydrolysés

L'hydrolyse enzymatique des protéines végétales est décrite comme une modification permettant d'augmenter les propriétés émulsifiantes et moussantes, ainsi que la solubilité des isolats protéiques (Tableau I - 8).

En microencapsulation, la réduction de la taille des chaînes protéiques par hydrolyse et l'augmentation de la solubilité des hydrolysats pourraient améliorer la stabilité des émulsions. Ce changement des propriétés fonctionnelles devrait permettre d'obtenir un enrobage plus efficace de la matière active par les chaînes protéiques. De plus, l'hydrolyse partielle des extraits protéiques libérera de nouveaux sites hydrophobes, ce qui pourrait augmenter leur affinité avec le principe actif hydrophobe. Ainsi, le chargement des microparticules en matière active pourrait être augmenté. Toutefois, l'hydrolyse des protéines devra être modérée, afin de conserver une masse molaire suffisante pour assurer une microencapsulation efficace.

L'enzyme choisie dans notre travail pour hydrolyser des extraits protéiques est une endoprotéase nommée l'Alcalase. Cette enzyme est produite par la fermentation d'une bactérie du sol : *Bacillus licheniformis*. Elle est fréquemment utilisée pour l'hydrolyse des protéines d'origine végétale [186,187,195,196] et possède certains avantages, tels qu'une grande stabilité dans le temps, une facilité d'utilisation et un faible coût. L'activité maximale de l'Alcalase se situe à pH 6,5-8,5 et à une température de 45-65 °C. En dehors de ces conditions, la stabilité et l'activité de l'enzyme chutent de manière importante.

Dans ce sous-chapitre, les résultats de l'hydrolyse enzymatique des extraits protéiques de soja et de tournesol par l'Alcalase sont décrits. Ensuite, la taille des hydrolysats obtenus est caractérisée par la technique AsFFFF. Enfin, l'utilisation des protéines hydrolysées en tant que matériau enrobant pour la microencapsulation de l' α -tocophérol est étudiée.

III.2.1. Hydrolyse enzymatique des chaînes protéiques

Dans le cadre de cette étude, les conditions d'hydrolyse ont été inspirées du travail de Kong *et al.* [195] avec quelques modifications (Paragraphe IV.2.2.1.2). Pour évaluer l'influence du taux d'hydrolyse sur les propriétés des extraits protéiques, nous avons décidé de faire varier le degré d'hydrolyse entre 5 % et 20 %. Pour cela différents temps de réaction et des quantités d'enzyme variables ont été utilisés (Tableau III - 1).

Le taux d'hydrolyse a été déterminé par le dosage des fonctions amines libres (des lysines et des acides aminés terminaux) par la méthode OPA (Paragraphe IV.2.2.1.2, Annexe III). Pour calculer le degré d'hydrolyse, il est nécessaire de connaître la quantité de groupements amines libres dans les extraits protéiques natifs, ainsi que la quantité totale des acides aminés dans les extraits

protéiques (après l'hydrolyse totale). Ces deux grandeurs ont été déterminées au préalable par le même dosage.

Les résultats obtenus après l'hydrolyse enzymatique des protéines sont rassemblés dans le **Tableau III - 1**. Le degré d'hydrolyse augmente de 4,0-5,0 % à 18,8-23,7 % avec l'augmentation du temps de réaction et de la concentration en Alcalase. Ce résultat est en accord avec les études décrites dans la littérature [185,195].

Tableau III - 1. Conditions d'hydrolyse et degré d'hydrolyse obtenu pour les PS et PT.

Ratio enzyme/extrait protéique, U/g	Temps de la réaction, min	DH, %	
		PS	PT
0,002	15	4,0	5,0
0,005	20	7,3	12,7
0,015	40	13,2	18,6
0,025	120	18,8	23,7

En comparant les valeurs de degré d'hydrolyse obtenues dans les mêmes conditions opératoires pour les deux extraits protéiques, nous pouvons remarquer que l'extrait protéique de tournesol s'hydrolyse plus facilement. Ce comportement peut être dû au fait qu'à pH 7 auquel se déroule la réaction d'hydrolyse, l'extrait protéique de tournesol est plus soluble (**Figure II - 2**). Ainsi, l'accessibilité des liaisons peptidiques pour l'enzyme est augmentée, ce qui peut expliquer de degrés d'hydrolyse supérieurs.

Les hydrolysats protéiques obtenus ont été analysés par la technique AsFIFFF et utilisés comme matériau enrobant pour la microencapsulation de l' α -tocophérol.

III.2.2. Fractionnement des extraits protéiques natifs et hydrolysés par la technique AsFIFFF

Afin d'étudier la taille des hydrolysats par rapport aux protéines natives, les extraits protéiques de soja et de tournesol avant et après l'hydrolyse ont été analysés par la technique AsFIFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, **Annexe VI**). Comme dans le cas des extraits protéiques natifs (**Paragraphe II.3.5**), les hydrolysats sont analysés selon trois populations : P1, P2 et P3 (**Annexe VI, Figure A-7**).

Les fractogrammes des extraits protéiques de soja natifs et hydrolysés obtenus sont présentés sur la **Figure III - 1**. Nous pouvons observer que l'extrait protéique natif possède des chaînes de plus grande taille que les hydrolysats. Sur le fractogramme de l'extrait protéique natif, les pics à 14-15 min et à 17-19 min confirment la présence de macromolécules de grandes tailles en

quantité importante. On remarque clairement la réduction de l'aire de ces pics avec l'augmentation du degré d'hydrolyse des protéines.

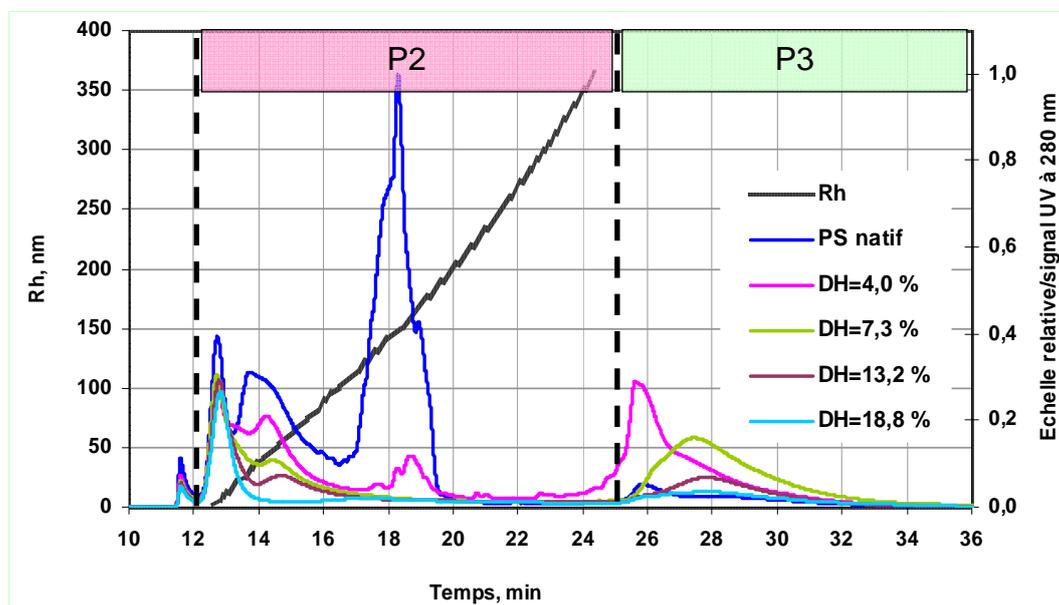


Figure III - 1. Fractogrammes AsFIFFF des extraits protéiques de soja natifs et hydrolysés (méthode II, [Paragraphe IV.2.4.3](#), [Annexe VI](#)).

Sur le fractogramme de l'extrait protéique natif, la fraction majoritaire, composée de chaînes protéiques de grande taille, se situe entre 17-19 minutes. Cette population diminue significativement lors de l'hydrolyse, même pour des degrés d'hydrolyse relativement faibles (DH=4 %), et disparaît totalement pour des degrés d'hydrolyse supérieurs ou égaux à 7 %.

Par contre on remarque l'augmentation, pour les premiers hydrolysats (DH=4,0 % et 7,3 %) de la population correspondant aux macromolécules non fractionnées (P3) qui sont en fait des agrégats de grande taille, alors que ces macromolécules ne sont pas observées sur le fractogramme de l'extrait protéique natif.

Pour expliquer ce phénomène, nous proposons l'hypothèse suivante. A l'état natif, la majorité des chaînes protéiques se trouvent sous forme de macromolécules. Pour les faibles taux d'hydrolyse, les coupures ont probablement lieu sur le pourtour de la macromolécule protéique libérant partiellement des peptides. Cette rupture de liaisons intramoléculaires et intermoléculaires conduit au déploiement des protéines (rayon hydrodynamique augmente) et à l'exposition de fonctions SH à l'environnement. Ces dernières peuvent alors réagir avec d'autres fonctions SH pour créer de nouvelles liaisons intermoléculaires (rayon hydrodynamique augmente). Ainsi, les macromolécules des extraits protéiques de soja faiblement hydrolysés ont des rayons hydrodynamiques plus importants que les particules des protéines natives comme

présenté sur la **Figure III - 2**. Une hydrolyse plus poussée ($DH \geq 13,2\%$) favorise la dégradation des polymères protéiques, ce qui conduit à la diminution du rayon hydrodynamique.

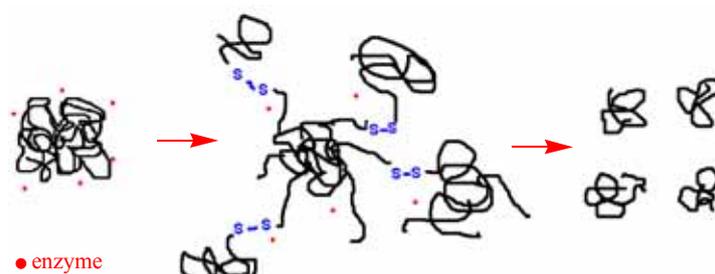


Figure III - 2. Changement de conformation des protéines de soja pendant l'hydrolyse enzymatique.

Concernant l'extrait protéique de soja, nous pouvons observer que les macromolécules de l'extrait natif (P2) ont les rayons hydrodynamiques les plus importants, variant entre 20 nm et 180 nm avec des populations majoritaires à 40-60 nm et à 130-180 nm. Parallèlement, la taille de la fraction majoritaire de chaque hydrolysats ne dépasse pas 100 nm. De plus, cette taille diminue avec l'augmentation du degré d'hydrolyse.

Les extraits protéiques de tournesol natifs et hydrolysés ont également été analysés par la technique AsFFFF. Les conditions utilisées pour l'analyse ont été identiques à celles d'extraits protéiques de soja. Les fractogrammes résultants sont présentés sur la **Figure III - 3**. On observe un comportement similaire à celui des extraits protéiques de soja. Dans le cas de l'extrait protéiques natif de tournesol, la présence d'une fraction de taille plus élevée est observée entre 13 min et 15 min. L'hydrolyse influence la réduction de la taille des chaînes, la diminution de cette population et son décalage vers la gauche. Par contre, la fraction de macromolécules de grande taille non fractionnées (P3) reste identique quel que soit le degré d'hydrolyse des protéines de tournesol.

En tenant compte de notre précédente hypothèse (la formation d'agrégats de grande taille dans l'extrait protéique de soja faiblement hydrolysé), on remarque qu'aux mêmes taux d'hydrolyse, les macromolécules de protéines de tournesol ne subissent pas le même phénomène. Probablement, dans les conditions utilisées (pH 9,0), la structure des macromolécules de protéines de tournesol est moins compacte. En effet, leur solubilité est supérieure à celle des protéines de soja au même pH. La faible hydrolyse ne provoque pas l'effet de libération des chaînes peptidiques. De plus, la fraction de cystéine (acide aminé qui participe à la formation des liaisons S-S) est plus importante dans l'extrait protéique de soja : 0,9 g/100 g (contre 0,5 g/100 g

pour l'extrait protéique de tournesol, [Tableau II - 2](#)). Ainsi, mieux réparties dans la solution, les protéines de tournesol s'associent moins par les ponts disulfures.

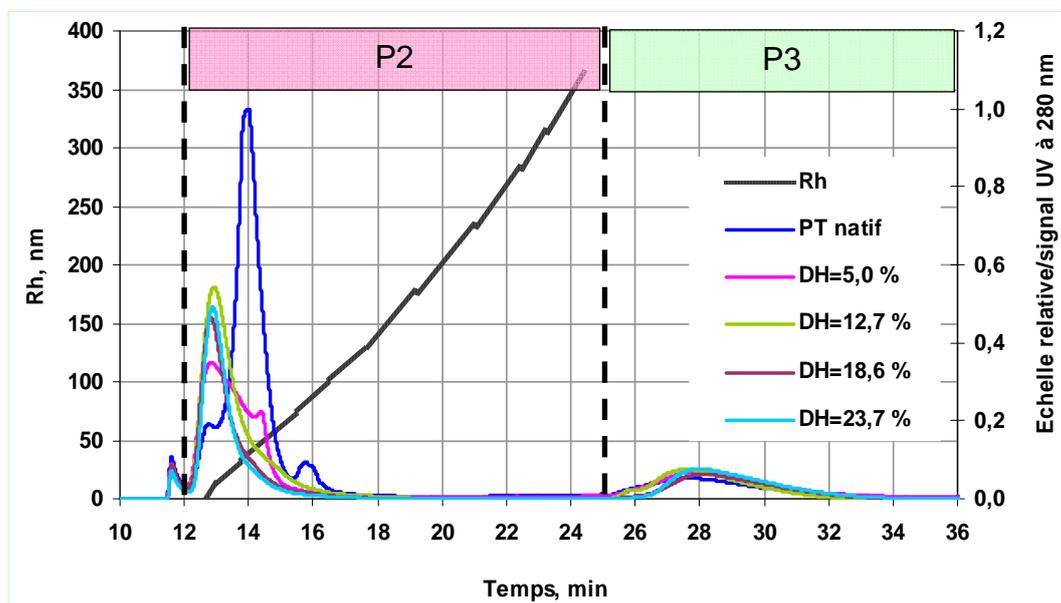


Figure III - 3. Fractogrammes AsFIFFF des extraits protéiques de tournesol natifs et hydrolysés (méthode II, [Paragraphe IV.2.4.3](#), [Annexe VI](#)).

Les tailles des macromolécules de l'extrait protéique natif de tournesol varient entre 20 nm et 100 nm avec une fraction majoritaire autour de 40-50 nm. Les macromolécules des hydrolysats protéiques de tournesol fractionnées ont des rayons hydrodynamiques majoritairement de l'ordre de 20-60 nm. Avec l'augmentation du degré d'hydrolyse, la fraction de ces macromolécules diminue visiblement.

Comme dans le cas du fractionnement des extraits protéiques natifs ([Paragraphe II.3.5](#)), la fraction des petites particules (P1) peut être déterminée en utilisant une courbe de calibration ([Annexe VI](#)). Également, à l'aide de l'aire des pics sur le fractogramme, la proportion des grosses macromolécules non fractionnées (P3) dans chaque échantillon peut être déterminée.

La [Figure III - 4](#) et le [Tableau III - 2](#) représentent les pourcentages des populations P1 et P3 dans les extraits protéiques de soja et de tournesol natifs et hydrolysés. Pour les deux extraits protéiques analysés, la population P1 augmente avec la hausse du degré d'hydrolyse des protéines. Cette population est plus importante dans les extraits protéiques de tournesol natifs et hydrolysés (DH de 5 %) par rapport à ceux de soja. En revanche, la population P3 reste invariable dans le cas de l'extrait protéique de tournesol et augmente pour les faibles degrés d'hydrolyse (4-7 %) dans le cas de l'extrait protéique de soja.

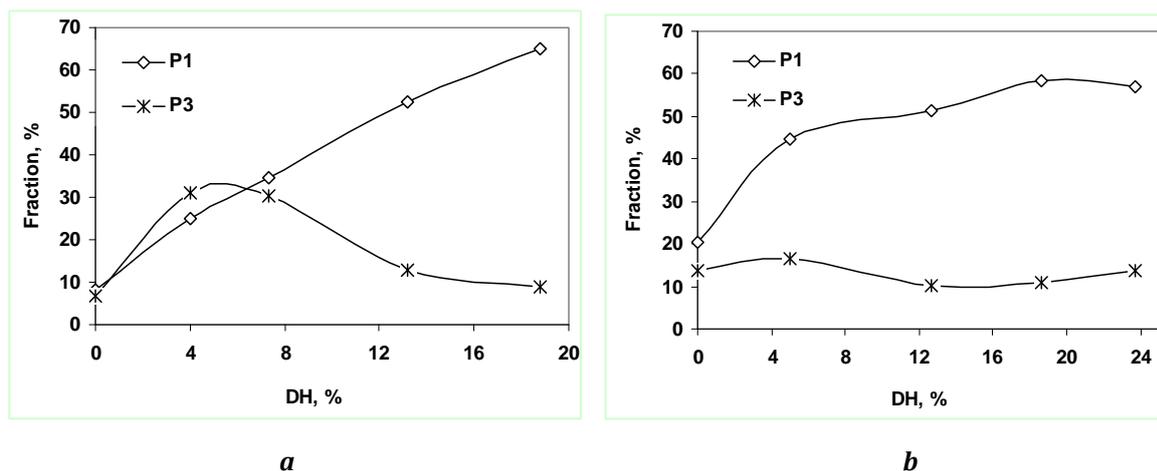


Figure III - 4. Evolution des populations P1 et P3 pour les PS (a), PT (b) et des hydrolysats correspondants.

Tableau III - 2. Pourcentages des populations P1 et P3 pour les PS (a), PT (b) et des hydrolysats correspondants.

PS			PT		
DH, %	P1, %	P3, %	DH, %	P1, %	P3, %
0	8,3	6,9	0	20,5	13,7
4,0	24,9	31,1	5,0	44,7	16,4
7,3	34,7	30,4	12,7	51,4	10,2
13,2	52,5	12,9	18,6	58,5	10,9
18,8	65,0	8,9	23,7	57,1	13,9

Pour conclure, dans le cas de deux extraits protéiques (soja et tournesol), on observe une grande polydispersité des tailles de macromolécules, que ce soit les protéines natives ou les hydrolysats.

III.2.3. Propriétés des émulsions d'extraits protéiques hydrolysés et d' α -tocophérol

Dans le but d'étudier les propriétés émulsifiantes des protéines végétales hydrolysées, des émulsions du type huile dans eau à base d'extraits protéiques de soja ou de tournesol hydrolysés et d' α -tocophérol ont été préparées à partir d'une solution protéique concentrée à 8 % w/w et stabilisées par homogénéisation sous haute pression (50 MPa, 2 passages par homogénéisateur) comme décrit dans le [Paragraphe IV.2.3.2.1](#).

La viscosité des émulsions a été mesurée après l'étape d'homogénéisation et la taille des gouttelettes dans les émulsions stabilisées a également été évaluée ([Tableau III - 3](#)). L'analyse des émulsions a été réalisée 1 heure après l'homogénéisation sous haute pression. Comme nous l'avons expliqué dans le cas des extraits protéiques natifs, avant l'étape d'émulsification, la pré-

émulsion n'est pas homogène, elle est constituée de deux phases (solution aqueuse protéique et α -tocophérol). Afin d'évaluer l'influence des modifications sur le comportement rhéologique des protéines, la viscosité des solutions protéiques avant homogénéisation a également été mesurée.

Avant l'étape d'homogénéisation, nous constatons une réduction importante de la viscosité des solutions avec l'hydrolyse, quel que soit le degré d'hydrolyse. La viscosité passe de 250 mPa*s pour l'extrait protéique natif de tournesol à 5,6 mPa*s pour l'extrait protéique hydrolysé à 5 %. Elle diminue ensuite progressivement jusqu'à 3 mPa*s quand le degré d'hydrolyse augmente de 5 % à 23,7 %. L'étape d'homogénéisation sous haute pression ne change pas le comportement rhéologique des émulsions réalisées avec les hydrolysats protéiques.

Le diamètre moyen des gouttelettes dans les émulsions à base d'extrait protéique de soja et d' α -tocophérol diminue de moitié après l'hydrolyse des protéines à seulement 4 %. En revanche, dans le cas des émulsions préparées avec l'extrait protéique de tournesol hydrolysé, on observe une augmentation de taille des gouttelettes aux faibles degrés d'hydrolyse et une réduction de taille pour des degrés d'hydrolyse de 18,6 % et 23,7 %.

Tableau III - 3. Influence du degré d'hydrolyse des extraits protéiques sur les propriétés des solutions protéiques et des émulsions PS/T et PT/T.

	DH, %	Viscosité, mPa*s		Diamètre moyen des gouttelettes, μm
		Solution protéique avant homogénéisation	Emulsion après homogénéisation	
PS/T*	-	44	15,1	1,1
	4,0	3,7	3,6	0,5
PT/T*	-	250	36,1	1,3
	5,0	5,6	5,2	1,7
	12,7	4,0	4,0	1,6
	18,6	3,6	3,6	0,8
	23,7	3,0	2,9	0,7

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

La viscosité d'une solution de polymère est reliée à la masse molaire des macromolécules par la relation de Mark-Houwink [340] :

$$[\eta] = KM^\alpha$$

avec $[\eta]$ - la viscosité intrinsèque ;

K - paramètre constant pour un système donné ;

α - varie de 0,5 à 2,0 en fonction du système polymère/solvant ;

M - la masse molaire du polymère.

Dans notre cas, l'hydrolyse entraîne la réduction de la longueur des chaînes protéiques et donc de leur masse molaire. Cela aura une action directe sur la viscosité des émulsions, car les protéines en sont les constituants majeurs.

La présence de courtes chaînes protéiques, de par leurs propriétés tensioactives, permet une meilleure stabilisation de l' α -tocophérol dans l'émulsion. Pendant l'homogénéisation, les gouttelettes d'huile dispersées sont immédiatement entourées par les chaînes protéiques qui sont courtes et donc très mobiles. L'émulsion ainsi formée est bien protégée contre la coalescence.

Les distributions de taille des gouttelettes d' α -tocophérol dans les émulsions avec l'extrait protéique de tournesol hydrolysé sont présentées sur la **Figure III - 5**. On observe que quel que soit le degré d'hydrolyse de l'isolat protéique, les émulsions obtenues contiennent des gouttelettes de petites tailles situées autour de 1 μm .

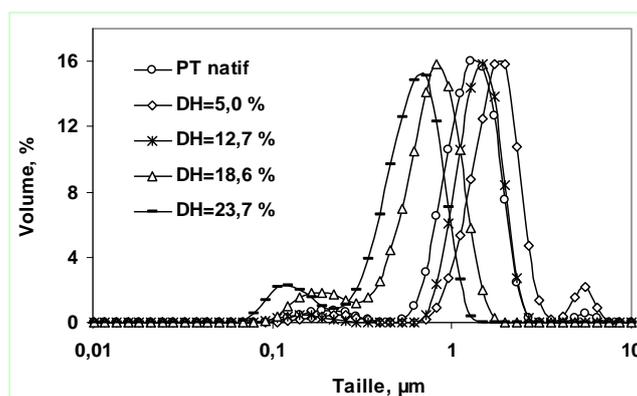


Figure III - 5. Influence du degré d'hydrolyse de l'extrait protéique sur les distributions de taille des gouttelettes de l' α -tocophérol en émulsion PT/T.

La morphologie des émulsions préparées avec des extraits protéiques hydrolysés et de l' α -tocophérol est observée par microscopie optique (**Figure III - 6**).

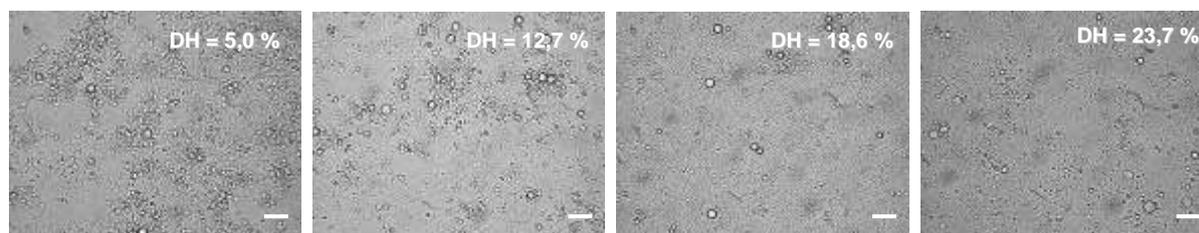


Figure III - 6. Microscopie optique : influence du degré d'hydrolyse de l'extrait protéique sur la morphologie des émulsions PT/T. Barre d'échelle - 10 μm .

Les émulsions présentent une bonne homogénéité au niveau de la taille des gouttes de matière active dispersée. Après l'hydrolyse, la taille des agrégats protéiques de tournesol est sensiblement réduite, jusqu'à leur disparition totale pour les degrés d'hydrolyse de 18,6 % et 23,7 %.

Pour conclure, l'extrait protéique de tournesol hydrolysé aux taux élevés (18,6-23,7 %) permet de mieux stabiliser l'émulsion (grâce à la présence des courtes chaînes peptidiques) et d'obtenir des tailles moyennes des gouttelettes inférieures à celles des émulsions avec les extraits protéiques faiblement hydrolysés ou natifs. Néanmoins, quel que soit le degré d'hydrolyse, les extraits protéiques se montrent efficaces pour stabiliser les émulsions huile dans eau avec des tailles de gouttelettes satisfaisantes. Maintenant, l'atomisation de ces préparations peut donc être envisagée dans le but d'encapsuler le principe actif par les extraits protéiques hydrolysés.

III.2.4. Propriétés des microparticules d'extraits protéiques hydrolysés et d' α -tocophérol

Les résultats obtenus après la microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques de soja et de tournesol hydrolysés sont rassemblés dans le **Tableau III - 4**. Dans le cas des deux protéines, une perte en efficacité de microencapsulation après l'hydrolyse est observée. La réduction de l'efficacité est très importante pour les isolats protéiques de soja. L'hydrolyse des chaînes protéiques de soja à un degré d'hydrolyse de seulement 4 % entraîne une diminution de l'efficacité de microencapsulation de 50 % (de 79,7 % à 38,9 %). Pour l'extrait protéique de tournesol, cette réduction de l'efficacité est moins marquée. Elle diminue de 92,6 % (particules avec l'extrait protéique natif) à 61,8 % (particules avec l'extrait protéique hydrolysé à 23,7 %). Nous remarquons également que le diamètre des microparticules augmente significativement pour des degrés d'hydrolyse supérieurs à 10 %.

Tableau III - 4. Influence du degré d'hydrolyse des protéines sur les propriétés des microparticules PS/T et PT/T.

	DH, %	RA, %	EME, %	TME, %	Diamètre moyen des microparticules, μm
PS/T*	-	67,9	79,7 \pm 1,0 ^b	26,3 \pm 0,3 ^b	9,3
	4,0	59,9	38,9 \pm 2,4 ^d	12,8 \pm 0,8 ^d	6,3
PT/T*	-	70,0	92,6 \pm 1,8 ^a	30,5 \pm 0,6 ^a	6,9
	5,0	66,5	80,2 \pm 1,1 ^b	26,5 \pm 0,4 ^b	6,9
	12,7	66,2	81,9 \pm 1,5 ^b	27,0 \pm 0,5 ^b	12,0
	18,6	60,7	65,7 \pm 3,1 ^c	27,1 \pm 1,3 ^c	21,8
	23,7	60,4	61,8 \pm 2,8 ^c	20,4 \pm 0,9 ^c	27,3

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

^{a-d} -différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

En tenant compte de la morphologie des émulsions à base d'extraits protéiques natifs observées précédemment (Figure II-16), l'extrait protéique de tournesol est plus aggloméré que celui de soja. On observe une disparition des agrégats seulement à partir d'un degré d'hydrolyse de 18,6 % (Figure III - 6). Cette structure du réseau protéique de tournesol, ainsi que la présence de polysaccharides dans l'extrait, permettent d'enrober la matière active plus efficacement à faible taux d'hydrolyse (EME>80 %) par rapport à l'extrait protéique de soja.

Parallèlement, les résultats obtenus par analyse AsFFFF (Paragraphe III.2.2) ont montré que la fraction des courtes chaînes (taille inférieure à 10 kDa) est presque deux fois plus importante dans les extraits protéiques de tournesol (natifs et faiblement hydrolysés). Par exemple, pour un degré d'hydrolyse de 4-5 % cette fraction des petites macromolécules est de 44,7 % pour l'extrait protéique de tournesol et de 24,9 % pour l'extrait protéique de soja.

La taille et la morphologie des macromolécules protéiques ne sont pas les seuls facteurs déterminant l'efficacité de procédé de microencapsulation. D'autres phénomènes, tels que les interactions de faible énergie (hydrophobes et hydrophiles) entre l' α -tocophérol et les protéines, peuvent également intervenir. Ces interactions influencent l'affinité entre le principe actif et le matériau enrobant, ainsi que l'efficacité de microencapsulation.

Néanmoins, si on compare les extraits protéiques de tournesol natifs et hydrolysés, on observe que la réduction de la taille des macromolécules par hydrolyse empêche la formation d'une couche protectrice efficace pendant l'atomisation. Ainsi, une quantité non négligeable de la matière active est perdue pendant l'atomisation. Ce résultat a également été confirmé par la diminution du rendement d'atomisation lors de l'utilisation des extraits protéiques hydrolysés (plutôt que des extraits protéiques natifs).

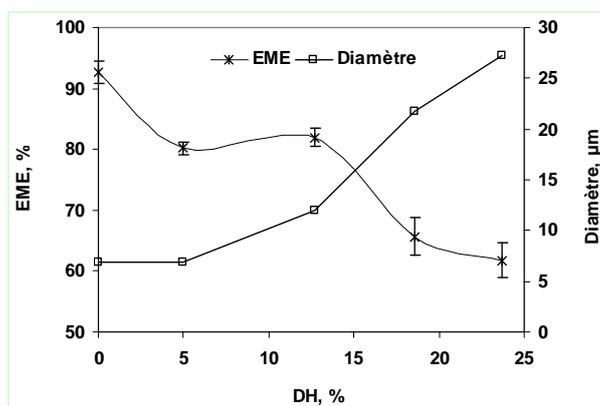


Figure III - 7. Influence du degré d'hydrolyse de l'extrait protéique de tournesol sur l'efficacité d'encapsulation et sur le diamètre moyen de microparticules.

Nous observons également, dans le cas de l'extrait protéique de tournesol, une augmentation significative du diamètre moyen des microparticules atomisées avec le degré d'hydrolyse de l'extrait protéique (Tableau III - 4, Figure III - 7).

Avec l'augmentation du degré d'hydrolyse, les propriétés adhésives des protéines augmentent [341,342]. Ainsi, l'agrégation des particules formées avec l'extrait protéique de tournesol hydrolysé est plus importante et leur taille augmente.

En conclusion, nous pouvons noter que l'hydrolyse enzymatique des extraits protéiques de soja et de tournesol par l'Alcalase n'a pas apportée d'amélioration de l'efficacité de microencapsulation de l' α -tocophérol par rapport aux protéines natives. Néanmoins, nous avons observé que dans le cas des protéines de tournesol, un faible taux d'hydrolyse diminue fortement la viscosité de l'émulsion sans trop altérer les propriétés de microencapsulation. Ainsi, cette modification des protéines permet d'augmenter le taux en matières sèches dans les émulsions, tout en gardant une bonne stabilité des émulsions et une efficacité de microencapsulation élevée. Cela peut être intéressant d'un point de vue d'une application industrielle potentielle.

III.3. Microencapsulation par les extraits protéiques acylés

Dans cette partie, l'acylation des extraits protéiques végétaux et leur utilisation en microencapsulation sont évaluées. La réaction d'acylation consiste en un greffage de chaînes acyles sur les protéines.

Dans le cas de la microencapsulation, l'intérêt du greffage des chaînes grasses sur les protéines est d'améliorer leur hydrophobicité et leurs propriétés tensioactives [5], afin d'augmenter l'affinité des protéines pour les matières actives hydrophobes.

III.3.1. Acylation des chaînes protéiques

Comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique, l'acylation des protéines selon la réaction de Schotten-Baumann consiste en un greffage d'une chaîne grasse sur les groupements amines libres terminaux ou ceux de la lysine (Paragraphe I.2.4.2.3). Cette réaction s'effectue en milieu aqueux alcalin selon le protocole décrit dans le Paragraphe IV.2.2.2. Aucun solvant organique ni additif n'est utilisé au cours de la réaction. Aucun produit indésirable n'est formé après la réaction de *N*-acylation, elle s'inscrit donc dans le concept de la chimie verte [343].

Au cours de la réaction à pH basique, le chlorure d'acide gras, qui n'a pas réagi avec la protéine, s'hydrolyse pour former un sel d'acide gras. Grâce à la chaîne grasse hydrophobe et une fonction carboxylate de sodium hydrophile, ce composé possède des propriétés tensioactives. Les

propriétés tensioactives apportées par ces composés peuvent permettre d'aider à la stabilisation de l'émulsion. Nous avons fait le choix de conserver ce coproduit de la réaction dans le mélange final pour une utilisation pour les essais de microencapsulation.

Trois chlorures d'acides gras constitués de 8, 12 ou 16 atomes de carbone (chlorure d'octanoyle, chlorure de dodécanoyle et chlorure de hexadécanoyle respectivement) ont été utilisés pour l'acylation des extraits protéiques. Le paramètre caractérisant la réaction d'acylation est le taux d'acylation (TA), qui correspond au pourcentage de groupements amines fonctionnalisés après la réaction. Ce taux est déterminé par le dosage OPA (Paragraphe IV.2.2.2, Annexe III).

III.3.1.1. Influence de la longueur de la chaîne grasse

L'influence de la longueur de la chaîne grasse sur le taux d'acylation des extraits protéiques a été étudiée. Le rapport molaire NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras utilisé au cours des expériences a été de 1/0,5. Nous avons décidé d'utiliser ce ratio, car le but de la fonctionnalisation est d'apporter quelques groupements hydrophobes aux protéines, sans modifier la totalité des groupements amines.

Le **Tableau III - 5** regroupe les résultats d'acylation d'extraits protéiques de soja et de tournesol natifs ou faiblement hydrolysés. Nous observons que pour chaque chlorure d'acide gras utilisé, les valeurs du taux d'acylation sont supérieures dans le cas de l'extrait protéique de tournesol. Les degrés d'acylation des extraits protéiques natifs sont comparables à ceux obtenus après l'acylation des protéines faiblement hydrolysées. D'autre part, aucune tendance remarquable concernant l'influence de la longueur de la chaîne grasse sur le taux d'acylation des extraits protéiques n'est observée.

Tableau III - 5. Influence de la longueur de la chaîne d'acide gras sur le taux d'acylation d'extraits protéiques (ratio molaire NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras de 1/0,5).

Chlorure d'acide gras	DH, %		TA, %	
	PS	PT	PS	PT
C8	-	-	24,6	49,7
C12	-	-	33,2	39,7
C12	4,0	5,0	31,2	43,3
C16	-	-	28,9	42,2

Les meilleurs taux d'acylation obtenus avec l'extrait protéique de tournesol peuvent résulter de plusieurs facteurs. D'une part, à pH 10 (pH de la réaction), l'extrait protéique de tournesol est mieux solubilisé que celui de soja (Paragraphe II.3.4). Les groupements amines sont par conséquent plus accessibles. De plus, le pK_r des chaînes latérales de la lysine se situe à un pH de

10,5, alors que les valeurs de pKb de la majorité des acides aminés, qui constituent les groupements amines terminaux, sont comprises entre 9,0 et 9,8. Par conséquent, dans un milieu réactionnel à pH 10, les groupements amines terminaux sont plus réactifs que ceux de la lysine. Or, la quantité des groupements amines de la lysine est plus importante dans l'extrait protéique de soja par rapport à celui de tournesol (Tableau II - 2). Cela peut expliquer une meilleure réactivité des protéines de tournesol et des taux d'acylation plus élevés.

III.3.1.2. Influence du ratio protéine/chlorure d'acide gras

Afin d'évaluer l'influence du ratio de chlorure d'acide gras sur le taux d'acylation des extraits protéiques de soja et de tournesol, des rapports molaires NH₂ de protéines/chlorure de 1/0,5 et 1/1 ont été testés. La Figure III - 8 récapitule les résultats obtenus pour ces expériences. Nous observons que l'augmentation de la quantité de chlorure d'acide gras dans le milieu réactionnel a peu d'influence sur le taux d'acylation des extraits protéiques natifs. Par contre, dans le cas de l'acylation des extraits protéiques hydrolysés, une augmentation du taux d'acylation, après l'ajout d'une quantité plus importante de chlorure d'acide gras, est remarquée.

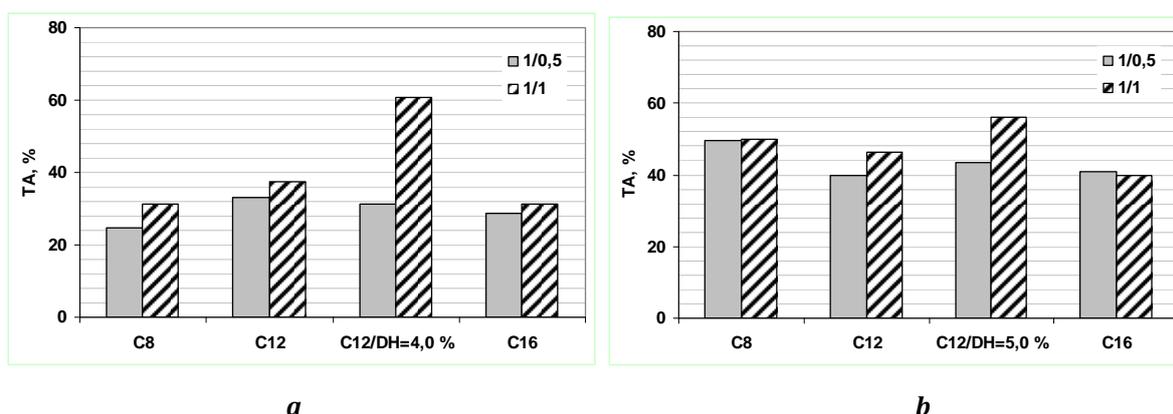


Figure III - 8. Influence de la longueur de la chaîne grasse et du ratio molaire NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras (1/0,5 et 1/1) sur le taux d'acylation des extraits protéiques natifs (C8, C12 et C16) et hydrolysés (C12/DH) ; (a) PS et (b) PT.

Dans les extraits protéiques natifs, il semble que seulement un peu moins de la moitié des fonctions amines soient accessibles pour une acylation dans nos conditions expérimentales. En effet, les mêmes taux d'acylation sont obtenus que l'on utilise 1 équivalent ou 0,5 équivalent de chlorure d'acide gras par rapport aux fonctions NH₂ de la protéine. La différence essentielle entre les produits obtenus avec un rapport NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras de 1/0,5 et 1/1 se situe au niveau du taux de sel d'acide gras (chlorure d'acide gras hydrolysé, n'ayant pas réagi avec la protéine) présent dans le mélange final. Ce taux varie de 0,01 % w/w à 2 % w/w pour la stœchiométrie de 1/0,5 et de 4 % w/w à 8 % w/w pour la stœchiométrie de 1/1.

Les résultats montrent également que l'hydrolyse enzymatique à faibles degrés d'hydrolyse favorise l'augmentation du taux de groupements amines libres, mais aussi leur accessibilité pour pouvoir réagir avec le chlorure d'acide gras. Ainsi, des taux d'acylation plus importants sont obtenus pour les hydrolysats protéiques de tournesol et de soja avec une stœchiométrie de 1/1 (NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras).

III.3.2. Microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques acylés

Dans cette partie, les extraits protéiques de soja et de tournesol (natifs et faiblement hydrolysés) acylés par des chlorures d'acides gras de différentes longueurs de chaîne sont étudiés comme matériaux enrobants en microencapsulation de l' α -tocophérol par atomisation.

III.3.2.1. Influence de la longueur de la chaîne grasse et du ratio protéine/chlorure d'acide gras

III.3.2.1.1. Propriétés des émulsions d'extraits protéiques acylés et d' α -tocophérol

Les émulsions à base d'extraits protéiques acylés ont été préparées à partir de solutions protéiques à 8 % w/w et stabilisées par homogénéisation sous haute pression comme décrit dans le [Paragraphe IV.2.3.2.1](#). La viscosité de toutes les solutions protéiques a été mesurée avant l'homogénéisation et celle des émulsions – après l'homogénéisation ([Tableau III - 6](#)). On observe que l'acylation des protéines, quelles que soient la longueur de la chaîne d'acide gras et la stœchiométrie utilisées, abaisse la viscosité des solutions avant homogénéisation. Dans le cas de l'extrait protéique de soja acylé, l'étape d'homogénéisation n'a pas d'effet remarquable sur la viscosité des préparations. Pour les préparations à base de l'extrait protéique de tournesol, la viscosité diminue environ de moitié au cours de l'étape d'homogénéisation.

Les préparations à base d'extraits protéiques hydrolysés et acylés présentent une faible viscosité avant et après l'homogénéisation, mais celle-ci est comparable à celle des échantillons à base des extraits protéiques hydrolysés.

En ce qui concerne la taille des gouttelettes de l' α -tocophérol dans l'émulsion, elle diminue légèrement lorsque les protéines sont acylées. Les tailles moyennes les plus faibles (0,5-0,6 μ m) correspondent aux émulsions à base d'extraits protéiques hydrolysés et acylés.

Tableau III - 6. Influence de l'acylation des extraits protéiques sur les propriétés des émulsions PS/T et PT/T.

Modification des extraits protéiques**	Viscosité, mPa*s		Diamètre moyen des gouttelettes, μm	
	Solution protéique avant homogénéisation	Emulsion après homogénéisation		
PS/T*	non modifiées	44,0	15,1	1,1
	C8 (1/0,5)	16,9	14,8	0,7
	C8 (1/1)	8,6	7,9	0,8
	C12 (1/0,5)	9,0	8,0	0,7
	C12 (1/1)	13,5	14,5	0,8
	C12/DH=5,0 % (1/0,5)	3,5	4,5	0,6
	C12/DH=5,0 % (1/1)	5,2	7,4	0,6
	C16 (1/0,5)	6,4	10,2	0,9
	C16 (1/1)	14,0	14,8	0,9
	PT/T*	non modifiées	250	36,1
C8 (1/0,5)		24,5	10,0	1,0
C8 (1/1)		26,5	11,7	0,9
C12 (1/0,5)		29,5	9,5	0,8
C12 (1/1)		44,5	21,0	1,1
C12/DH=5,0 % (1/0,5)		2,7	4,1	0,5
C12/DH=5,0 % (1/1)		4,6	6,3	0,6
C16 (1/0,5)		28,4	12,6	1,2
C16 (1/1)		39,4	18,0	1,3

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

** - ratio NH_2 de protéines/chlorure d'acide gras (C8, C12 ou C16) de 1/0,5 et 1/1

Pendant la réaction d'acylation en milieu alcalin, une dissociation partielle des macromolécules de protéines a lieu. Ainsi, en émulsion, les extraits protéiques acylés sont mieux dispersés, ce qui influence l'abaissement de la viscosité par rapport aux préparations avec les extraits protéiques natifs. La diminution de la viscosité des émulsions après l'acylation peut aussi être expliquée par l'amélioration des propriétés tensioactives des protéines. Le fait de diminuer la tension interfaciale entre les deux phases par la présence d'un tensioactif en émulsion, favorise la réduction de sa viscosité [344]. La diminution de la viscosité des émulsions avec les extraits protéiques acylés et hydrolysés est également provoquée par la réduction de la masse molaire des protéines, comme expliqué dans le [Paragraphe III.2.3](#).

L'augmentation du caractère tensioactif des protéines après l'acylation explique la réduction du diamètre moyen des gouttelettes de l' α -tocophérol dans les émulsions ([Figure III - 9](#)). Cette

diminution est particulièrement marquée pour les émulsions préparées avec les extraits protéiques de soja et de tournesol hydrolysés et acylés avec une chaîne grasse en C12.

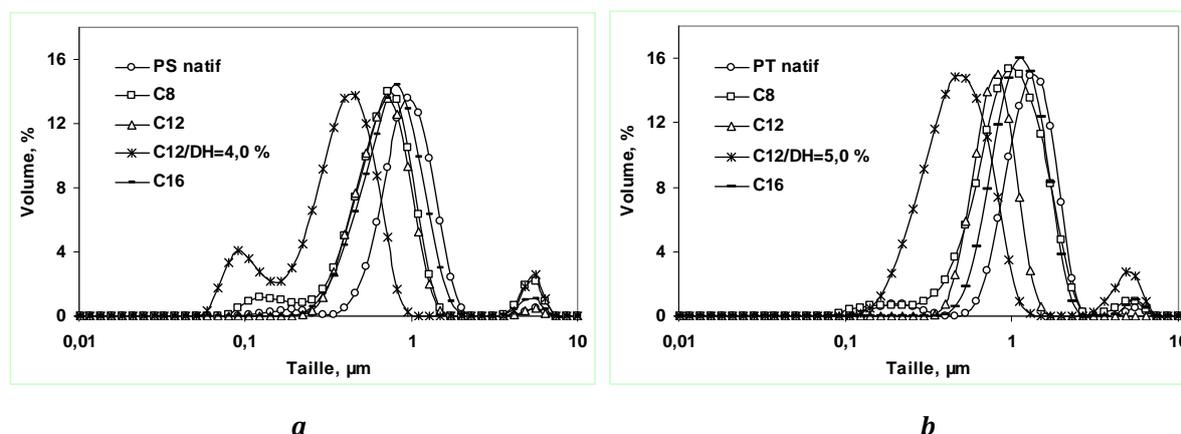


Figure III - 9. Distributions de taille des gouttelettes de l'α-tocophérol en émulsions (a) PS/T et (b) PT/T ; l'acylation des extraits protéiques natifs (C8, C12 et C16) ou hydrolysés (C12/DH) est effectuée avec un ratio molaire NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras de 1/0,5.

La présence des courtes chaînes d'hydrolysate protéique, ainsi que des molécules tensioactives dans l'échantillon acylé, permet de mieux disperser la phase hydrophobe pendant l'homogénéisation. Les propriétés tensioactives apportées aux protéines permettent de stabiliser des gouttelettes d'α-tocophérol de plus petites tailles et d'empêcher leur coalescence.

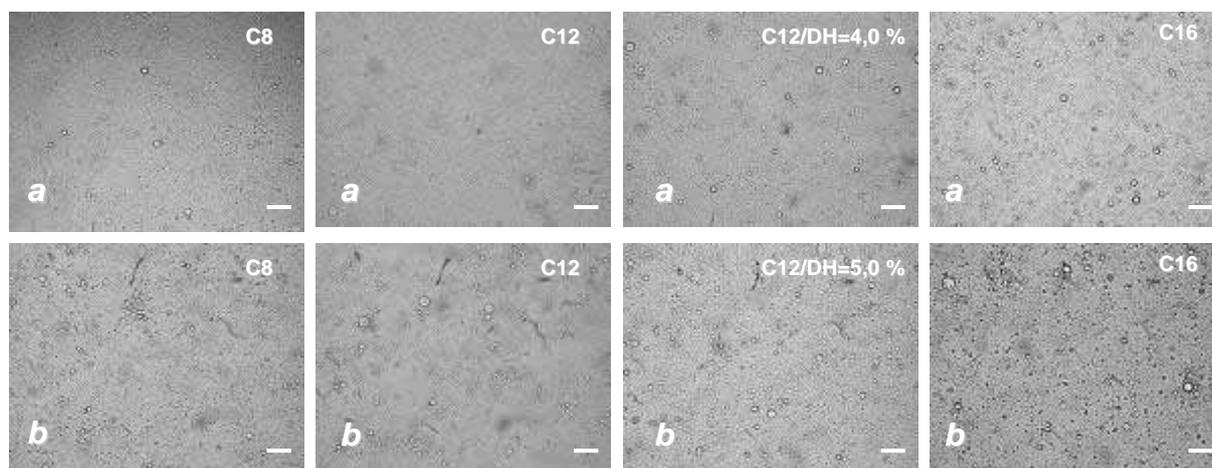


Figure III - 10. Microscopie optique : morphologie des émulsions (a) PS/T et (b) PT/T ; l'acylation des extraits protéiques natifs (C8, C12 et C16) ou hydrolysés (C12/DH) est effectuée avec un ratio molaire NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras de 1/0,5. Barre d'échelle - 10 μm.

Les images de microscopie optique (Figure III - 10) montrent que pour toutes les préparations avec les extraits protéiques acylés et l'α-tocophérol, les émulsions formées sont homogènes et

que la matière active est bien dispersée. Les tailles des gouttelettes observées confirment les valeurs de diamètre moyen obtenues par granulométrie.

Les résultats obtenus montrent que les extraits protéiques végétaux modifiés par acylation stabilisent bien la phase huileuse dispersée dans l'émulsion. Cette modification des protéines permet d'obtenir des émulsions plus fluides, avec des gouttelettes de plus petite taille que dans le cas des extraits protéiques non acylés.

III.3.2.1.2. Propriétés des microparticules d'extraits protéiques acylés et d' α -tocophérol

Les émulsions obtenues avec les extraits protéiques acylés et l' α -tocophérol ont ensuite été séchées par atomisation, afin d'obtenir des microparticules. Le rendement du procédé d'atomisation, ainsi que les propriétés des microparticules produites sont rassemblés dans le [Tableau III - 7](#) et le [Tableau III - 8](#). Les résultats obtenus montrent que l'acylation des protéines n'influence pas le rendement d'atomisation d'une manière significative. Toutefois, nous pouvons remarquer que les rendements d'atomisation sont plus élevés pour les préparations à base d'extrait protéique de tournesol.

L'efficacité de microencapsulation, quant à elle, est améliorée après l'acylation des extraits protéiques. Quels que soient la longueur de la chaîne grasse ou le rapport NH_2 de protéines/chlorure d'acide gras, les valeurs d'efficacité d'encapsulation sont plus élevées pour les préparations à base d'extraits protéiques acylés (par rapport aux extraits protéiques natifs). Parmi tous les extraits protéiques modifiés, les plus efficaces pour l'encapsulation de l' α -tocophérol sont les protéines acylées avec le chlorure de dodécanoyle, que ce soit l'extrait protéique de soja ou de tournesol.

Tableau III - 7. Influence de l'acylation des extraits protéiques sur le rendement d'atomisation et sur les propriétés des microparticules PS/T.

Modification des extraits protéiques**		RA, %	EME, %	TME, %	Diamètre moyen des microparticules, µm
PS/T*	non modifiées	67,9	79,7±1,0 ^d	26,3±0,3 ^d	9,3±0,2 ^a
	C8 (1/0,5)	66,1	83,0±1,4 ^{cd}	27,4±0,5 ^{cd}	7,6±0,2 ^{cd}
	C8 (1/1)	70,6	90,9±1,1 ^{ab}	30,0±0,4 ^{ab}	8,0±0,2 ^{bcd}
	C12 (1/0,5)	66,1	94,8±2,2 ^a	31,3±0,7 ^a	7,7±0,2 ^{bcd}
	C12 (1/1)	60,4	88,1±2,6 ^b	29,1±0,9 ^b	7,4±0,1 ^d
	C12/DH=4,0 % (1/0,5)	67,0	87,4±3,9 ^{bc}	28,8±1,3 ^{bc}	8,0±0,2 ^{bc}
	C12/DH=4,0 % (1/1)	64,6	88,9±3,5 ^b	29,3±1,3 ^b	6,9±0,3 ^e
	C16 (1/0,5)	62,9	87,9±1,2 ^{bc}	29,0±0,4 ^{bc}	8,2±0,3 ^b
C16 (1/1)	64,4	87,3±1,9 ^{bc}	28,9±0,6 ^{bc}	8,9±0,3 ^a	

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

** - ratio NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras (C8, C12 ou C16) de 1/0,5 et 1/1

^{a-e} -différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

Tableau III - 8. Influence de l'acylation des extraits protéiques sur le rendement d'atomisation et sur les propriétés des microparticules PT/T.

Modification des extraits protéiques**		RA, %	EME, %	TME, %	Diamètre moyen des microparticules, µm
PT/T*	non modifiées	70,0	92,6±1,8 ^c	30,5±0,6 ^c	6,9±0,03 ^e
	C8 (1/0,5)	71,7	97,9±2,8 ^{abc}	32,3±1,0 ^{abc}	7,4 ±0,2 ^{de}
	C8 (1/1)	70,8	97,0±1,7 ^{abc}	32,0±0,5 ^{abc}	8,5±0,3 ^d
	C12 (1/0,5)	70,4	99,5±2,4 ^{ab}	32,9±0,8 ^{ab}	7,7±0,2 ^{de}
	C12 (1/1)	69,5	100,8±1,6 ^a	33,3±0,6 ^a	7,3±0,1 ^{de}
	C12/DH=5,0 % (1/0,5)	66,4	99,4±2,6 ^{ab}	32,8±0,8 ^{ab}	13,3±1,1 ^b
	C12/DH=5,0 % (1/1)	67,3	99,8±1,7 ^{ab}	32,9±0,6 ^{ab}	16,8±0,1 ^a
	C16 (1/0,5)	70,8	95,0±1,1 ^{bc}	31,3±0,4 ^{bc}	10,6±0,6 ^c
C16 (1/1)	69,8	99,8±1,3 ^{ab}	33,0±0,4 ^{ab}	7,9±0,8 ^{de}	

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

** - ratio NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras (C8, C12 ou C16) de 1/0,5 et 1/1

^{a-e} -différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

Le greffage d'une chaîne hydrophobe sur une chaîne principale hydrophile favorise l'association de polymères en solution, comme présenté sur la [Figure III - 11](#) [345]. Les chaînes de polymères se placent de manière à former des microdomaines hydrophobes constitués de greffons. Dans le cas des émulsions étudiées, nous pouvons imaginer que les microdomaines hydrophobes des protéines s'orientent vers les gouttelettes d' α -tocophérol, elles aussi hydrophobes. Ce comportement favorise l'affinité des protéines avec la matière active hydrophobe. Ainsi, pendant l'atomisation, les chaînes de protéines acylées enrobent mieux les gouttelettes d' α -tocophérol

permettant une meilleure rétention de la matière active par rapport aux extraits protéiques non acylés. Cela explique l'augmentation de l'efficacité de microencapsulation avec les extraits protéiques acylés.

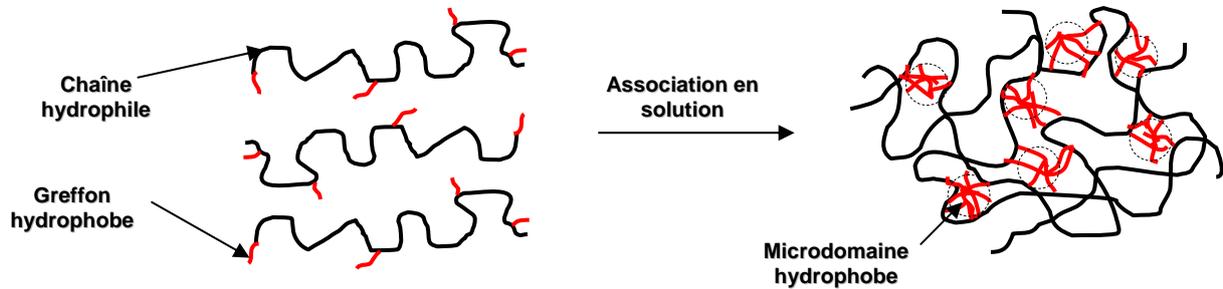


Figure III - 11. Représentation schématique de l'association de polymères hydrosolubles avec des greffons hydrophobes en milieu aqueux [345].

La structure formée dans l'émulsion peut ressembler à une forme de micelle avec un cœur hydrophobe (α -tocophérol) et une couronne hydrophile (protéines) comme illustré sur la [Figure III - 12](#). On peut supposer que chaque microgoutte, dispersée par la buse d'atomiseur représente un assemblage de plusieurs micelles de ce type. Ainsi, la microparticule formée par atomisation a une morphologie matricielle avec des gouttelettes de matière active entourées par la matière enrobante.

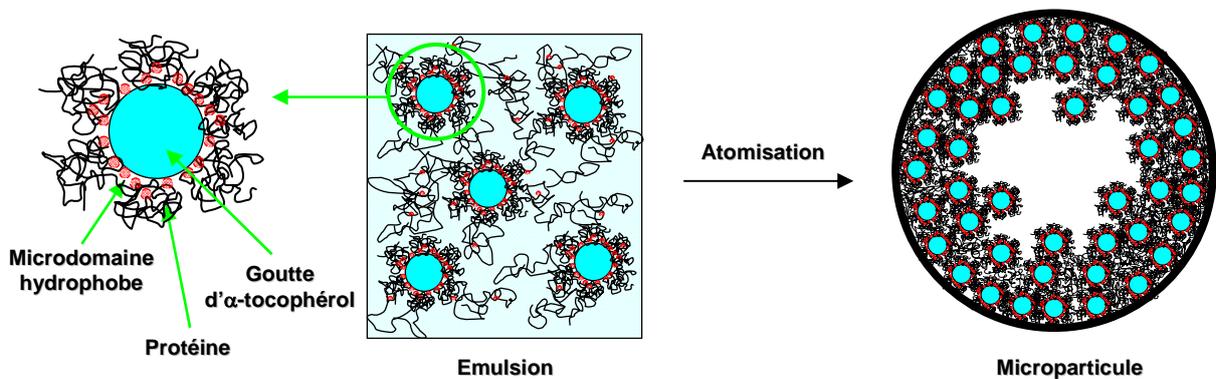


Figure III - 12. Représentation schématique de la microencapsulation de l' α -tocophérol par des protéines acylées.

Dans la partie précédente ([Paragraphe III.2.4](#)), nous avons observé que l'hydrolyse enzymatique des extraits protéiques conduit à la perte de leur efficacité comme matériau enrobant, en raison de la diminution de la longueur des chaînes macromoléculaires. Mais après l'acylation, les extraits protéiques faiblement hydrolysés (DH 4-5 %) présentent des propriétés encapsulantes aussi intéressantes que les extraits protéiques non hydrolysés. Cela montre que les chaînes

hydrophobes greffées par acylation jouent un rôle important en termes d'affinité de la protéine avec l' α -tocophérol. Quand les courtes chaînes protéiques sont acylées, elles entourent les gouttelettes de l' α -tocophérol de manière efficace en les protégeant mieux pendant l'atomisation.

Bien que d'après les résultats rassemblés dans le [Tableau III - 7](#) et le [Tableau III - 8](#) les valeurs de diamètres moyens des microparticules sont significativement différentes, les distributions de taille présentées sur la [Figure III - 13](#) montrent que pour chaque échantillon, la population majoritaire reste de taille comparable quelle que soit la longueur de la chaîne grasse utilisée pour l'acylation.

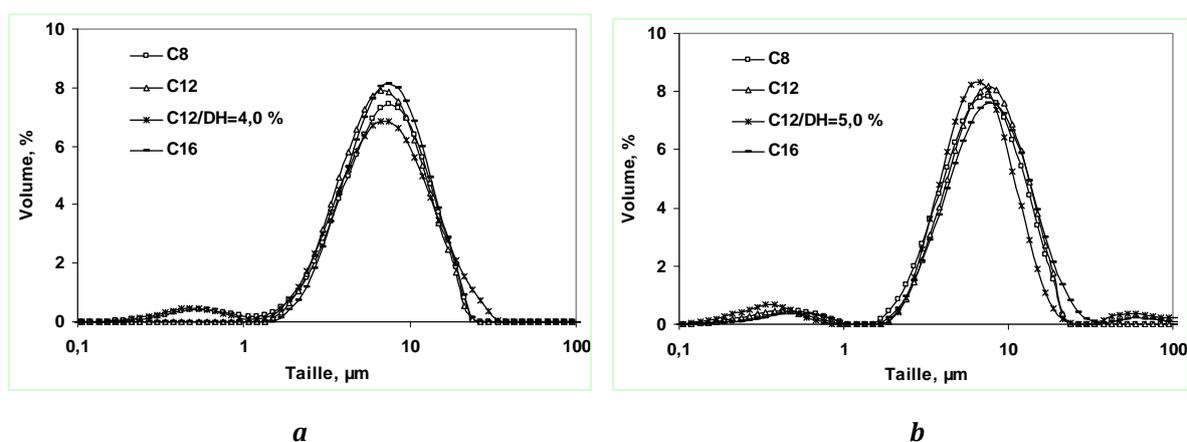


Figure III - 13. Distributions de taille des microparticules (a) PS/T et (b) PT/T ; l'acylation des extraits protéiques natifs (C8, C12 et C16) ou hydrolysés (C12/DH) est effectuée avec un ratio molaire NH_2 de protéines/chlorure d'acide gras de 1/0,5.

La morphologie des microparticules à base d'extraits protéiques modifiés par acylation (avec ou sans hydrolyse) est présentée sur les images MEB ([Figure III - 14](#)). La structure des microparticules est similaire à celle des particules obtenues avec les extraits protéiques natifs, observée précédemment ([Figure II - 27a](#)). Les particules produites par atomisation ont une morphologie sphérique avec une surface lisse. L'intérieur creux avec des bords poreux des particules permet de visualiser l'emplacement de la matière active. L'hydrolyse et la longueur de la chaîne grasse n'ont pas d'influence remarquable sur la morphologie des microparticules obtenues.

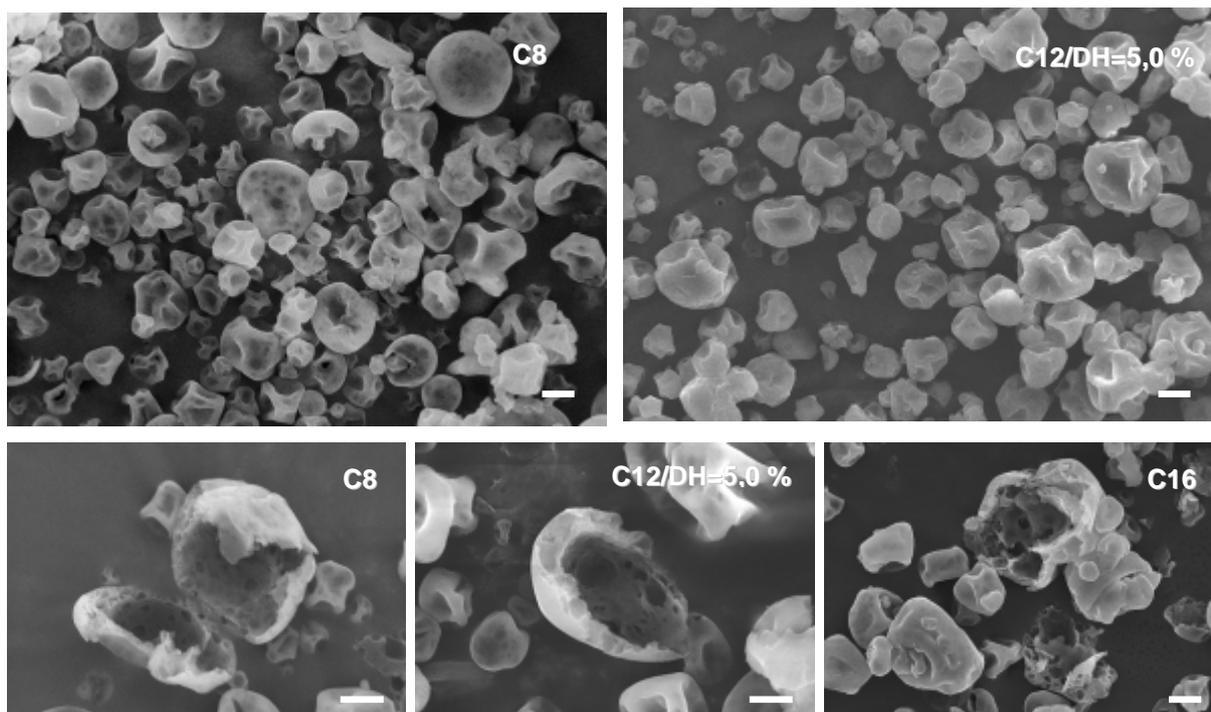


Figure III - 14. Images MEB des microparticules d' α -tocophérol encapsulé par l'extrait protéique de tournesol acylé ; ratio matière enrobante/matière active de 1/0,5. Barre d'échelle - 2 μ m.

III.3.2.2. Influence du ratio matière enrobante/matière active

Dans le paragraphe précédent, les extraits protéiques de soja et de tournesol acylés par le chlorure de dodécanoyle (C12) ont montré des résultats sensiblement supérieurs à ceux des extraits protéiques natifs, surtout du point de vue de l'efficacité de microencapsulation de l' α -tocophérol. C'est pourquoi les extraits protéiques acylés par le C12 (ratio molaire NH_2 de protéines/chlorure de 1/0,5) ont été choisis pour des essais supplémentaires, avec différents ratios matière enrobante/matière active.

Les résultats des expériences réalisées sont présentés dans le [Tableau III - 9](#). Pour les extraits protéiques acylés comme pour les extraits protéiques natifs ([Paragraphe II.5.5](#)), l'augmentation du taux d' α -tocophérol dans l'émulsion provoque une hausse de viscosité et la réduction du rendement d'atomisation. Quand la proportion de la matière active augmente, de légères augmentations de la taille des gouttelettes dans l'émulsion, ainsi que de l'efficacité de microencapsulation sont également observées.

Tableau III - 9. Influence du ratio matière enrobante/matière active sur les propriétés des émulsions et des microparticules PS/T et PT/T à base des extraits protéiques acylés avec C12.

Ratio extrait protéique/ α -tocophérol	PS/T*			PT/T*		
	1/0,5	1/1	1/2	1/0,5	1/1	1/2
Viscosité d'émulsion, mPa*s	8,0	13,5	19,3	9,5	16,0	42,1
Diamètre moyen des gouttelettes, μ m	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	1,1
RA, %	66,1	64,6	60,0	70,4	68,7	59,7
EME, %	94,8 \pm 2,2 ^b	95,1 \pm 4,3 ^b	107,8 \pm 4,5 ^a	99,5 \pm 2,4 ^b	98,7 \pm 1,6 ^b	99,9 \pm 2,2 ^{ab}
TME, %	31,3 \pm 0,7 ^d	47,6 \pm 2,2 ^c	71,9 \pm 3,0 ^a	32,9 \pm 0,8 ^d	49,4 \pm 0,8 ^c	65,7 \pm 1,2 ^b
Diamètre moyen des microparticules, μ m	7,7 \pm 0,2 ^d	9,5 \pm 0,2 ^c	12,9 \pm 0,2 ^b	7,7 \pm 0,2 ^d	8,6 \pm 0,5 ^{cd}	24,7 \pm 0,7 ^a

* - solution protéique à 8 % w/w

^{a-d} -différentes lettres dans la même ligne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

Les tendances observées dans les résultats peuvent être expliquées par des raisonnements similaires à ceux donnés pour les extraits protéiques natifs. La hausse de la viscosité est liée à l'augmentation du taux en matière sèche, ainsi qu'à l'écémage (Paragraphe II.5.5.1) plus important.

Les distributions de taille des gouttelettes d' α -tocophérol dans les émulsions obtenues (Figure III - 15) montrent que la majorité des gouttes possèdent des diamètres compris entre 0,7 μ m et 1,1 μ m. Aussi, une légère coalescence des gouttelettes a lieu pour des ratios extrait protéique/ α -tocophérol de 1/1 et 1/2, qui se traduit par des populations situées entre 3 μ m et 6 μ m. Néanmoins, la quantité de ces gouttelettes coalescées reste faible (entre 1 % et 5 %).

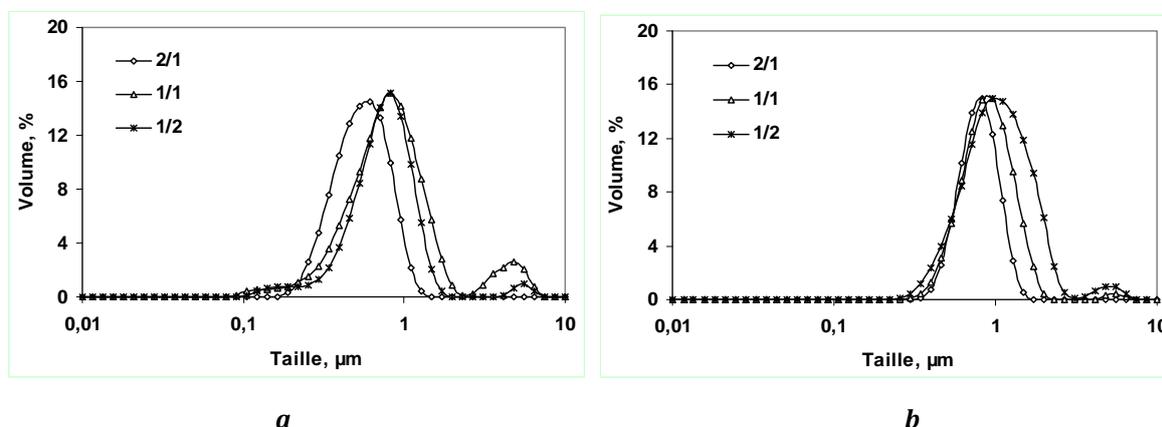


Figure III - 15. Distributions de taille des gouttelettes de l' α -tocophérol en émulsion (a) PS/T et (b) PT/T à base d'extraits protéiques acylés (chlorure d'acide gras C12, ratio NH₂ de protéines/chlorure de 1/0,5).

La diminution du rendement d'atomisation et l'augmentation du diamètre moyen des microparticules (Figure III - 16) avec la hausse du ratio d' α -tocophérol dans le système peuvent être expliquées par une proportion plus importante de l' α -tocophérol à la surface des particules. En effet, en raison du caractère lipophile du tocophérol, l'agglomération des particules, tant entre elles que sur les parois de l'atomiseur, est favorisée.

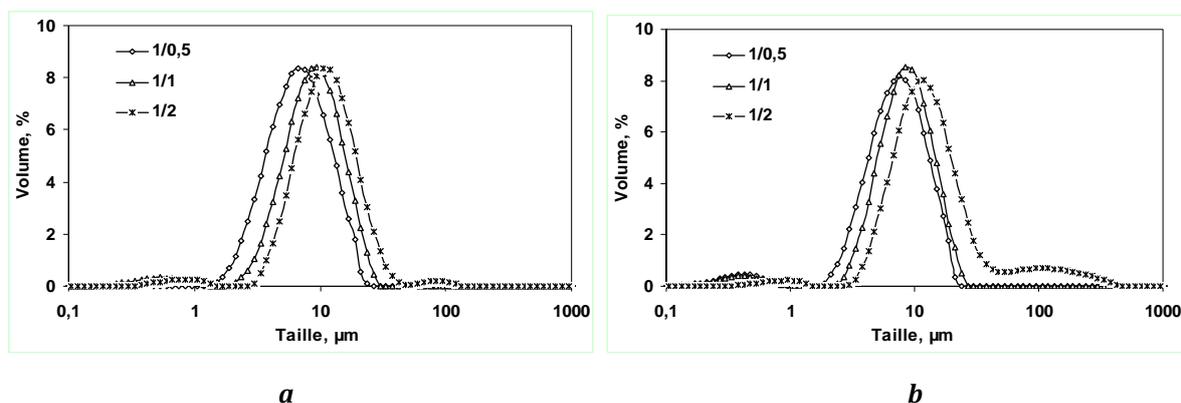


Figure III - 16. Distributions de taille des microparticules à base d'extraits protéiques acylés (chlorure d'acide gras C12, ratio NH_2 de protéines/chlorure de 1/0,5) ; (a) PS/T et (b) PT/T avec différents ratios matière enrobante/matière active.

Les extraits protéiques de soja et de tournesol acylés représentent des agents enrobants efficaces pour la microencapsulation de l' α -tocophérol quel que soit le ratio matière enrobante/matière active utilisé. Les valeurs de l'efficacité de microencapsulation obtenues sont proches ou supérieures à 100 %. D'autre part, les valeurs de taux d'encapsulation obtenues montrent que les particules à base d'extraits protéiques acylés peuvent être chargées en matière active jusqu'à 70 % w/w.

Les images MEB des microparticules avec différents ratios matière enrobante/matière active sont rassemblées sur la Figure III - 17. Nous observons que les particules à base d'extraits protéiques acylés sont sphériques et ne présentent pas de fissures en surface. La porosité de la partie interne des microparticules est plus importante quand le pourcentage d' α -tocophérol dans la préparation augmente, ce qui est conforme avec la morphologie des particules à base d'extraits protéiques natifs observée précédemment (Figure II - 23).

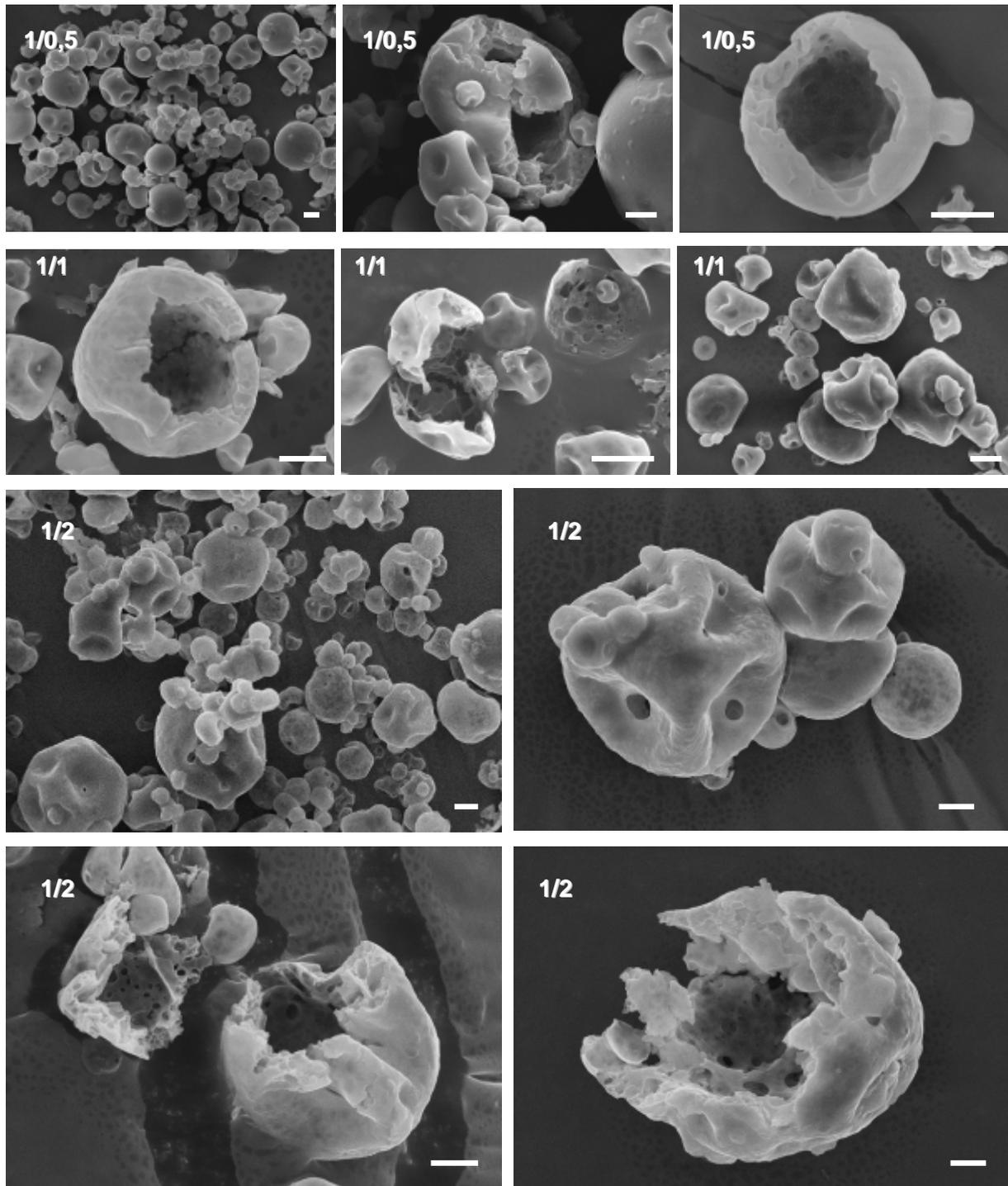


Figure III - 17. Images MEB des microparticules de l'α-tocophérol encapsulé par l'extrait protéique de soja acylé (chlorure d'acide gras C12, ratio NH_2 de protéines/chlorure de 1/0,5) ; ratios matière enrobante/matière active de 1/0,5, 1/1 ou 1/2. Barre d'échelle - 2 μm .

Les résultats obtenus au cours de cette partie montrent que par rapport aux extraits protéiques natifs (Tableau II - 12), les extraits protéiques acylés permettent une meilleure rétention de l'α-tocophérol, en particulier pour un ratio matière enrobante/matière active de 1/0,5. En effet, pour les ratios de matière active hydrophobe plus élevés de 1/1 et 1/2, l'efficacité de

microencapsulation avec les extraits protéiques natifs est déjà importante (92,6-99,7 %). Ainsi, l'acylation des extraits protéiques entraîne seulement une faible hausse des valeurs moyennes d'efficacité de microencapsulation, qui s'approchent de 100 %.

III.3.3. Microencapsulation de l'acide ascorbique par les extraits protéiques acylés

Afin de confirmer que l'augmentation de l'efficacité de microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques acylés est due à une meilleure affinité entre la matière enrobante et la matière active hydrophobe, nous avons décidé d'étudier l'influence de la même modification de protéines sur le procédé d'encapsulation d'une matière active hydrophile. Ainsi, des expériences ont été effectuées en utilisant l'extrait protéique de soja acylé (par différents chlorures d'acides gras) et l'acide ascorbique. Le ratio NH_2 de protéines/chlorure d'acide gras utilisé est de 1/0,5. Les conditions opératoires de microencapsulation correspondent à l'expérience PS/AA 5 (Tableau II - 15), car elles permettent d'obtenir un bon rendement d'atomisation et une efficacité de microencapsulation élevée (dans le cas de l'extrait protéique natif).

Les résultats obtenus (Tableau III - 10) montrent que l'acylation de l'extrait protéique de soja, quel que soit l'acide gras utilisé, diminue l'efficacité de microencapsulation de l'acide ascorbique par atomisation d'à peu près de 30 %. Par contre, aucun effet significatif n'a été observé concernant la viscosité des solutions, le rendement d'atomisation ou la taille des microparticules.

Tableau III - 10. Résultats de microencapsulation de l'acide ascorbique par l'extrait protéique de soja natif et acylé.

Paramètre mesuré	PS/AA*	PS(C8)/AA*	PS(C12)/AA*	PS(C16)/AA*
TA, %	-	24,6	33,2	28,9
Viscosité, mPa*s	8,9	9,1	9,8	7,5
RA, %	80,7	74,5	76,7	75,2
EME, %	88,9±5,8 ^a	55,1±2,4 ^c	57,3±4,1 ^c	64,6±2,3 ^b
TME, %	29,3±1,9 ^a	18,2±0,8 ^c	18,9±1,4 ^c	21,3±0,8 ^b
Diamètre moyen des microparticules, μm	5,1±0,2 ^a	5,2±0,3 ^a	4,8±0,5 ^a	5,3±0,3 ^a

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio PS (natif ou acylé)/AA de 1/0,5

^{a-c} -différentes lettres dans la même ligne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

Les résultats obtenus dans cette partie confirment nos attentes. Ils prouvent que l'augmentation du caractère hydrophobe des extraits protéiques par acylation influence leur affinité avec les matières actives. L'acide ascorbique (matière hydrophile) possède une affinité moindre avec les extraits protéiques acylés par rapport aux extraits protéiques natifs. Par conséquent, l'absence

d'interactions physico-chimiques entre la matière enrobante et la matière active font que la rétention de cette dernière est plus faible pendant la formation des particules, ce qui influence la diminution de l'efficacité de microencapsulation.

Concernant cette partie, nous pouvons conclure que le greffage de chaînes grasses sur les protéines de soja et de tournesol par acylation permet d'améliorer leurs propriétés tensioactives. Dans le cas d'une matière active hydrophobe, cela se traduit par l'obtention d'émulsions avec des gouttelettes de tailles plus petites. Après l'acylation, l'augmentation du caractère hydrophobe des extraits protéiques est confirmée par des efficacités d'encapsulation plus importantes pour une matière active hydrophobe par rapport à un principe actif hydrophile. Ainsi, cette modification s'avère pertinente, car elle permet d'augmenter le taux du principe actif hydrophobe dans les microparticules, ce qui pourrait être intéressant pour de potentielles applications industrielles.

III.4. Microencapsulation par les extraits protéiques réticulés

La réaction de réticulation (qu'elle soit chimique ou enzymatique) permet de créer des liaisons covalentes entre les chaînes macromoléculaires. Dans le cas de la microencapsulation, la réticulation du matériau enrobant est utilisée pour augmenter les propriétés mécaniques des microparticules et/ou augmenter leur pouvoir de rétention.

Afin que la réaction effectuée réponde aux critères de la chimie verte, la réticulation enzymatique a été préférée à la réticulation par un agent chimique. L'enzyme largement utilisée et étudiée pour la réticulation des protéines végétales est la transglutaminase ([Paragraphe I.2.4.2.5](#)) [14,69,198,201,202,204-206,211,212]. Cette enzyme a l'avantage d'être non toxique, accessible et peu coûteuse. Pour ces raisons, elle est très largement utilisée dans l'industrie alimentaire. La formulation enzymatique commerciale utilisée au cours de ce travail est constituée de 1 % de transglutaminase dans 99 % de maltodextrine.

Pour une application en microencapsulation, il est plus intéressant d'effectuer l'étape de réticulation après l'émulsification du principe actif par homogénéisation. La réticulation des protéines "autour" des particules de la matière active est plus pertinente que la préparation de l'émulsion avec des protéines préalablement réticulées. On suppose que cette méthode de préparation permettra une meilleure protection de la matière active et une augmentation de l'efficacité de microencapsulation. La matrice constituée de protéines réticulées devrait également permettre de moduler les propriétés de relargage de la matière active (par rapport aux protéines non réticulées).

Dans ce sous-chapitre, la réaction de réticulation enzymatique des extraits protéiques de soja et de tournesol par la transglutaminase est étudiée en fonction du temps et de la concentration d'enzyme. Par la suite, l'effet de cette modification sur le procédé de microencapsulation de l' α -tocophérol est évalué.

III.4.1. Réticulation des chaînes protéiques

La réticulation des extraits protéiques de soja et de tournesol a été réalisée dans différentes conditions (Tableau III - 11) selon le protocole décrit dans le Paragraphe IV.2.2.3. Le taux de réticulation (TR) a été évalué par le dosage des fonctions amines par la méthode OPA (Annexe III).

Les résultats obtenus montrent que pour un ratio extrait protéique/transglutaminase (TG) constant, le temps de réaction, à partir de 15 min, n'a pas d'influence sur le taux de réticulation. En revanche, quand la proportion de l'enzyme diminue, on observe une légère diminution du taux de réticulation pour l'extrait protéique de tournesol, alors que ce taux reste constant pour l'extrait protéique de soja.

Tableau III - 11. Conditions de réticulation des extraits protéiques de soja et de tournesol par la transglutaminase (TG) et les résultats obtenus.

Conditions de réticulation	Ratio extrait protéique/TG, w/w	Temps de réaction, min	TR, %	
			PS	PT
Rét 1	10/1	45	23,9	22,0
Rét 2	10/1	30	23,1	24,3
Rét 3	10/1	15	24,2	25,2
Rét 4	10/0,5	15	21,3	16,5
Rét 5	10/0,25	15	23,0	17,9
Rét 6	10/0,1	15	20,6	16,7

La transglutaminase catalyse la formation d'une liaison covalente entre les amines primaires de la protéine et la fonction amide de la glutamine (Paragraphe I.2.4.2.5). Avec l'avancement de la réticulation, les protéines s'associent sous forme d'agrégats, la disponibilité des groupements réactifs, ainsi que la probabilité que deux groupes soient à proximité pour réagir diminuent au cours du temps. Un temps de 15 min est suffisant pour réticuler la quasi-totalité des groupements disponibles dans la protéine.

La Figure III - 18 représente les extraits protéiques de soja en solution avant et après réticulation. Nous pouvons observer la formation d'agrégats protéiques après la réaction avec la transglutaminase, ce qui confirme la réticulation.

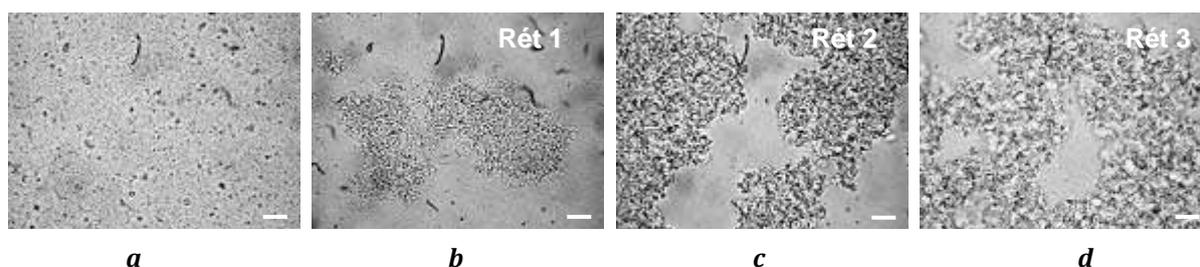


Figure III - 18. Microscopie optique : morphologie de la solution protéique de soja à 8 % w/w (a) non réticulée, (b), (c) et (d) réticulée dans les différentes conditions. Barre d'échelle – 10 μ m.

Dans le cas des isolats protéiques de soja, la quantité de formulation enzymatique (1 % de transglutaminase et 99 % de maltodextrine) ne change pas le taux de réticulation. Pour l'extrait protéique de tournesol, une diminution du taux de réticulation est observée quand la quantité de transglutaminase dans le milieu est moindre. On peut supposer que la formation rapide d'agrégats protéiques de tournesol, au début de la réaction, rend les fonctions amines moins accessibles pour la réticulation suivante. Ainsi, quand la quantité d'enzyme dans le milieu est plus importante, un nombre plus grand de liaisons covalentes peut se former au début de la réaction, avant que la protéine ne soit très agrégée et que les sites réactifs encore libres soient devenus inaccessibles.

III.4.2. Microencapsulation de l' α -tocophérol par les extraits protéiques réticulés

La réaction de réticulation s'effectue sur une émulsion extrait protéique/ α -tocophérol stabilisée par homogénéisation sous pression (Paragraphe IV.2.3.2.2). Elle est réalisée juste avant l'étape d'atomisation.

Nous pouvons observer sur la Figure III - 19 que l'émulsion homogène avant la réticulation se transforme en une formulation granuleuse après la réaction avec la transglutaminase. Nous constatons également que la désactivation de la transglutaminase à 90 °C pendant 5 min ne déstabilise pas l'émulsion.

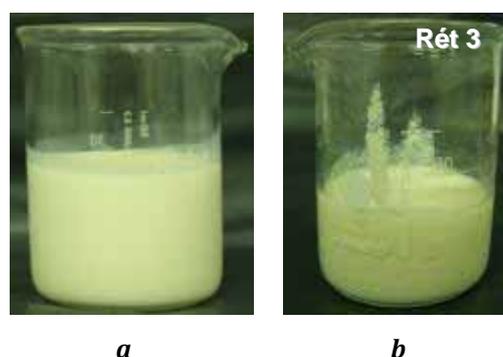


Figure III - 19. Aspect de l'émulsion PS/T (a) non réticulée, (b) réticulée avec la transglutaminase.

La difficulté rencontrée lors de ces expériences est liée à la consistance des émulsions réticulées formées. Pendant la mesure de granulométrie, la présence des agrégats protéiques entraîne un effet de diffusion de lumière multiple et conduit à des distributions de taille qui dépassent les limites de détection de l'appareil. Ainsi, l'observation des tailles des gouttelettes dans l'émulsion a été impossible.

L'aspect granuleux des émulsions réticulées rend également leur analyse au rhéomètre difficile. Dans les conditions utilisées pour la mesure de la viscosité (Paragraphe IV.2.4.1), sa valeur pour toutes les émulsions réticulées a été infinie.

La morphologie des émulsions réticulées a cependant pu être observée par microscopie optique (Figure III - 20). Les images obtenues nous permettent d'apercevoir la formation d'émulsions homogènes, avec une bonne dispersion des gouttelettes de l' α -tocophérol emprisonnées dans le réseau de protéines réticulées.

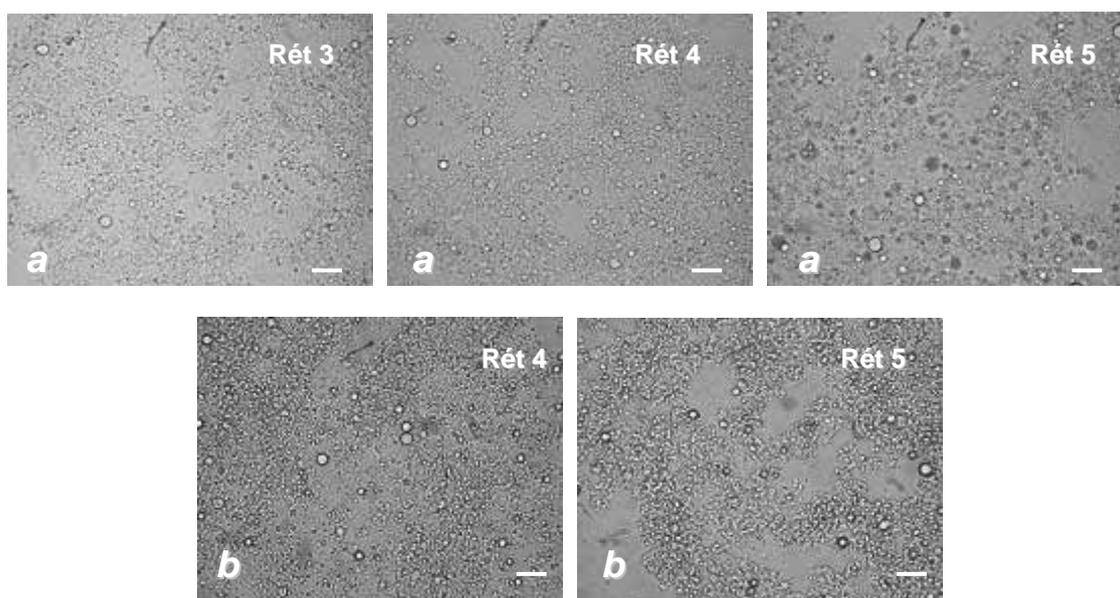


Figure III - 20. Microscopie optique : morphologie des émulsions (a) PS/T et (b) PT/T après la réticulation des extraits protéiques par TG. Barre d'échelle - 10 μ m.

Les résultats rassemblés dans le Tableau III - 12 montrent l'influence de la réticulation des extraits protéiques sur la microencapsulation de l' α -tocophérol par atomisation. Nous observons que le rendement d'atomisation est plus faible quand la concentration d'enzyme dans l'émulsion est élevée. Les valeurs d'efficacité de microencapsulation obtenues avec les extraits protéiques réticulés sont similaires ou légèrement inférieures à celles obtenues avec les extraits protéiques natifs. Enfin, la taille des microparticules augmente après la réticulation des extraits protéiques.

Tableau III - 12. Influence de la réticulation des extraits protéiques sur le rendement d'atomisation et sur les propriétés des microparticules.

Conditions de réticulation		RA, %	EME, %	TME, %	Diamètre moyen des microparticules, μm
PS/T*	non réticulées	67,9	79,7 \pm 1,0 ^{bc}	26,3 \pm 0,3 ^{bc}	9,3
	Rét 3	39,4	71,4 \pm 3,2 ^d	20,9 \pm 0,9 ^f	11,8
	Rét 4	55,3	76,2 \pm 0,6 ^{cd}	22,9 \pm 0,2 ^e	10,9
	Rét 5	68,8	78,3 \pm 2,3 ^{bc}	24,0 \pm 0,7 ^{de}	10,6
	Rét 6	69,5	79,9 \pm 0,5 ^{bc}	26,4 \pm 0,2 ^{bc}	10,5
PT/T*	non réticulées	70,0	92,6 \pm 1,8 ^a	30,5 \pm 0,6 ^a	6,9
	Rét 4	52,4	81,9 \pm 1,1 ^b	25,4 \pm 0,3 ^{cd}	8,5
	Rét 5	56,3	87,6 \pm 3,3 ^a	27,6 \pm 1,1 ^b	8,1
	Rét 6	55,8	87,1 \pm 2,4 ^a	28,7 \pm 0,8 ^{ab}	8,3

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

^{a-f} -différentes lettres dans la même colonne indiquent la différence statistique entre les valeurs moyennes

Nous avons observé que la quantité d'enzyme n'a pas d'influence sur le taux de réticulation des extraits protéiques. La diminution du rendement d'atomisation peut donc provenir d'une augmentation des propriétés adhésives des protéines végétales en présence du mélange enzymatique. Du fait de la formulation de la transglutaminase, les échantillons Rét 3 et Rét 4 contiennent 10 % w/w et 5 % w/w de maltodextrine respectivement. Or celle-ci est connue pour ses bonnes propriétés adhésives [346,347]. L'efficacité de microencapsulation pour ces préparations est également affectée par l'augmentation de la proportion de maltodextrine et par conséquent, par la diminution de la proportion d'extraits protéiques.

En ce qui concerne les échantillons Rét 5 et Rét 6 contenant 2,5 % w/w et 1 % w/w de maltodextrine respectivement, aucune différence significative des valeurs d'efficacité de microencapsulation (par rapport aux extraits protéiques natifs) n'a été observée. En revanche, le rendement d'atomisation pour les préparations à base d'extrait protéique de tournesol reste faible, même en présence de 1 % w/w de maltodextrine. Il semblerait que la formation d'agrégats de taille importante après la réticulation entraîne cette diminution du rendement d'atomisation.

La formation des agrégats dans l'émulsion réticulée influence l'augmentation du diamètre moyen des microparticules par rapport aux extraits protéiques non réticulés. En revanche, quelles que soient les conditions de réticulation, les microparticules obtenues possèdent des tailles comparables et des distributions de taille similaires (Figure III - 21).

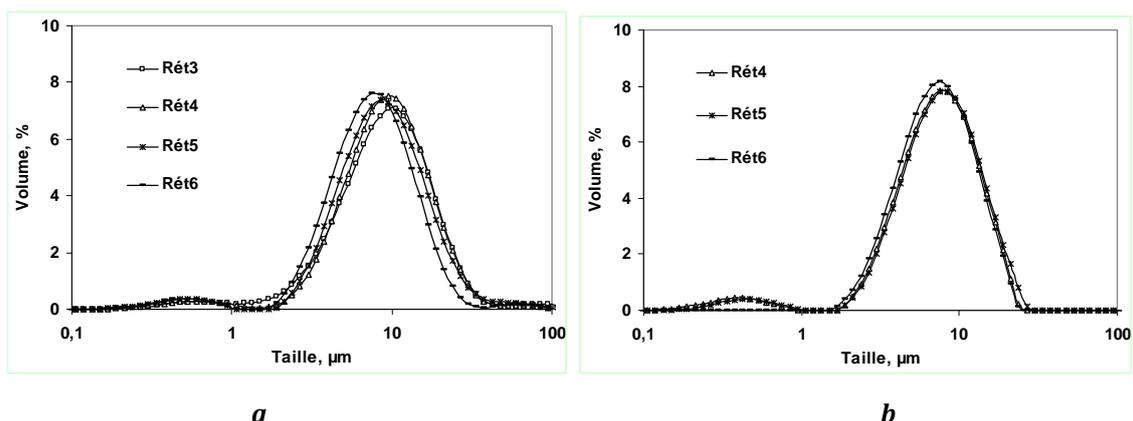


Figure III - 21. Distributions de taille des microparticules d'α-tocophérol encapsulé par les extraits protéiques réticulés dans les différentes conditions ; (a) PS/T et (b) PT/T.

La **Figure III - 22** représente les images MEB des microparticules à base d'extrait protéique de soja réticulé et d'α-tocophérol (Rét 5). La morphologie des microparticules à base d'extrait protéique réticulé est légèrement différente de celle des particules à base d'extrait protéique natif ou acylé. Les microparticules avec l'extrait protéique réticulé sont sphériques, avec une surface lisse sans fissures. Mais, dans la partie intérieure nous pouvons observer la formation d'une enveloppe plus dense et peu poreuse par rapport aux particules à base d'extrait protéique non réticulé. Ainsi, cela confirme la densification du réseau protéique par réticulation.

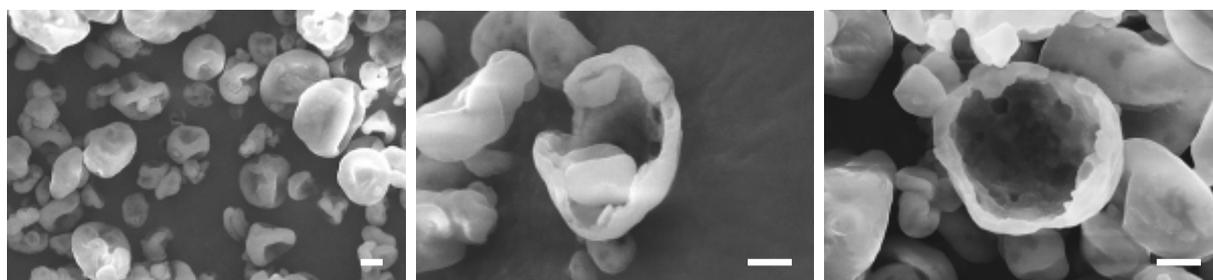


Figure III - 22. Images MEB des microparticules PS/T obtenues à partir de l'émulsion réticulée dans les conditions Rét 5. Barre d'échelle - 2 μm.

En conclusion, on peut dire que la réticulation enzymatique des extraits protéiques végétaux à un taux de 15-20 %, n'a pas d'effet remarquable sur le procédé de microencapsulation de l'α-tocophérol. Cependant, la réticulation du matériau enrobant peut influencer les propriétés de libération de la matière active.

III.5. Microencapsulation par les extraits protéiques cationisés

La cationisation des protéines végétales a pour objectif d'augmenter leur hydrophilie et leur solubilité. Elle doit également améliorer l'affinité des protéines pour des principes actifs hydrophiles. Le réactif utilisé dans ce travail pour la cationisation des extraits protéiques est le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTMAC) qui contient une fonction ammonium quaternaire.

Dans ce sous-chapitre, la cationisation des extraits protéiques végétaux par le GTMAC dans différentes conditions est étudiée. Ensuite, les extraits protéiques modifiés sont utilisés comme matières enrobantes pour des principes actifs hydrophobe (α -tocophérol) et hydrophile (acide ascorbique).

III.5.1. Cationisation des chaînes protéiques

La réaction de cationisation s'effectue sur les sites nucléophiles de la protéine. A pH basique (pH=10), les groupements amines de la protéine sont les plus réactifs pour être fonctionnalisés par le GTMAC. Le suivi quantitatif de l'efficacité de la réaction a donc été effectué par le dosage OPA (Annexe III). La réaction a été réalisée selon le protocole présenté dans le Paragraphe IV.2.2.4. Afin de confirmer la présence des groupements positivement chargés sur la protéine après la cationisation, une mesure du potentiel zêta a été réalisée (Paragraphe IV.2.4.8).

La réaction de cationisation des protéines végétales par le GTMAC n'a pas été étudiée dans la littérature. Pour cette raison, nous avons décidé d'étudier l'influence sur la réaction de différents paramètres, tels que le temps, la température de la réaction et le ratio molaire GTMAC/protéines.

Le GTMAC utilisé pour la cationisation des protéines est un produit toxique et cancérigène, en raison de la présence d'une fonction époxyde. Au cours de la réaction avec des extraits protéiques en milieu aqueux alcalin, le GTMAC qui ne réagit pas sur la protéine est hydrolysé pour conduire à un diol qui ne possède pas de toxicité (Figure III - 23). On considère qu'à la fin de la réaction, la totalité du GTMAC a soit réagi avec la protéine soit été hydrolysée. Les produits de la réaction principale et secondaire sont non toxiques et non cancérigènes ; ils ne présentent pas de danger. Il n'est donc pas nécessaire d'éliminer le produit de la réaction secondaire du milieu réactionnel.

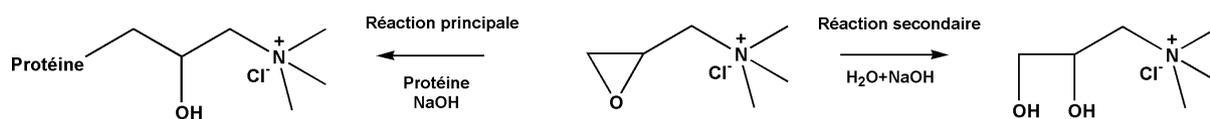


Figure III - 23. Réaction principale et secondaire de la cationisation des protéines par le GTMAC en milieu alcalin.

III.5.1.1. Cationisation de l'extrait protéique de soja

Dans un premier temps, l'influence du ratio molaire GTMAC/NH₂ de protéines et de la température sur la cationisation de l'extrait protéique de soja a été évaluée. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure III - 24**. Nous observons que le taux de cationisation et le potentiel zêta augmentent avec la quantité de GTMAC ajouté et avec la température.

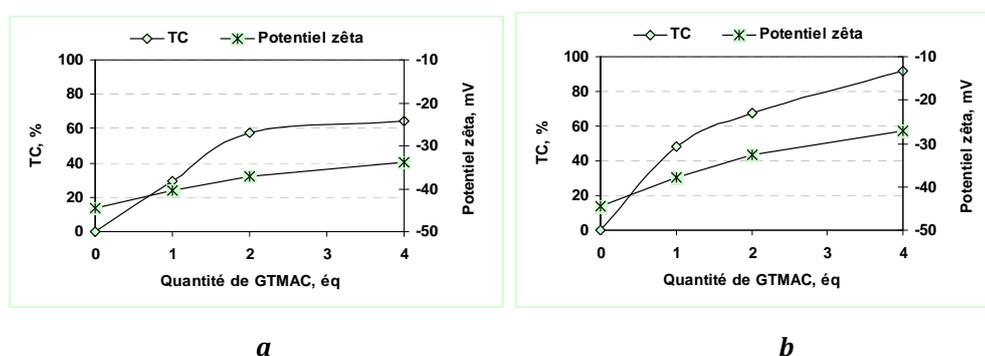


Figure III - 24. Influence de la quantité de GTMAC sur la réaction de cationisation de PS : (a) 40 °C et (b) 70 °C ; temps de réaction 1 heure.

Avec l'augmentation de la concentration des molécules de GTMAC dans le milieu, le nombre de groupements amines de la protéine qui participent à la réaction augmente également. C'est pourquoi le taux de cationisation le plus élevé a été obtenu pour les ratios molaires GTMAC /NH₂ de protéines de 4. Dans les mêmes conditions opératoires, la hausse de la température augmente la vitesse de cationisation. La même tendance a été observée dans les travaux de Kavaliauskaite [221] portés sur la cationisation de l'amidon par le GTMAC.

Avant l'addition du GTMAC (t=0) à pH 10, la valeur du potentiel zêta de l'extrait protéique de soja est négative (-44 mV). Le potentiel zêta augmente avec les taux de cationisation plus élevés. Cette augmentation confirme sans les quantifier la présence des groupements ammonium quaternaire, chargés positivement, dans la protéine.

Nous avons observé sur la **Figure III - 24** que le taux de cationisation de l'extrait protéique de soja atteint 91,6 % à un ratio molaire GTMAC/NH₂ de 4 et une température de 70 °C. Pour étudier l'effet du temps de réaction, des expériences de 2 heures et 4 heures ont été réalisées.

Les résultats présentés sur la **Figure III - 25** montrent qu'à partir de 1 heure de réaction un palier est atteint, le potentiel zêta et le taux de cationisation n'augmentent plus.

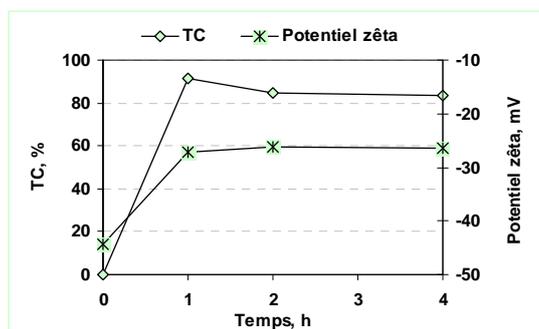


Figure III - 25. Influence du temps sur la réaction de cationisation de PS ; 4 éq de GTMAC, 70 °C.

Afin d'étudier l'influence du greffage des groupements hydrophiles par cationisation sur les propriétés fonctionnelles de l'extrait protéique de soja, nous avons décidé d'évaluer l'effet de cette modification sur la solubilité des protéines en fonction du pH. La solubilité de l'extrait protéique de soja natif (PS, 70 °C, 1 heure) est comparée avec celle de l'extrait protéique de soja cationisé (PS/TC=91,6 %, réalisé à 70 °C, 1 heure de réaction, 4 éq de GTMAC) et un blanc de cationisation des protéines (PS/blanc cationisation, réalisé sans GTMAC à 70 °C et à pH 10 pendant 1 heure). La solubilité des extraits protéiques natifs et modifiés (séchés par lyophilisation) a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (**Paragraphe IV.2.1.2, Annexe II**). La **Figure III - 26** présente les courbes de solubilité obtenues au cours de ces expériences.

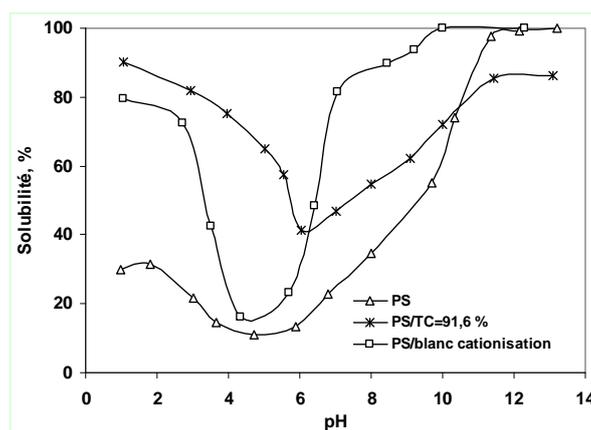


Figure III - 26. Courbes de solubilité des extraits protéiques de soja natifs et cationisés.

Nous constatons que le traitement des extraits protéiques à une température élevée et à pH basique affecte leur solubilité. Les isolats protéiques de soja du blanc de cationisation montrent une solubilité supérieure à celle de l'extrait protéique natif sur toute la gamme de pH.

Néanmoins, le point isoélectrique des deux échantillons (PS et PS/blanc cationisation) reste fixe à pH 4,5-5,0. En revanche, pour l'extrait protéique cationisé on observe clairement un décalage du point isoélectrique vers un pH de 6,0-6,5. Jusqu'à un pH de 10, la solubilité de l'extrait protéique cationisé est plus importante que celle de l'extrait protéique natif.

Ce résultat permet de montrer l'influence de la cationisation sur l'affinité des protéines avec l'eau. En effet, le greffage des groupements cationiques apporte à la protéine des charges positives, ce qui provoque le déplacement du point isoélectrique vers les pHs plus élevés [348]. A pH acide, les fonctions apportées par cationisation engendrent une répulsion entre les chaînes protéiques, l'abaissement des interactions protéine/protéine et donc l'augmentation de la solubilité. Alors qu'à pH basique, une attraction entre les sites cationiques et les fonctions COO⁻ peut être créée [217]. Cela peut entraîner la formation de structures compactes et la diminution de la solubilité des extraits protéiques cationisés.

III.5.1.2. Cationisation de l'extrait protéique de tournesol

Après l'étude de la cationisation de l'extrait protéique de soja par le GTMAC, la réaction avec l'extrait protéique de tournesol a été effectuée. Les conditions choisies pour cette modification correspondent à celles pour lesquelles le taux de cationisation de l'extrait protéique de soja était maximal (70 °C, 1 heure de la réaction). Les résultats présentés sur la [Figure III - 27](#) montrent que comme dans le cas de l'extrait protéique de soja, le taux de cationisation de l'extrait protéique de tournesol et le potentiel zêta augmentent avec la quantité de GTMAC dans le milieu réactionnel. Toutefois, les taux de modification sont plus faibles pour l'extrait protéique de tournesol par rapport à ceux obtenus pour l'extrait protéique de soja.

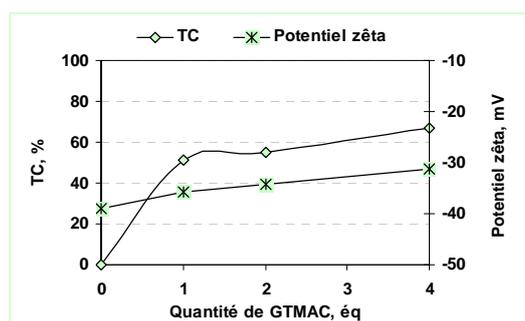


Figure III - 27. Influence de la quantité de GTMAC sur la réaction de cationisation de PT ; 70 °C, temps de réaction 1 heure.

III.5.2. Microencapsulation de l'α-tocophérol par les extraits protéiques cationisés

Les extraits protéiques modifiés par la cationisation ont été testés comme matériaux enrobants pour la microencapsulation. Pour ces expériences, deux échantillons d'extrait protéique de soja ont été choisis : le premier avec un taux de cationisation élevé de 91,6 % et le second avec un taux de cationisation faible de 29,6 %. L'extrait protéique de tournesol cationisé à 66,8 % a également été utilisé comme matériau enrobant pour encapsuler l'α-tocophérol.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau III - 13**. Nous remarquons que contrairement aux extraits protéiques natifs, les émulsions à base d'extrait protéique cationisé possèdent une viscosité réduite. Les extraits protéiques de soja et de tournesol fortement cationisés (66,8-91,6 %) montrent également une diminution de la rétention de la matière active hydrophobe. Cela est illustré par des valeurs d'efficacité d'encapsulation réduites. D'autre part, aucune influence significative sur l'efficacité de microencapsulation n'est observée pour le faible taux de cationisation de 29,6 %.

Tableau III - 13. Influence de la cationisation d'extraits protéiques de soja et de tournesol par le GTMAC sur le procédé de microencapsulation (TC – taux de cationisation).

Paramètre mesuré	PS /T*			PT/T*	
	natif	TC=91,6 %	TC=29,6 %	natif	TC=66,8 %
Viscosité de l'émulsion, mPa*s	15,1	4,1	6,6	36,1	5,8
Diamètre moyen des gouttelettes, µm	1,1	0,9	0,9	1,3	1,1
RA, %	67,9	61,3	67,4	70,0	63,4
EME, %	79,7±1,0	38,3±1,0	80,7±3,5	92,6±1,8	60,1±2,4
TME, %	26,3±0,3	12,6±0,3	26,7±1,1	30,5±0,6	19,8±0,7
Diamètre moyen des microparticules, µm	9,3	7,6	11,1	6,9	7,3

* – solution protéique à 8 % w/w, ratio extrait protéique/T de 1/0,5

Le greffage de fonctions polaires sur les protéines se traduit par l'amélioration de leurs propriétés hydrophiles. En milieu aqueux, les chaînes protéiques modifiées de cette manière sont, probablement, plus mobiles, ce qui favorise la réduction de la viscosité des préparations.

L'influence négative de la cationisation sur la microencapsulation de l'α-tocophérol est liée à la perte d'affinité entre les extraits protéiques cationisés et la matière active hydrophobe. Nous pouvons observer sur la **Figure III - 28** qu'après homogénéisation sous pression, les gouttelettes

d' α -tocophérol dans l'émulsion avec les extraits protéiques cationisés coalescent et remontent à la surface de la préparation.

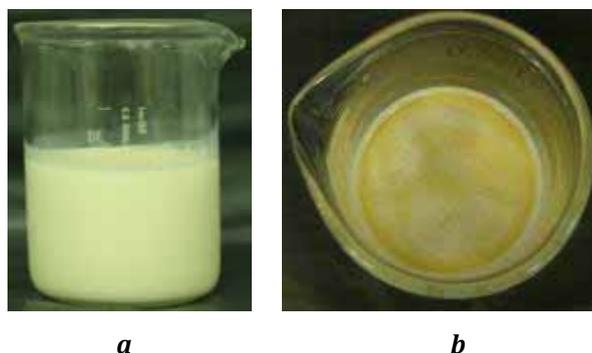


Figure III - 28. Aspect de l'émulsion PS/T (a) à base de l'extrait protéique natif et (b) à base de l'extrait protéique cationisé à 91,6 %.

En effet, l'émulsification de l' α -tocophérol (hydrophobe) devient plus difficile en présence de biopolymères avec des fonctions polaires (hydrophiles). La création d'une couche de protéines stabilisant les gouttelettes dans l'émulsion est donc plus délicate. La morphologie des émulsions obtenues a été étudiée par microscopie optique (Figure III - 29). Sur les images, nous pouvons apercevoir la présence de gouttelettes de grandes tailles (5-10 μm) pour l'émulsion avec l'extrait protéique de soja cationisé à 91,6 %. Par contre, les émulsions avec l'extrait protéique de tournesol et l'extrait protéique de soja faiblement cationisé montrent une bonne dispersion au niveau de la taille des gouttelettes.

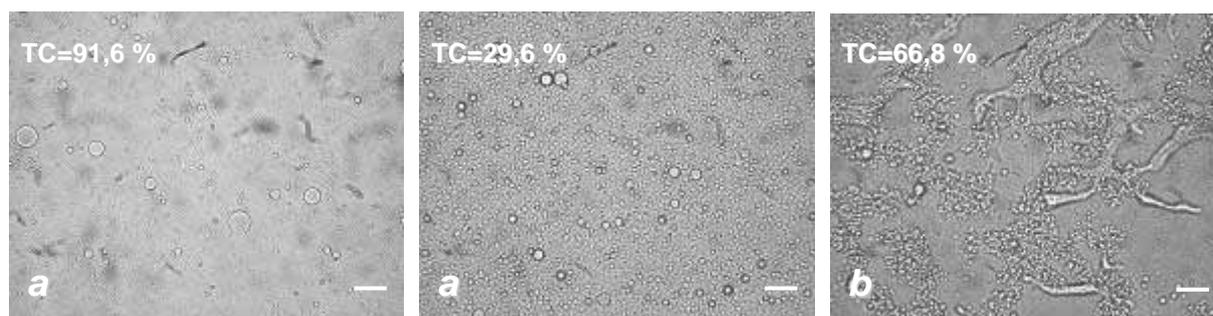


Figure III - 29. Microscopie optique : morphologie des émulsions à base d'extraits protéiques cationisés (a) PS/T et (b) PT/T ; TC - taux de cationisation. Barre d'échelle - 10 μm .

L'utilisation de l'extrait protéique de soja cationisé à 91,6 % ne permet pas une bonne émulsification de l' α -tocophérol. Ainsi, la perte de matière active non émulsionnée, pendant l'atomisation, est importante. Cette perte provoque la diminution du rendement du procédé et de l'efficacité de microencapsulation. Les distributions de taille des microparticules produites par atomisation sont présentées sur la Figure III - 30. Les particules de grandes tailles (11,1 μm)

ont été obtenues pour l'échantillon le plus chargé en matière active (extrait protéique de soja cationisé à 29,6 %).

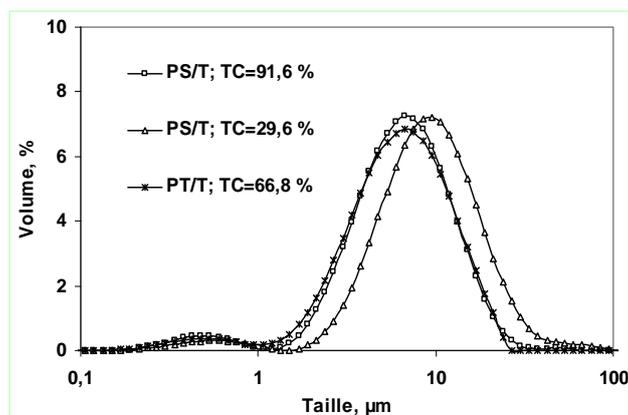


Figure III - 30. Distributions de taille des microparticules d'α-tocophérol encapsulé par les extraits protéiques cationisés ; TC – taux de cationisation.

III.5.3. Microencapsulation de l'acide ascorbique par les extraits protéiques cationisés

D'après les résultats présentés dans les paragraphes précédents, nous constatons que la cationisation augmente significativement le caractère hydrophile des extraits protéiques végétaux. Par conséquent, l'affinité des protéines avec les substances hydrophiles en solution devrait également augmenter. Pour confirmer cela, l'encapsulation de l'acide ascorbique a été effectuée dans les conditions PS/AA 5 (Tableau II - 15). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau III - 14. Nous constatons que le rendement d'atomisation est meilleur dans le cas de l'utilisation des extraits protéiques cationisés. Par contre, les efficacités de microencapsulation d'acide ascorbique par les extraits protéiques de soja natifs et cationisés sont comparables. La viscosité de la solution et la taille des microparticules diminuent légèrement après modification de l'extrait protéique de soja.

Tableau III - 14. Influence de la cationisation d'extrait protéique de soja sur le procédé de microencapsulation de l'acide ascorbique (TC – taux de cationisation).

Paramètre mesuré	PS/AA*	PS (TC=91,6%)/AA*
Viscosité, mPa*s	8,9	5,8
RA, %	80,7	87,0
EME, %	88,9±5,8	92,3±2,8
TME, %	29,3±1,9	30,5±0,9
Diamètre moyen des microparticules, μm	5,2	4,9

* - solution protéique à 8 % w/w, ratio PS (natives ou cationisées)/AA de 1/0,5

Le caractère hydrophile des isolats protéiques cationisés favorise une meilleure mobilité des chaînes protéiques au sein de la solution et donc la réduction de la viscosité. L'atomisation de cette préparation peu visqueuse permet d'obtenir des microparticules de plus petite taille et un rendement d'atomisation amélioré.

Contrairement à l'acylation de l'extrait protéique de soja, qui provoque une réduction de l'efficacité d'encapsulation de l'acide ascorbique (Tableau III - 10), la cationisation semble être favorable pour le procédé de microencapsulation de ce principe actif, car un meilleur rendement d'atomisation a été obtenu.

Nous pouvons conclure que la modification des extraits protéiques par cationisation permet de déplacer leur point isoélectrique et augmenter leur caractère hydrophile. La cationisation des protéines à un taux important a un effet négatif sur l'efficacité de microencapsulation de principes actifs hydrophobes. En revanche, cette modification peut être intéressante pour les applications en microencapsulation de principes actifs hydrophiles par atomisation, car dans ce cas elle permet d'améliorer le rendement du procédé et l'efficacité de microencapsulation.

III.6. Etude de la libération de l' α -tocophérol

Une fois encapsulée, la matière active peut être libérée des microparticules par la dégradation instantanée ou progressive de l'enrobage. La libération du principe encapsulé est le plus souvent déclenchée par le changement d'un paramètre physico-chimique (température, mise en contact avec le solvant, changement du pH) ou par une action mécanique.

Dans notre travail, une étude préliminaire de la libération de l' α -tocophérol encapsulé par les extraits protéiques de soja et de tournesol a été réalisée sur 24 heures (Paragraphe IV.2.4.7) dans un milieu aqueux à température ambiante à pH 7,4 en présence d'un agent tensioactif (Tween 80). Ce dernier est ajouté dans le milieu afin d'augmenter la solubilité de l' α -tocophérol [313]. Les cinétiques de libération réalisées pour des microparticules d' α -tocophérol encapsulé par des extraits protéiques natifs et modifiés sont présentées sur la Figure III - 31.

Les profils de libération obtenus montrent que le relargage de l' α -tocophérol est plus rapide dans le cas des microparticules à base d'extrait protéique de tournesol. La vitesse de relargage de la matière active contenue dans les microparticules à base d'extrait protéique de soja acylé est plus rapide que celle pour des microparticules à base d'extrait protéique natif et réticulé. En revanche, les modifications de l'extrait protéique de tournesol ne semblent pas avoir d'influence significative sur le profil de libération de la matière active.

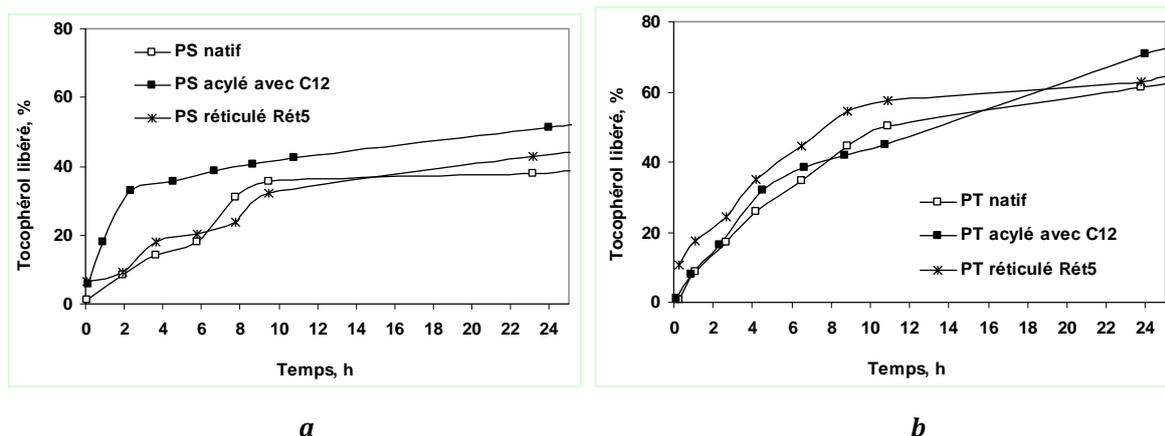


Figure III - 31. Cinétiques de libération de l'α-tocophérol encapsulé par les extraits protéiques de soja (a) et de tournesol (b) natifs ou modifiés. Ratio extrait protéique/T dans les microparticules est de 1/0,5.

La vitesse de libération plus importante pour les particules avec l'extrait protéique de tournesol peut être reliée à la solubilité plus élevée des protéines à pH neutre (Figure II - 2). La décomposition des microparticules constituées de chaînes protéiques de tournesol est plus rapide et la matière active est donc libérée plus rapidement.

L'encapsulation de l'α-tocophérol par l'extrait protéique de soja acylé (avec le chlorure de dodécanoyle, C12) permet de moduler les propriétés de libération par rapport aux protéines non modifiées. En effet, les extraits protéiques acylés ont des propriétés de surface plus prononcées. Ainsi, la dissociation de l'enrobage constitué de ces protéines, en milieu aqueux et en présence d'un agent tensioactif, est plus rapide.

Contrairement à nos attentes, la réticulation des extraits protéiques dans l'émulsion avant atomisation ne permet pas de mieux protéger la matière active encapsulée. De plus, la libération de l'α-tocophérol est légèrement plus rapide pour les microparticules à base d'extrait protéique de tournesol réticulé par rapport aux particules à base d'extrait protéique de tournesol natif. Ceci nous amène à penser que la réticulation des protéines n'a pas eu lieu "autour" des gouttelettes de la matière active. Dans l'émulsion après la réticulation, les gouttelettes d'α-tocophérol sont entourées par des agrégats des protéines réticulées. Ainsi, ces agrégats denses se dissocient plus facilement en milieu aqueux pendant le relargage. La matière active est donc moins protégée que dans les particules ayant des protéines non réticulées, où les chaînes individuelles forment un réseau de protection plus efficace.

III.7. Conclusions

La présence de sites fonctionnels sur les protéines, notamment les groupements amines, permet leur modification par diverses réactions. Ces modifications représentent une voie très intéressante pour moduler les propriétés des biopolymères et pour élargir leur champ d'applications.

Les fonctionnalisations des extraits protéiques de soja et de tournesol réalisées dans cette étude respectent les principes de la chimie verte. Elles permettent de modifier les propriétés fonctionnelles des protéines et notamment leur capacité d'encapsuler des matières actives d'origines différentes.

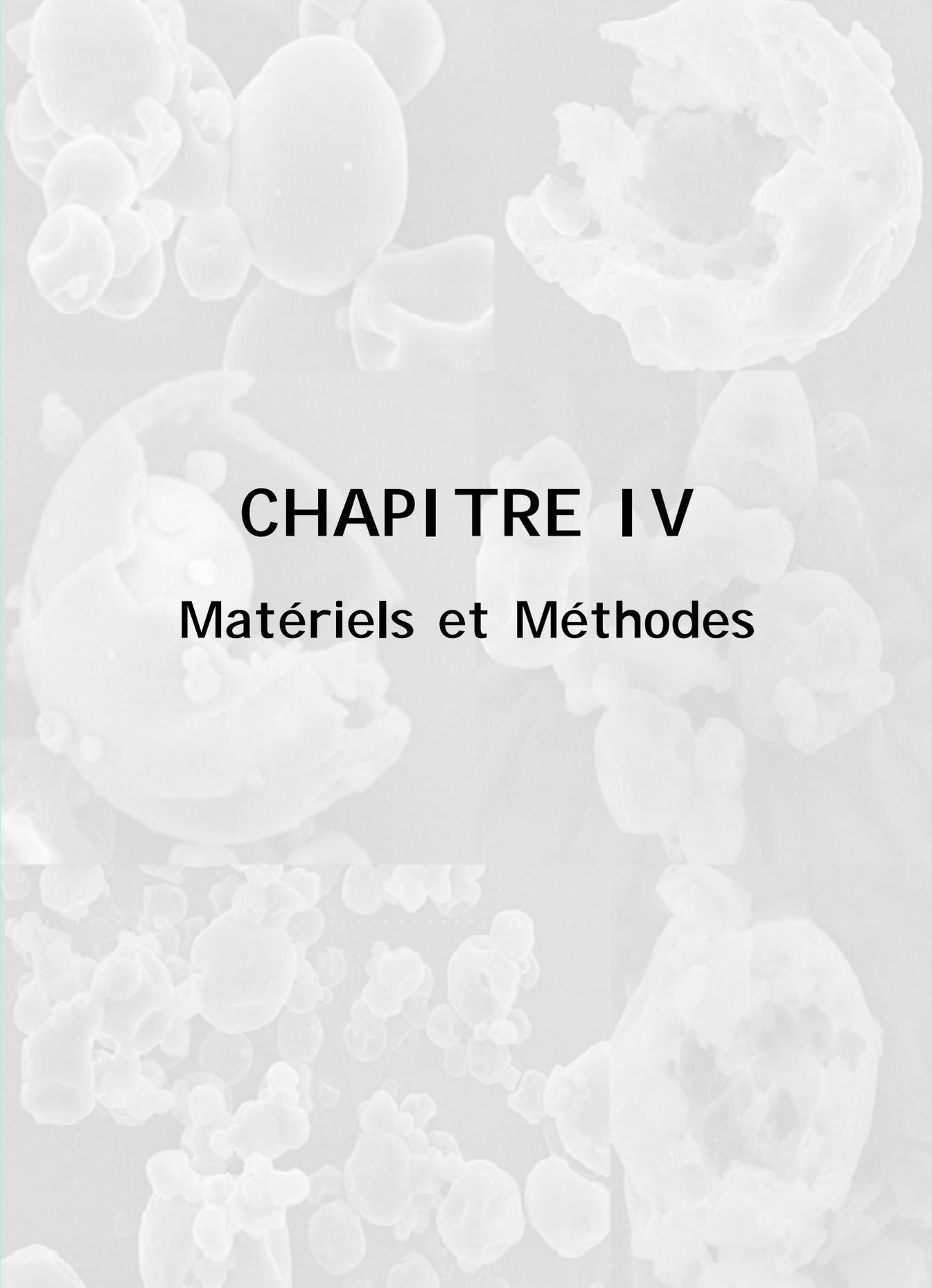
L'hydrolyse enzymatique des extraits protéiques n'apporte pas d'amélioration pour l'encapsulation de l' α -tocophérol. En revanche, les hydrolysats permettent d'obtenir des émulsions avec des gouttelettes de petite taille et une viscosité réduite.

Le greffage d'une chaîne grasse sur les protéines par acylation améliore leurs propriétés de surface et leur hydrophobicité. Grâce à une affinité améliorée avec l' α -tocophérol, nous avons observé une augmentation de l'efficacité de microencapsulation (jusqu'à 100 %). Par conséquent, cette modification peut être envisagée pour l'encapsulation de substances hydrophobes.

A des faibles taux de réticulation des extraits protéiques de soja et de tournesol (jusqu'à 20 %), aucune influence sur l'encapsulation de l' α -tocophérol n'a été observée. Par contre, la réticulation a un effet remarquable sur les propriétés des émulsions à cause de l'agrégation des protéines.

La fonctionnalisation des extraits protéiques végétaux par cationisation permet d'augmenter leur caractère hydrophile. Elle favorise également le déplacement du point isoélectrique des protéines vers des valeurs plus élevées. En microencapsulation, les extraits protéiques cationisés sont plus pertinents comme enrobage des principes actifs hydrophiles.

Ainsi, en fonction de la nature du principe actif que l'on envisage de protéger par microencapsulation, certaines modifications de la matière enrobante protéique peuvent être effectuées. Ces modifications permettront d'améliorer l'efficacité de microencapsulation et de rendre les microparticules plus adaptées à l'application visée.



CHAPITRE IV

Matériels et Méthodes

IV.1. Matériels

IV.1.1. Matières enrobantes : extraits protéiques de soja et de tournesol

Deux matières enrobantes différentes ont été utilisées pour la microencapsulation au cours de ce travail :

- l'extrait protéique de soja concentré à 90 % produit par Lustrel Laboratoires (Saint Jean de Vedas, France) ; cet extrait est une poudre de couleur blanc jaunâtre, inodore et non toxique ;
- l'extrait protéique de tournesol préparé à partir de tourteau non gras par la société CVG (Dury, France) ; les étapes du procédé d'extraction sont décrites dans l'[Annexe I](#). L'extrait protéique de tournesol obtenu est une poudre de couleur vert foncé, sans odeur prononcée et non toxique.

IV.1.2. Matières actives

L' α -tocophérol ou la vitamine E (pureté > 96 %) est acheté chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Il se présente sous la forme d'un liquide visqueux hydrophobe, non miscible avec l'eau, de couleur jaune-brun, inodore, non toxique, à conserver à l'abri de la lumière. L' α -tocophérol est soluble dans les solvants organiques apolaires (par exemple, l'hexane, le cyclohexane, le dichlorométhane).

L'acide ascorbique ou la vitamine C (pureté > 99 %) est acheté chez Sigma. Il s'agit d'une poudre cristalline, blanche, inodore et non toxique, hydrophile, donc soluble dans l'eau et les solvants polaires.

IV.1.3. Solvants et réactifs

L'eau déminéralisée est utilisée pour la préparation de toutes les solutions protéiques et des émulsions. Les produits suivants sont achetés chez Sigma et utilisés sans purification préalable : l'alcalase (protéase from *Bacillus licheniformis*, activité 2,4 U/g), l'acide chlorhydrique (37 %), l'acide sulfurique (95 %), le Tween 80 (polysorbate 80), l'hydroxyde de sodium, le diiode, le thiosulfate de sodium, le dodécyl sulfate de sodium, le tétraborate de sodium, l'orthophthaldialdéhyde, le dihydrogénophosphate de potassium, le monohydrogénophosphate de potassium, le β -mercapthoéthanol, la L-leucine (99 %), le chlorure d'octanoyle, le chlorure de dodécanoyle, le chlorure d'hexadécanoyle, le chlorure de glycidyl triméthylammonium, le *n*-hexane, le cyclohexane et l'éthanol (grade HPLC). La transglutaminase (1 % d'enzyme, 99 % de maltodextrine) avec une activité de 100 U/g est fournie par Ajinomoto Foods Europe SAS (Mesnil-Saint-Nicaise, France).

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Caractérisation et analyse des extraits protéiques

IV.2.1.1. Teneur en différents composants

Toutes les analyses de la composition des extraits protéiques sont effectuées en quadruplet.

Teneur en protéines. La teneur en matières azotées de l'extrait protéique est déterminée par la méthode de Kjeldahl [349,350] (Annexe II).

Teneur en eau. La teneur en eau de l'extrait protéique est déterminée par la perte de masse de l'échantillon sur la balance IR Sartorius (Gottingue, Allemagne) à 103 °C. 1 g d'extrait protéique est placé dans le creuset en aluminium et séché sur la balance jusqu'à masse constante.

Teneur en matières minérales. La teneur en matières minérales dans l'extrait protéique est déterminée par la différence de masse d'échantillon après calcination au four à 550 °C pendant 24 heures. Cette valeur est calculée par la relation suivante :

$$MM, \% = \frac{m_{\text{cendre}}}{m_{\text{prot}}} \times 100$$

avec MM – teneur en matières minérales, % ;

m_{cendre} – masse d'échantillon après calcination au four, g ;

m_{prot} – masse d'échantillon avant calcination au four, g.

Teneur en lipides. La teneur en lipides est déterminée après une extraction Soxhlet dans le cyclohexane. A peu près 1 g d'extrait protéique pesé précisément est placé dans la cartouche de l'appareil de Soxhlet. 10 mL de cyclohexane ainsi que quelques pierres ponce sont introduits dans le ballon préalablement taré. Après le chauffage à reflux pendant 7 heures, le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le ballon est placé à l'étuve à 40 °C pendant 24 heures. La teneur en lipides totaux est déterminée par la relation suivante :

$$L, \% = \frac{m_{b1} - m_{b0}}{m_{\text{prot}}} \times 100$$

avec L – teneur en lipides, % ;

m_{b0} – masse du ballon vide contenant quelques pierres ponce, g ;

m_{b1} – masse du ballon contenant les lipides et quelques pierres ponce, g ;

m_{prot} – masse d'extrait protéique introduite dans l'appareil, g.

Autres composés. La quantité de polysaccharides ou de sucres totaux dans l'extrait protéique est calculée par différence avec les teneurs en protéines, humidité, lipides et matières minérales.

IV.2.1.2. Evaluation de la solubilité des extraits protéiques par la méthode Kjeldahl

Des solutions aqueuses des extraits protéiques de soja et de tournesol sont préparées à différents pHs afin de tracer les courbes de solubilité. La concentration des solutions protéiques de soja est de 5 % w/w et celle des solutions protéiques de tournesol est de 3 % w/w. Le pH de chaque solution protéique est ajusté à l'aide des solutions de NaOH 4M et de HCl 4M. La solution est soumise à une agitation magnétique 500 tr/min à température ambiante (20-25 °C) ou à 70 °C durant une heure. La valeur du pH est notée après l'agitation. Les parties soluble et non-soluble de l'échantillon sont séparées par centrifugation à 10 000 tr/min, à 20 °C, pendant 15 min à l'aide d'un appareil 6-16K Sigma Centrifuge (Osteode, Germany). La détermination du taux de protéine solubilisée dans le surnageant est réalisée par la méthode de Kjeldahl (Annexe II). L'analyse est effectuée en duplicata. La solubilité pour chaque valeur de pH est exprimée de la façon suivante :

$$\text{Solubilité, \%} = \frac{\text{Teneur en protéines dans le surnageant}}{\text{Teneur en protéines dans la solution de départ}} \times 100$$

IV.2.1.3. Fractionnement des extraits protéiques selon la méthode d'Osborne

Le fractionnement des extraits protéiques de soja et de tournesol selon la méthode d'Osborne [151] est effectué selon le protocole décrit ci-dessous. 1 g d'extrait protéique délipidé (Soxhlet dans le cyclohexane, 7 heures) est mis en contact avec 20 mL d'eau déminéralisée pendant 2 heures à température ambiante sous agitation magnétique à 500 tr/min. La séparation liquide-solide est effectuée par centrifugation (10 000 tr/min, 15 min, 20 °C). La partie soluble, contenant de protéines solubles en milieu aqueux, est séparée de la partie non soluble. Cette dernière est mise en contact avec 20 mL d'une solution de NaCl 1M pendant 2 heures à température ambiante sous agitation magnétique pour extraire les protéines solubles dans la solution saline. La séparation liquide-solide est effectuée de la même façon. Le même protocole d'extraction est effectué avec deux autres solvants : l'eau à pH 12 et l'éthanol à 70 %, correspondant à l'extraction des fractions protéiques solubles dans la solution aclinine et hydro-alcoolique respectivement. La teneur en protéines solubilisées dans chaque fraction (surnageant récupéré sur chaque étape d'extraction) est déterminée par la méthode Kjeldahl (Annexe II). Le contenu des différentes fractions dans l'extrait protéique est déterminé par le calcul suivant :

$$\text{Fraction, \%} = \frac{\text{Teneur en protéines dans le surnageant}}{\text{Teneur en protéines dans la solution de départ}} \times 100$$

Toutes les fractions liquides des extraits de protéines solubilisées sont analysées en duplicat.

IV.2.1.4. Analyse de la composition en acides aminés

L'analyse de la composition en acides aminés des extraits protéiques est effectuée après une hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique, réalisée selon le protocole décrit dans le [Paragraphe IV.2.2.1.1](#). Le résidu obtenu après hydrolyse est dissous dans 3 mL d'une solution tampon de citrate de sodium à pH 2,2. 0,5 mL de cette solution est placé dans une fiole jaugée de 10 mL complétée avec la même solution tampon. La solution est filtrée à l'aide d'un filtre en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 0,45 µm. Les acides aminés des protéines de soja et de tournesol sont ensuite analysés en chromatographie par échange d'ions sur l'appareil Biochrom 30 Amino Acid Analyser (Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France). Chaque analyse est effectuée en quadruplet.

IV.2.2. Modifications des extraits protéiques

IV.2.2.1. Hydrolyse

IV.2.2.1.1. Hydrolyse acide totale

0,1 g d'extrait protéique est dissous dans 10 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 5,37 N, et placé dans un tube en verre de 20 mL. Afin que la réaction se déroule en atmosphère inerte, l'oxygène présent dans le tube est éliminé par un bullage sous azote pendant 2 min. Ensuite, le tube est scellé et chauffé à 105 °C pendant 24 heures. L'hydrolysate est filtré sur papier filtre et le filtrat est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est séché au dessiccateur sous vide à 40 °C, pendant 48 heures. Il est ensuite utilisé pour l'analyse des acides aminés ([Paragraphe IV.2.1.4](#)) et le dosage des fonctions amines par la méthode OPA ([Annexe III](#)).

IV.2.2.1.2. Hydrolyse enzymatique partielle

L'hydrolyse enzymatique est effectuée selon la méthode décrite par Kong *et al.* [195] avec quelques modifications. Elle est réalisée dans un ballon tricol équipé d'un pH-mètre, d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant. La solution protéique dans l'eau déminéralisée (400 g) à une concentration de 5 % w/w est préchauffée pendant 10 min à 50 °C sous agitation mécanique à 500 tr/min. Le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 4N. Une quantité d'enzyme

(alcalase) variant de 0,002 U à 0,025 U par gramme d'extrait protéique est ajoutée. Le pH est maintenu à 7 tout le long de l'hydrolyse (15 min à 2 h) par ajout d'une solution de NaOH 4N.

Pour arrêter la réaction d'hydrolyse, le pH est ajusté à 4,5 à l'aide d'une solution de HCl 4N. Le mélange réactionnel est refroidi à 20 °C, puis neutralisé par ajout de la solution de NaOH 4N. Afin de désactiver l'enzyme dans le milieu réactionnel, la solution est chauffée 5 min à 90 °C. L'extrait protéique ainsi hydrolysé est enfin séché par lyophilisation (Cryo-Rivoire equipment, Cryonext, Saint Gely du Fesc, France). Le degré d'hydrolyse (DH) est déterminé par dosage des fonctions amines par la méthode OPA (Annexe III). La quantité des groupements amines dans l'extrait protéique natif et l'extrait protéique totalement hydrolysé est préalablement évaluée par le même dosage.

$$DH, \% = \frac{(N_h - N_o)}{(N_t - N_o)} \times 100$$

avec N_h – nombre de mmol de fonctions amines de protéines partiellement hydrolysées ;

N_o – nombre de mmol de fonctions amines de protéines natives ;

N_t – nombre de mmol de fonctions amines de protéines totalement hydrolysées.

IV.2.2.2. N-acylation selon Schotten-Baumann

La réaction d'acylation est effectuée sur l'extrait protéique natif ou sur les hydrolysats (après hydrolyse enzymatique) selon le protocole décrit dans les travaux de Rondel *et al.* [181]. Une solution protéique dans l'eau déminéralisée (400 g) concentrée à 5 % w/w est préparée dans un ballon tricol équipé d'un pH-mètre, d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant. Le pH est ajusté à 10 par ajout d'une solution de NaOH 4N. Dans le cas de la modification des protéines hydrolysées, l'acylation commence tout de suite après la désactivation de l'enzyme dans le milieu réactionnel. La quantité nécessaire de chlorure d'octanoyle, de dodécanoyle ou d'hexadécanoyle est ajoutée goutte à goutte à la solution protéique. Le rapport molaire NH₂ de protéines/chlorure d'acide gras utilisé est de 1/0,5 et 1/1. La réaction d'acylation se déroule sous agitation mécanique à 500 tr/min pendant 30 min à température ambiante et ensuite pendant 3 heures à 50 °C. La valeur du pH est maintenue à 10 tout le long de la réaction par ajout d'une solution de NaOH 4N. La solution protéique obtenue est lyophilisée. Le taux d'acylation (TA) est déterminé par dosage des fonctions amines par la méthode OPA (Annexe III).

$$TA, \% = \frac{(N_o - N_a)}{N_o} \times 100$$

avec N_0 – nombre de mmol de fonctions amines de protéines natives ou d'hydrolysats protéiques ;

N_a – nombre de mmol de fonctions amines de protéines après acylation.

La poudre protéique finale n'est pas purifiée ; le chlorure d'acide qui n'a pas réagi avec la protéine est hydrolysé en sel de sodium d'acide gras (savon). Son taux peut être calculé selon la relation suivante :

$$Savon = \frac{n_{chl} \times M_{sel} \times ((100 - TA) / 100)}{m_{prot}}$$

avec $Savon$ – masse de chlorure d'acide gras n'ayant pas réagi par rapport à la masse d'extrait protéique, g/g ;

n_{chl} – nombre de moles de chlorure d'acide gras ajoutés dans le milieu réactionnel, mol ;

M_{sel} – masse molaire du sel d'acide gras (savon), g/mol ;

m_{prot} – masse d'extrait protéique dans le milieu réactionnel, g.

IV.2.2.3. Réticulation enzymatique

La réticulation enzymatique des extraits protéiques par la transglutaminase est effectuée selon le protocole décrit par Shand *et al.* [211] avec quelques modifications. Une solution d'extrait protéique (200 g) à 8 % w/w dans une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl 1 % w/w) est préparée. Elle est agitée à température ambiante pendant 2 heures à l'aide d'un agitateur mécanique à 500 tr/min, afin d'assurer une bonne hydratation des protéines. Pour se mettre dans des conditions similaires avec celles de microencapsulation, la solution protéique est homogénéisée à 50 MPa à l'aide d'un homogénéisateur sous haute pression APV Systems (Albertslund, Danemark). Puis, elle est placée dans un ballon tricol équipé d'un pH-mètre, d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant à 500 tr/min à une température de 50 °C et un pH de 7,5. Une quantité de la formulation enzymatique variant de 1 U à 10 U par gramme d'extrait protéique est ajoutée dans le milieu réactionnel (ces quantités correspondent aux rapports massiques extrait protéique/formulation enzymatique entre 10/1 w/w et 10/0,1 w/w respectivement).

Après 15 min à 45 min de réaction, la transglutaminase est désactivée à 90 °C pendant 5 min. La solution protéique est lyophilisée et le taux de réticulation (TR) des protéines est déterminé par dosage des fonctions amines par la méthode OPA (Annexe III).

$$TR, \% = \frac{(N_o - N_r)}{N_o} \times 100$$

avec N_o – nombre de mmol de fonctions amines de protéines natives;
 N_r – nombre de mmol de fonctions amines de protéines réticulées.

IV.2.2.4. Cationisation avec le chlorure de glycidyltriméthylammonium

La réaction de cationisation est réalisée dans un ballon tricol équipé d'un pH-mètre, d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant. Une solution d'extrait protéique à une concentration de 5 % w/w est préparée dans l'eau déminéralisée (400 g) avec un pH ajusté à 10. La préparation est préchauffée à la température de réaction (40 °C ou 70 °C). La quantité nécessaire de chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTMAC) est ajoutée goutte à goutte dans la solution protéique. Les rapports molaires NH_2 de protéines/GTMAC sont de 1/1, 1/2 ou 1/4. A la fin de réaction (1 heure, 2 heures ou 4 heures), la solution protéique est lyophilisée. Le taux de cationisation (TC) est déterminé par le dosage OPA des groupements amines libres (Annexe III) :

$$TC, \% = \frac{(N_o - N_c)}{N_o} \times 100$$

avec N_o – nombre de mmol de fonctions amines de protéines natives;
 N_c – nombre de mmol de fonctions amines de protéines cationisées.

IV.2.3. Procédé d'encapsulation de référence

IV.2.3.1. Préparation des solutions protéiques

Les solutions des extraits protéiques de soja ou de tournesol sont préparées dans l'eau à différentes concentrations : 2 %, 4 %, 6 %, 8 % ou 10 % w/w. Pour atteindre la solubilité maximale, le pH de la solution est fixé à 10,0-10,5 pour l'extrait protéique de soja et à 8,5-9,0 pour l'extrait protéique de tournesol. La solution est agitée à l'aide d'un agitateur mécanique (1000 tr/min) à 70 °C pendant 2 heures pour les échantillons de soja et 1 heure pour ceux de tournesol.

IV.2.3.2. Préparation des émulsions avec les extraits protéiques et l' α -tocophérol

IV.2.3.2.1. Préparation des émulsions avec les extraits protéiques solubilisés à pH alcalin

La préparation des émulsions à base d'extraits protéiques de soja et de tournesol et de l' α -tocophérol se déroule en plusieurs étapes. D'abord, 200 g de solution d'extrait protéique dans l'eau déminéralisée à une concentration de 8 % w/w à pH alcalin sont préparés comme décrit précédemment (Paragraphe IV.2.3.1). A la fin du temps d'agitation de la solution protéique, la

quantité nécessaire d' α -tocophérol (8-64) est ajoutée goutte à goutte sous agitation mécanique dans la solution aqueuse d'extrait protéique. Les rapports extrait protéique/ α -tocophérol (matière enrobante/matière active) utilisés sont 1/0,5, 1/1, 1/2 et 1/4 w/w. Enfin, la pré-émulsion est homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur sous haute pression APV Systems (Albertslund, Danemark) à des pressions de 30 MPa, 50 MPa ou 80 MPa avec 2 passages, ou à 50 MPa avec 2, 4 ou 6 passages.

IV.2.3.2.2. Préparation des émulsions avec les extraits protéiques réticulés

200 g de solution protéique (8 % w/w) dans une solution aqueuse de chlorure de sodium (NaCl 1 % w/w) à pH de 7,5 est agitée pendant 2 heures à température ambiante. L' α -tocophérol (8 g) est ajouté à la solution protéique sous agitation mécanique pour former une pré-émulsion avec un ratio extrait protéique/ α -tocophérol de 1/0,5. La préparation liquide est homogénéisée sous une pression de 50 MPa et 2 passages par l'homogénéisateur. La réticulation est effectuée directement après l'étape d'homogénéisation. Pour cela, l'émulsion est transférée dans un ballon tricol équipé d'un pH-mètre, d'un agitateur mécanique et d'un réfrigérant. La préparation est préchauffée à 50 °C et une quantité de transglutaminase variant de 1 U à 10 U par gramme d'extrait protéique est ajoutée. Les rapports massiques extrait protéique/formulation enzymatique utilisés varient donc de 10/0,1 w/w à 10/1 w/w (de 1 U à 10 U par gramme d'extrait protéique respectivement). Après 15 min de réaction, l'enzyme est désactivée à 90 °C pendant 5 min.

IV.2.3.3. Préparation des solutions d'extrait protéique/acide ascorbique

Les solutions d'extrait protéique/acide ascorbique sont préparées selon différents protocoles.

Protocole 1. Une solution aqueuse d'extrait protéique de soja (200 g) concentrée à 8 % w/w est préparée dans l'eau déminéralisée à pH neutre ou ajusté à 10,5 à l'aide d'une solution de NaOH 4N. Puis, la solution protéique est mise sous agitation mécanique à 1000 tr/min pendant 1 heure à température ambiante ou à 70 °C. L'acide ascorbique (8 g) est ajouté dans la solution protéique, afin d'obtenir un ratio matière enrobante/matière active (extrait protéique de soja/acide ascorbique) de 1/0,5. Etant donné que cet agent actif est un acide, le pH de la préparation finale descend à pH acide de 3,8-4,4 et une précipitation de la protéine est observée. Le pH de cette solution finale est maintenu acide ou ajusté à 10.

Protocole 2. 200 g d'une solution d'extrait protéique de soja (8 % w/w) sont préparés et 8 g d'acide ascorbique sont ajoutés pour obtenir un ratio extrait protéique/acide ascorbique de 1/0,5. Le pH de la solution est ajusté à 10,5 à l'aide d'une solution de NaOH 4N. Ensuite, cette solution est agitée mécaniquement à 1000 tr/min pendant 1 heure à 70 °C.

Les préparations liquides sont homogénéisées sous haute pression (50 MPa, 2 passages par l'homogénéisateur).

IV.2.3.4. Atomisation – préparation des microparticules

Les solutions protéiques préparées à différentes concentrations, les émulsions extrait protéique/ α -tocophérol et les solutions extrait protéique/acide ascorbique sont ensuite séchées par atomisation, afin d'obtenir des microparticules individualisées. Pour toutes les expériences, 200 g de formulation liquide sont préparés. La solution est pesée avant atomisation pour connaître la quantité exacte qui est inférieure à 200 g dû à la perte de masse pendant homogénéisation (de 20 g à 40 g). L'appareil utilisé pour l'atomisation est le Mini Spray Dryer B-290 de Büchi (Flawil, Suisse) présenté sur la [Figure IV - 1](#).



Figure IV - 1. Atomiseur de laboratoire Mini Spray Dryer B-290.

Les conditions d'atomisation sont les suivantes : la température d'entrée (T_{inlet}) est de 124 ± 4 °C, la température de sortie (T_{outlet}) de 75 ± 5 °C, le débit de la pompe de 20 % (330 mL/h), le débit d'air de 470 L/h, la pression d'air de 0,635 MPa. Les microparticules sont récupérées dans le récipient de collection et dans le cyclone, puis stockées dans un flacon fermé à 4 °C et à l'abri de la lumière. Le rendement du procédé d'atomisation est calculé par la relation suivante :

$$RA, \% = \frac{m_{m.s.}}{m_{initiale}} \times 100$$

avec RA – rendement du procédé d'atomisation, % ;

$m_{m.s.}$ – masse de matière sèche des microparticules collectées après l'atomisation, g ;

$m_{initiale}$ – masse de matière sèche dans la préparation liquide initiale atomisée (matière enrobante, matière active, additifs), g.

IV.2.4. Caractérisations physico-chimiques des extraits protéiques, émulsions, microparticules

IV.2.4.1. Mesure de la viscosité

Le comportement rhéologique des solutions protéiques et des émulsions avant et après homogénéisation sous pression, est étudié grâce à un rhéomètre Carrimed CSL100 (Dorking, Royaume-Uni) avec une géométrie de type cône-plan d'un diamètre de 6 cm. Un échantillon de 1-1,5 mL de la solution protéique ou de l'émulsion est prélevé et placé sur le plateau de l'appareil. La mesure de la viscosité est effectuée à 25 °C en balayage de contrainte entre 0 N/m² et 1 N/m² pendant 3 min. On considère que toutes les préparations liquides analysées ont un comportement de fluide Newtonien. La viscosité est calculée comme la pente de la droite décrivant l'évolution du gradient de vitesse en fonction de la contrainte appliquée :

$$\sigma = \eta \times \tau$$

avec σ – contrainte appliquée, N/m² ;

η – viscosité, Pa*s ;

τ – gradient de la vitesse, 1/s.

IV.2.4.2. Détermination de l'efficacité de microencapsulation

IV.2.4.2.1. Dosage du taux d' α -tocophérol dans les microparticules

En fonction du taux de l' α -tocophérol, 3 mg à 10 mg de microparticules ainsi que 10 mL de cyclohexane sont introduits dans un flacon. La solution est vivement agitée pendant 10 min et filtrée à 0,2 μ m à l'aide d'un filtre en PTFE. L'absorbance est mesurée l'aide d'un Spectrometer UV (1800 SHIMADZU, Koyoto, Japan) à 298 nm. A l'aide de la droite de calibration tracée ([Annexe IV](#)), la quantité d' α -tocophérol dans l'échantillon analysé (T_{exp}) est déterminée en mg/mL.

La quantité théorique de matière active ($T_{théo}$) en mg/mL est déterminée selon l'équation :

$$T_{théo} = \frac{m_{poudre} \times (T_{m.s.théo} / 100)}{V_{solv}}$$

avec m_{poudre} – masse de matière sèche des microparticules pesée, mg ;

$T_{m.s.théo}$ – pourcentage d' α -tocophérol par rapport à la matière sèche dans l'émulsion, % ;

V_{solv} – volume du solvant ajouté (10 mL dans notre cas), mL.

L'efficacité de microencapsulation (EME) est calculée comme le rapport entre la quantité mesurée et la quantité théorique de matière active dans les microparticules :

$$EME, \% = \frac{T_{exp}}{T_{théo}} \times 100$$

Le taux de microencapsulation (TME), correspondant au pourcentage de matière active dans les microparticules, est calculé par la relation suivante :

$$TME, \% = \frac{T_{exp} \times V_{solv}}{m_{poudre}} \times 100 = \frac{m_{T_{exp}}}{m_{poudre}} \times 100$$

avec $m_{T_{exp}}$ – masse de l' α -tocophérol dans la poudre déterminée expérimentalement, mg.

IV.2.4.2.2. Dosage de l'acide ascorbique dans les microparticules

5 à 10 mg de microparticules ainsi que 5 mL de la solution de diiode à 5 mmol/L sont introduits dans un flacon. Après quelques minutes d'agitation magnétique permettant de bien solubiliser les microparticules, la solution de diiode est titrée avec du thiosulfate de sodium à 5 mmol/L. La titration nous permet de déterminer la quantité de la solution de diiode ayant réagi avec l'acide ascorbique et l'extrait protéique. La quantité d'acide ascorbique dans l'échantillon est déterminée à l'aide de la droite de calibration tracée (Annexe V).

La proportion théorique d'acide ascorbique dans la préparation initiale est connue. Le rapport de la valeur théorique et celle déterminée expérimentalement permet de déterminer l'efficacité et le taux de microencapsulation, comme démontré dans le Paragraphe IV.2.4.2.1.

IV.2.4.3. Conditions de fractionnement des extraits protéiques par AsFIFFF

Le système de fractionnement AsFIFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation) est composé principalement d'une cellule de séparation (Annexe VI) connectée à un système Eclipse 2 permettant de régler les débits d'entrée et de sortie de l'électrovanne (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Allemagne), et un détecteur quantitatif UV à 280 nm (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne). Pour l'analyse, les solutions des extraits protéiques natifs de soja et de tournesol ainsi que de leurs hydrolysats sont préparées à une concentration de 0,5 % w/w à pH 9,0 et chauffées à 70 °C pendant 1 heure pour assurer une bonne solubilisation des extraits protéiques. L'eau déminéralisée à pH 9,0 filtrée à 0,1 μ m est utilisée comme éluant pour les analyses. Un spacer de cellule de 490 μ m d'épaisseur (surface de 22,17 cm², volume de cellule de 1,086 cm³) et un débit d'éluant de 1 mL/min sont employés pour la réalisation des expériences. Une membrane d'ultrafiltration de 10 kDa en cellulose régénérée (SC-10, Wyatt Technology Europe, Dernbach, Allemagne) est utilisée au cours des analyses. Le fractionnement des extraits protéiques est réalisé par deux méthodes distinctes (Tableau IV - 1).

Tableau IV - 1. Conditions de l'analyse AsFIFFF (X-flux croisé).

Etape*	Stabilisation	1			2			3	
		1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	
Méthode I, V_{inj} 30 μ L	Δt	6	1	3	1	4	15	20	5
	Temps, min	6	7	10	11	15	30	50	55
	Mode	Elution	Focus	Focus+ Injection	Focus	Elution	Elution	Elution	Elution+ Injection
	X start	0,2	-	-	-	2,5	2,5	0,2	0
	X end	2,5	-	-	-	2,5	0,2	0,2	0
	Focus Flow	-	1	1	1	-	-	-	-

Etape*	Stabilisation	1			2		3		
		1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	3.1	3.2	
Méthode II, V_{inj} 50 μ L	Δt	6	1	3	1	4	10	5	10
	Temps, min	6	7	10	11	15	25	30	40
	Mode	Elution	Focus	Focus+ Injection	Focus	Elution	Elution	Elution+ Injection	Elution
	X start	0,2	-	-	-	2,5	2,5	0	0
	X end	2,5	-	-	-	2,5	0,2	0	0
	Focus Flow	-	1	1	1	-	-	-	-

* **1** - focus et injection/relaxation

2 - fractionnement

3 - vidange de cellule

IV.2.4.4. Observations microscopiques

Les morphologies des émulsions/solutions protéiques et des microparticules préparées ont été analysées par microscopie optique et microscopie électronique à balayage respectivement.

IV.2.4.4.1. Microscopie optique – analyse des émulsions

L'échantillon à analyser est déposé au préalable entre lame et lamelle en verre de façon à obtenir une monocouche d'émulsion ou de solution protéique. La morphologie des préparations liquides est visualisée à l'aide d'un microscope optique Eclipse E600 Nikon (Sendai, Japon) muni d'un objectif d'immersion dans l'huile $\times 100$. Le microscope est connecté à une caméra vidéo numérique DXM1200 Nikon, l'ensemble étant contrôlé par un ordinateur en utilisant le logiciel Lucia G, permettant de récupérer les images. Les images n'ont pas subi de modification majeure, mis à part le réajustement de la couleur, de la luminosité et l'ajout de la barre d'échelle. Les images obtenues ont permis d'observer la morphologie et l'homogénéité des émulsions, les

phénomènes d'agglomération et de coalescence, ainsi que la structure des solutions protéiques avant et après réticulation.

IV.2.4.4.2. Microscopie électronique à balayage – analyse des microparticules

La morphologie des microparticules est observée à l'aide d'un microscope électronique à balayage LEO 435 VP de LEO Electron (Cambridge, Royaume-Uni), manipulé à 8 kV. Les particules à analyser sont disposées sur un ruban adhésif double-face puis métallisées avec de l'argent par pulvérisation. Afin de visualiser leur structure interne, les microparticules sont préalablement congelées dans l'azote liquide et broyées à l'aide d'un mortier.

IV.2.4.5. Granulométrie (mesure de taille des particules)

IV.2.4.5.1. Voie liquide – analyse des émulsions

Les distributions de tailles des gouttelettes d'huile dans l'émulsion sont obtenues à l'aide d'un appareil à diffusion de lumière Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). La puissance du laser de l'appareil est de 50 mV, la longueur d'onde du laser de 633 nm et l'angle d'observation de 173°. La gamme de taille des particules détectées par l'appareil est de 0,6 nm à 6,0 µm. Afin d'éviter l'effet de diffusion multiple et minimiser les interactions entre les particules en émulsion, qui peut fausser les résultats, 0,1 mL de l'émulsion est dilué dans une fiole jaugée de 10 mL (dilution 100 fois) avec l'eau déminéralisée de même pH. Pendant la mesure, on tient compte des hypothèses suivantes : lumière incidente monochromatique, particules sphériques, milieu de dispersion non absorbant. L'indice de réfraction utilisé pour le calcul de taille des particules $\eta_{\text{huile}}/\eta_{\text{eau}}$ est de 1,12 ($\eta_{\text{huile}}=1,49$, $\eta_{\text{eau}}=1,33$). Le diamètre moyen déterminé par cette méthode est le diamètre en volume de type $D_{4,3}$, représentant la proportion volumique d'un ensemble de particules dans une classe de diamètre par rapport au volume total des particules :

$$D_{4,3} = \frac{\sum_{i=1}^n V_i \times d_i}{\sum_{i=1}^n V_i}$$

avec V_i – volume de la particule i ;

d_i – diamètre de la particule i ;

$\sum_{i=1}^n V_i$ – volume total des particules.

IV.2.4.5.2. Voie sèche – analyse des microparticules

Le diamètre moyen des microparticules obtenues par atomisation est déterminé à l'aide d'un équipement Scirocco 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). Le fonctionnement de cet appareil est basé sur le principe de diffraction multi-angulaire de la lumière rouge du laser à 633 nm. La gamme de mesure de l'appareil est comprise entre 0,2 µm et 2000 µm. 200-300 mg de microparticules sont introduites dans le récipient de l'appareil et la mesure est effectuée dans les conditions suivantes : l'indice de réfraction utilisé est de 1,52, la pression de l'air de 0,4 MPa, le taux de vibration de 70 % et la durée de la mesure de 10 secondes (10 000 balayages). A partir de la distribution de taille, le diamètre moyen en volume $D_{4,3}$ des microparticules est déterminé par le logiciel (Malvern).

IV.2.4.6. Analyse thermogravimétrique

Les propriétés thermiques des échantillons sont analysées à l'aide d'un appareil ATG/DSC Q600 (TA Instruments, New Castle, EUA). 9-10 mg de l'échantillon analysé sont placés dans un creuset en platine et chauffés de la température ambiante à 1100 °C avec une vitesse linéaire de 10 °C/min. La stabilité thermique des microparticules (préparées avec les extraits protéiques et α -tocophérol) peut être présentée par la courbe de la différence des masses entre la courbe expérimentale et théorique :

$$\Delta M = M_{exp(microparticules)} - M_{theo(protéines+T)}$$

$$M_{theo(protéines+T)} = (1 - M_{theo T} \%) \times M_{exp\ protéines} + M_{theo T} \% \times M_{exp T}$$

avec ΔM – masse résiduelle de différence ;

$M_{exp(microparticules)}$ – masse résiduelle expérimentale des microparticules ;

$M_{theo(protéines+T)}$ – masse résiduelle théorique des microparticules calculée comme la somme des masses résiduelles expérimentales de l' α -tocophérol ($M_{exp T}$) et de l'extrait protéique ($M_{exp\ protéines}$) ;

$M_{theo T} \%$ – pourcentage de la masse théorique de l' α -tocophérol dans la poudre.

IV.2.4.7. Libération de l' α -tocophérol

Les essais de libération de l' α -tocophérol encapsulé par des extraits protéiques sont réalisés dans un milieu de tampon phosphate 0,05 M (pH 7,4) en présence d'un agent tensioactif (Tween 80 à 0,5 % w/w) [313]. 0,3 g de microparticules est mis en contact avec 100 mL de solution tampon. La libération est réalisée sous une faible agitation magnétique de 100 tr/min à température ambiante. Après le temps d'agitation défini, 5 mL de la dispersion sont prélevés du milieu. Afin de séparer les microparticules de la phase aqueuse, l'échantillon prélevé est centrifugé pendant 10 min à 20 °C et à une vitesse de 10 000 tr/min. 1 mL du surnageant obtenu

après centrifugation est mélangé avec 5 mL de cyclohexane dans un tube en verre de 20 mL. Une extraction de l' α -tocophérol à partir de la phase aqueuse est réalisée pendant 8 min sous agitation Vortex (Heidolph, Burladingen, Allemagne). L' α -tocophérol libéré est quantifié par le dosage en spectrométrie UV à 298 nm (Annexe IV). Le pourcentage de l' α -tocophérol relargué pour chaque prélèvement est déterminé par la relation suivante :

$$T_{\text{libéré}}, \% = \frac{T_{\text{exp}}}{T_{\text{total}}} \times 100$$

avec $T_{\text{libéré}}$ – taux d' α -tocophérol libéré, % ;

T_{exp} – quantité d' α -tocophérol libéré à partir d'une masse m de microparticules, mg/mL ;

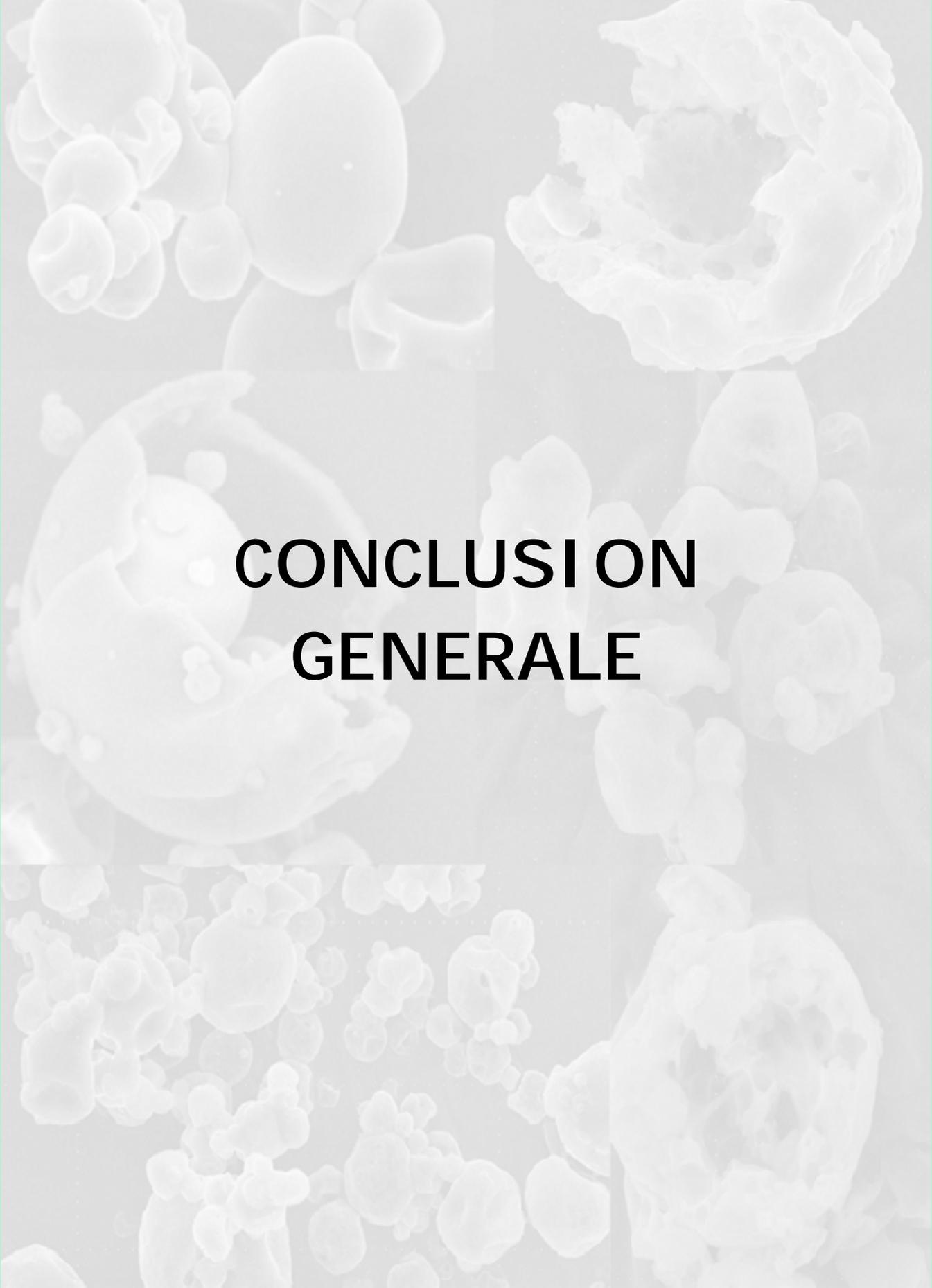
T_{total} – quantité d' α -tocophérol présent dans une masse m de microparticules, mg/mL.

IV.2.4.8. Mesure du potentiel zêta

Les solutions d'extrait protéique cationisé par le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTMAC) sont caractérisées par des mesures de potentiel zêta. Après la réaction, 0,1 mL de la solution protéique est dilué dans une fiole jaugée de 10 mL avec l'eau déminéralisée de même pH et analysé à l'aide d'un appareil Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). Le potentiel zêta est calculé comme la moyenne de trois valeurs mesurées par échantillon.

IV.2.4.9. Mesure du taux d'humidité

Le taux d'humidité des microparticules en poudre est déterminé par la perte de masse de l'échantillon sur la balance IR Sartorius (Gottingue, Allemagne) à 103 °C. 0,5 g d'échantillon est placé dans le creuset en aluminium et séché sur la balance jusqu'à masse constante.

The background of the slide is a collage of grayscale microscopic images. It features various cellular and sub-cellular structures, including clusters of small, rounded cells, larger individual cells with distinct nuclei, and complex, multi-layered structures that could be cross-sections of tissues or specialized cells. The images are semi-transparent and overlap each other, creating a textured, scientific aesthetic.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour premier objectif de mettre au point un procédé de microencapsulation utilisant les protéines végétales comme matériau enrobant. Ce procédé permettrait d'envisager de nouvelles voies de valorisation d'un coproduit agricole, le tourteau de tournesol d'où sont extraites les protéines. Le deuxième objectif était de comprendre l'influence des différentes modifications de la matrice protéique sur le procédé de microencapsulation et sur les propriétés des microparticules obtenues. Ainsi, la microencapsulation d'un principe actif hydrophobe (α -tocophérol) ou hydrophile (acide ascorbique) a été réalisée par la technique d'atomisation. Les protéines de soja et de tournesol à l'état natif ou modifié ont été utilisées comme matériaux enrobants au cours de cette étude.

Avant l'étude de la microencapsulation, il était important de caractériser la matière première. Ainsi, les extraits protéiques ont été caractérisés selon différents paramètres, à savoir la composition en différents constituants et en acides aminés, la solubilité, le fractionnement selon la méthode d'Osborne et le fractionnement par la technique AsFIFFF. Il s'est avéré que les extraits protéiques de soja et de tournesol possèdent des compositions similaires. Cependant, quelques points les différencient :

- l'extrait protéique de tournesol est plus riche en polysaccharides ;
- le taux en lysine est trois fois plus important dans l'extrait protéique de soja ;
- la solubilité de l'extrait protéique de tournesol est meilleure à pHs acides et basiques;
- les chaînes protéiques de tournesol possèdent des tailles plus faibles.

Après avoir caractérisé les protéines, nous nous sommes intéressés à leur utilisation en microencapsulation. Les paramètres choisis pour l'étude des préparations liquides avant l'étape de microencapsulation sont : la viscosité (émulsion ou solution protéique), la taille des gouttelettes de l'huile dans l'émulsion et la morphologie des préparations liquides. Les paramètres liés au procédé d'atomisation, tels que le taux d'humidité, la taille des microparticules, l'efficacité de microencapsulation, le taux de microencapsulation et le rendement d'atomisation ont été également étudiés.

Des essais d'atomisation des extraits protéiques seuls (sans matière active), ont permis de déterminer la concentration optimale permettant d'atteindre le meilleur rendement d'atomisation à une viscosité de la solution protéique relativement basse. Cette concentration est de 8 % w/w dans le cas de deux extraits protéiques.

L'étude du procédé de microencapsulation réalisée avec les extraits protéiques natifs a permis de mettre en évidence que :

- L'étape d'homogénéisation sous haute pression permet de stabiliser les préparations à base de protéines et d'assurer une microencapsulation efficace de la matière active hydrophobe ou hydrophile.
- Pour un ratio matière enrobante/matière active de 1/0,5, l'efficacité de microencapsulation de l' α -tocophérol par l'extrait protéique de tournesol est significativement meilleure que celle obtenue avec l'extrait protéique de soja (91-93 % et 77-80 % respectivement). Cela ouvre des nouvelles voies de valorisation des protéines de tournesol en microencapsulation de principes actifs hydrophobes pour diverses applications allant de produits agroalimentaires aux produits phytosanitaires.
- Les microparticules préparées avec des extraits protéiques, qu'ils soient de soja ou de tournesol, peuvent être chargées jusqu'à 80 % w/w en matière active hydrophobe, ce qui est intéressant pour la transformation des matières liquides en poudres hautement chargées.
- Les microparticules obtenues ont des diamètres moyens compris entre 5 μ m et 80 μ m, une morphologie sphérique avec une surface lisse et un intérieur poreux dans le cas de la matière active liquide (α -tocophérol), et une enveloppe dense et non poreuse dans le cas de la matière active solide (acide ascorbique).

La troisième partie de ce travail a été consacrée à la compréhension des interactions entre la matière enrobante et la matière active pendant la microencapsulation. Pour cela, quatre modifications chimiques ou enzymatiques ont été réalisées sur les protéines végétales :

- l'hydrolyse enzymatique par l'alcalase ;
- la *N*-acylation de Schotten-Baumann par des chlorures d'acides gras ;
- la réticulation enzymatique par la transglutaminase ;
- la cationisation par le chlorure de glycidyltriméthylammonium.

Toutes les réactions de fonctionnalisation ont été effectuées dans des conditions respectant les principes de la chimie verte.

Il est apparu que la présence des chaînes courtes de protéines, après hydrolyse enzymatique, n'assure pas une protection efficace de la matière active hydrophobe pendant l'atomisation. En revanche, un faible taux d'hydrolyse des protéines permet une réduction significative de la viscosité des préparations et une meilleure stabilité de l'émulsion.

La réticulation des protéines ne montre pas d'influence significative sur l'efficacité d'encapsulation, ni sur la libération d'une matière active hydrophobe en milieu aqueux.

Cependant, cette modification provoque un changement remarquable de la texture de l'émulsion et peut donc être envisagée pour la protection des matières actives au sein d'une préparation liquide.

Le greffage de chaînes grasses sur les protéines par acylation se traduit par l'amélioration de leurs propriétés tensioactives et permet d'augmenter l'efficacité de microencapsulation de l' α -tocophérol. Dans le cas des protéines de tournesol acylées, des efficacités proches ou égales à 100 % ont été obtenues. De toute évidence, cette modification entraîne l'augmentation de l'hydrophobicité des protéines et de leur affinité pour la matière active hydrophobe (α -tocophérol). Ainsi, la rétention de cette matière est améliorée. Inversement, la rétention de la matière active hydrophile (acide ascorbique) est réduite.

Enfin, nous avons montré que le greffage de groupements ammonium quaternaire sur les chaînes protéiques par cationisation permet de déplacer le point isoélectrique des protéines vers des valeurs plus élevées. Cette modification assure une bonne rétention de la matière active hydrophile (acide ascorbique), mais entraîne des difficultés lors de la stabilisation de l'émulsion avec le principe actif hydrophobe (α -tocophérol). Ceci a pour effet de réduire l'efficacité de microencapsulation.

Conformément aux objectifs fixés, nous pouvons confirmer que la nature du matériau enrobant et du principe actif jouent un rôle essentiel dans le procédé d'encapsulation par atomisation. Les résultats obtenus montrent que l'acylation est la modification la plus adaptée pour améliorer l'efficacité d'encapsulation des matières actives hydrophobes. En revanche, la cationisation des protéines, peut être envisagée dans le cas de l'encapsulation des matières actives hydrosolubles.

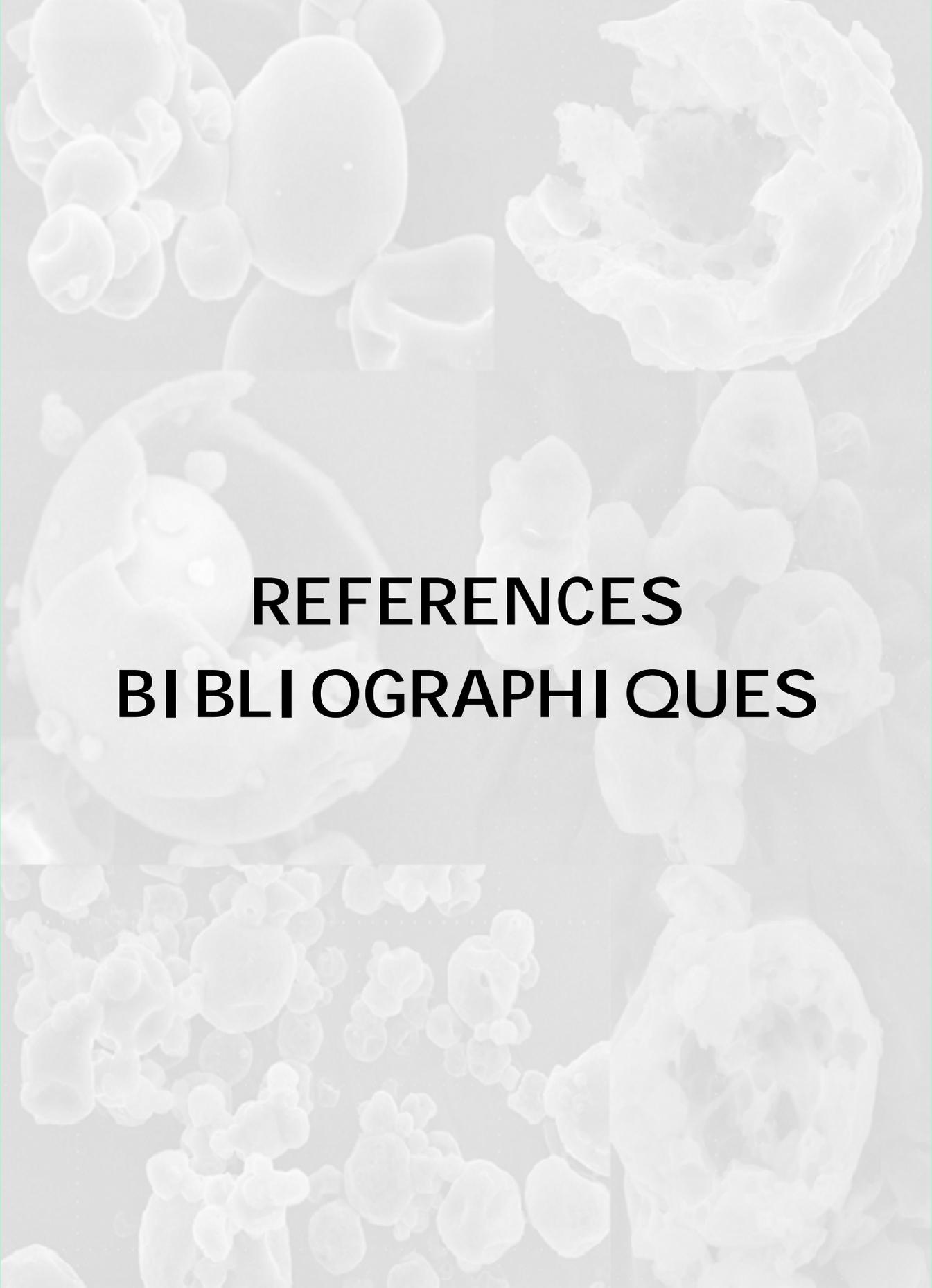
Ce travail de thèse a permis de décrire une nouvelle voie de valorisation des protéines de tournesol. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait protéique de tournesol représente un matériau enrobant plus efficace que l'extrait protéique de soja pour la microencapsulation. Les microparticules obtenues possèdent une morphologie sphérique avec la matière active protégée efficacement par l'enrobage protéique. De plus, nous avons prouvé qu'une modification appropriée du matériau enrobant protéique permet d'améliorer encore l'efficacité du procédé de microencapsulation.

Les perspectives qui s'offrent à ce travail sont nombreuses. Les protéines végétales, en particulier les protéines de tournesol, peuvent être envisagées pour la microencapsulation des principes actifs pour des applications dans le domaine cosmétique ou alimentaire. Cependant, ces applications nécessitent une étude et caractérisation des propriétés allergisantes des

protéines. Il sera également nécessaire d'effectuer l'extraction des composés phénoliques qui sont responsables de la couleur foncée des protéines de tournesol. En revanche, la présence des substances phénoliques n'est pas gênante pour les applications des protéines en agromatériaux. Ainsi, la microencapsulation des matières actives spécifiques, telles que les composés antimicrobiens/antifongiques ou les pesticides, par les protéines de tournesol peut être envisagée.

Ensuite, en fonction de l'application envisagée des microparticules, l'étude de libération de la matière active peut être approfondie en changeant le milieu de relargage. Par exemple, pour des applications en matériaux composites, il serait intéressant d'étudier la libération en fonction de l'humidité relative de l'air et de la température. De plus, d'autres modifications chimiques peuvent être réalisées afin de permettre le changement du point isoélectrique des protéines et par conséquent, la libération du principe actif en fonction du pH de milieu.

Enfin, il sera également intéressant de réaliser le transfert du procédé de microencapsulation de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote (en vue d'une production industrielle), afin de vérifier si les paramètres, tels que le rendement d'atomisation, la taille des microparticules et le taux de microencapsulation sont conservés.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Bourtoom T., Review article edible protein films: properties enhancement. *Int Food Res J*, **2009**, *16*, 1-9.
- [2] Kim H.J., Choi S.J., Shin W.S. and Moon T.W., Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates. *J Agric Food Chem*, **2003**, *51*, 1049-1056.
- [3] Adler-Nissen J. and Olsen U.S., The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified protein. *ACS Symposium Series 92*, **1979**, *7*, 125-146.
- [4] Liao L., Liu T.X., Zhao M.M., Cui C., Yuan B.E. et al., Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid. *Food Chem*, **2010**, *123*, 123-130.
- [5] Matemu A.O., Kayahara H., Murasawa H., Katayama S. and Nakamura S., Improved emulsifying properties of soy proteins by acylation with saturated fatty acids. *Food Chem*, **2011**, *124*, 596-602.
- [6] Mirmoghtadaie L., Kadivar M. and Shahedi M., Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate. *Food Chem*, **2009**, *114*, 127-131.
- [7] Yong Y.H., Yamaguchi S. and Matsumura Y., Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *J Agric Food Chem*, **2006**, *54*, 6034-6040.
- [8] Rouilly A., Orliac O., Silvestre F. and Rigal L., New natural injection-moldable composite material from sunflower oil cake. *Bioresource Technol*, **2006**, *97*, 553-561.
- [9] Silvestre F., Rigal L., Leyris J. and Gaset A., Aqueous adhesive based on a vegetable protein extract and process for the preparation. **2004**, Patent N° FR19980013573.
- [10] Leyris J., Silvestre F., Rigal L. and Gaset A., Method for making shaped objects from a vegetable raw material by pressing. **2000**, Patent N° EP0987089.
- [11] Rouilly A., Meriaux A., Geneau C., Silvestre F. and Rigal L., Film extrusion of sunflower protein isolate. *Polym Engineer Sci*, **2006**, *46*, 1635-1640.
- [12] Charve J. and Reineccius G.A., Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *J Agric Food Chem*, **2009**, *57*, 2486-2492.
- [13] Chen L. and Subirade M., Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 3327-3334.
- [14] Gan C.Y., Cheng L.H. and Easa A.M., Physicochemical properties and microstructures of soy protein isolate gels produced using combined cross-linking treatments of microbial transglutaminase and Maillard cross-linking. *Food Res Int*, **2008**, *41*, 600-605.
- [15] Kim Y.D., Morr C.V. and Schenz T.W., Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *J Agric Food Chem*, **1996**, *44*, 1314-1320.
- [16] Lazko J., Popineau Y. and Legrand J., Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloid Surface*, **2004**, *37*, 1-8.
- [17] Ortiz S.E.M., Mauri A., Monterrey-Quintero E.S. and Trindade M.A., Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray-drying with soybean protein isolate. *Food Sci Technol*, **2009**, *42*, 919-923.
- [18] Rascon M.P., Beristain C.I., Garcia H.S. and Salgado M.A., Carotenoid retention and storage stability of spray-dried paprika oleoresin using gum arabic and soy protein isolate as wall materials. *Food Sci Technol*, **2011**, *44*, 549-557.
- [19] Gonzalez-Perez S. and Vereijken J.M., Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *J Sci Food Agr*, **2007**, *87*, 2173-2191.
- [20] Augustin M.A. and Hemar Y., Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev*, **2009**, *38*, 902-912.
- [21] Dubey R., Shami T.C. and Bhasker Rao K.U., Microencapsulation technology and application. *Defence Sci J*, **2009**, *59*, 82-95.
- [22] Fergason J.L., Liquid crystals. *Scientific American*, **1964**, *211*, 77.

- [23] Rodrigues S.N., Fernandes I., Martins I.M., Mata V.G., Barreiro F. et al., Microencapsulation of limonene for textile application. *Ind Eng Chem Res*, **2008**, *47*, 4142-4147.
- [24] El-Zawahry M.M., El-Shami S. and El-Mallah M.H., Optimizing a wool dyeing process with reactive dye by liposome microencapsulation. *Dyes Pigments*, **2007**, *74*, 684-691.
- [25] Ge X., Wan Z., Song N., Fan A. and Wua R., Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. *J Food Eng*, **2009**, *94*, 122-128.
- [26] Bingham G., Gunning R.V., Gorman K., Field L.M. and Moores G.D., Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and α -cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests. *Pest Manag Sci*, **2007**, *63*, 276-281.
- [27] Stelinski L.L., McGhee P., Haas M., Ilichev A.L. and Gut L.G., Sprayable microencapsulated sex pheromone formulations for mating disruption of four tortricid species: effects of application height, rate, frequency, and sticker adjuvant. *J Econom Entomol*, **2007**, *100*, 1360-1369.
- [28] Nordstierna L., Abdalla A.A., Masuda M., Skarnemark G. and Nydén M., Molecular release from painted surfaces: Free and encapsulated biocides. *Prog Org Coat*, **2010**, *69*, 45-48.
- [29] Scher H.B., Rodson M. and Lee K.S., Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerization utilizing isocyanate or aminoplast chemistry. *Pestic Sci*, **1998**, *54*, 394-400.
- [30] Benita S., Hoffman A. and Donbrow M., Microencapsulation of paracetamol using polyacrylate resins (Eudragit Retard), kinetics of drug release and evaluation of kinetic model. *J Pharm Pharmacol*, **1985**, *37*, 391.
- [31] Huang Y.I., Cheng Y.H., Yu C.C., Tsai T.R. and Chama T.M., Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method: A formaldehyde-free approach. *Colloid Surface*, **2007**, *58*, 290-297.
- [32] Scalia S., Coppi G. and Iannuccelli V., Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter; butyl methoxydibenzoylmethane: in vivo skin penetration studies. *J Pharmaceut Biomed*, **2010**, *54*, 345-350.
- [33] Sefton M.V. and Broughton R.L., Microencapsulation of erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1982**, *717*, 473.
- [34] Sugamori M.E. and Sefton M.V., Microencapsulation of pancreatic islets in a water insoluble polyacrylate. *ASAIO Trans*, **1989**, *35*, 791.
- [35] Richard J. and Benoit J.P., Microencapsulation. *Techniques d'Ingénieur*, **2000**, *J 2 210*, 1-20.
- [36] Lazko J., **2004**, Etude des mécanismes et de procédé de formation des microparticules à partir des protéines végétales. In *Thèse de doctorat*, Université de Nantes.
- [37] Wischke C. and Schwendeman S.P., Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm*, **2008**, *364*, 298-327.
- [38] Sanchez L., Sanchez P., De-Lucas A., Carmona M. and Rodriguez J.F., Microencapsulation of phase change materials with a polystyrene shell. *Colloid Polym Sci*, **2007**, *285*, 1377-1385.
- [39] Supsakulchai A., Ma G.H., Nagai M. and Omi S., Preparation of uniform titanium dioxide (TiO₂) polystyrene based composite particles using the glass membrane emulsification process with a subsequent suspension polymerization. *J Microencapsul*, **2003**, *20*, 1-18.
- [40] Damge C., Vranckx, H., Balschmidt P. and Couvreur P., Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of Insulin. *J Pharm Sci*, **1997**, *86*, 1403-1409.
- [41] Tiarks F., Landfester K. and Antonietti M., Preparation of polymeric nanocapsules by miniemulsion polymerisation. *Langmuir*, **2001**, *17*, 908-918.
- [42] Ley S.V., Ramarao C., Lee A.L., Ostergaard N. and Smith S.C., Microencapsulation of osmium tetroxide in polyurea. *Organic Letter*, **2003**, *5*, 185-187.
- [43] Aebischer P., Wahlberg L., Tresco P.A. and Winn S., Macroencapsulation of dopamine secreting cells by co-extrusion with an organic polymer solution. *Biomaterials*, **1991**, *12*, 50-56.

- [44] Honiger J., Sarkis R., Baudrimont M., Delelo R., Chafai N. et al., Semiautomatic macroencapsulation of large number of porcine hepatocytes by co-extrusion with a solution of AN 69 polymer. *Biomaterials*, **2000**, *21*, 1269-1274.
- [45] Kröber H. and Teipel U., Microencapsulation of particles using supercritical carbon dioxide. *Chem Engineer Proces*, **2005**, *44*, 215-219.
- [46] Chiou A.H., Cheng H.C. and Wang D.P., Micronization and microencapsulation of felodipine by supercritical CO₂. *J Microencapsul*, **2006**, *23*, 265-276.
- [47] Patel S.K., Lavasanifar A. and Choi P., Molecular dynamics study of the encapsulation capability of a PCL-PEO based block copolymer for hydrophobic drugs with different spatial distributions of hydrogen bond donors and acceptors. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 1780-1786.
- [48] Elversson J. and Millqvist-Fureby A., Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein. *Int J Pharm*, **2005**, *294*, 73-87.
- [49] Salaüna F., Bedeka G., Devaux D., Dupont D. and Gengembre L., Microencapsulation of a cooling agent by interfacial polymerization: Influence of the parameters of encapsulation on poly(urethane-urea) microparticles characteristics. *J Membrane Sci*, **2011**, *370*, 23-33.
- [50] Hirech K., Payan S., Carnelle G., Brujes L. and Legrand J., Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerisation. *Powder Tech*, **2003**, *130*, 324-330.
- [51] Theron F., Anxionnaz-Minvielle Z., Le Sauze N. and Cabassud M., Transposition from a batch to a continuous process for microencapsulation by interfacial polycondensation. *Chem Engineer Proces*, **2012**, *54*, 42-54.
- [52] Saihi D., Vroman I., Giraud S. and Bourbigot S., Microencapsulation of ammonium phosphate with a polyurethane shell. Part II. Interfacial polymerization technique. *React Funct Polym*, **2006**, *66*, 1118-1125.
- [53] Vandamme T., Poncelet D. and Subra-Paternault P., Microencapsulation. *Lavoisier*, **2007**
- [54] Jeon Y.J., Vasanthan T., Temelli F. and 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*, **2003**, *36*, 349-355.
- [55] Murúa-Pagola B., Beristain-Guevara C.I. and Martínez-Bustos F., Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J Food Eng*, **2009**, *91*, 380-386.
- [56] Krishnan S., Bhosale R. and Singhal R.S., Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydr Polym*, **2005**, *61*, 95-102.
- [57] Shaikh J., Bhosale R. and Singhal R., Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chem*, **2006**, *94*, 105-110.
- [58] Saénz C., Tapia S., Chávez J. and Robert P., Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem*, **2009**, *114*, 616-622.
- [59] Semyonov D., Ramon O., Kaplun Z., Levin-Brener L., Gurevich N. et al., Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Res Int*, **2010**, *43*, 193-202.
- [60] Roque A.C.A., Bicho A., Batalha I.L., Cardoso A.S. and Hussain A., Biocompatible and bioactive gum Arabic coated iron oxide magnetic nanoparticles. *J Biotechnol*, **2009**, *114*, 313-320.
- [61] Ramakrishnan A., Pandit N., Badgujar M., Bhaskar C. and Rao M., Encapsulation of endoglucanase using a biopolymer Gum Arabic for its controlled release. *Bioresource Technol*, **2007**, *98*, 368-372.
- [62] Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F.M. and Arguelles-Monal W., Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydr Polym*, **2004**, *56*, 41-45.
- [63] Anal A.K., Stevens W.F. and Remunan-Lopez C., Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Int J Pharm*, **2006**, *312*, 166-173.

- [64] Remunan-Lopez C., Lorenzo-Lamosa M.L., Vila-Jato J.L. and Alonso M.J., Development of new chitosan-cellulose multicore microparticles for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, **1998**, *45*, 49-56.
- [65] Zheng L., Ding Z., Zhang M. and Sun J., Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *J Food Eng*, **2011**, *104*, 89-95.
- [66] Drusch S., Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloid*, **2007**, *21*, 1223-1228.
- [67] Shu B., Yu W., Zhao Y. and Liu X., Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J Food Eng*, **2006**, *76*, 664-669.
- [68] Favaro-Trindade C.S., Santana A.S., Monterrey-Quintero E.S., Trindade M.A. and Netto F.M., The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloid*, **2010**, *24*, 336-340.
- [69] Gan C.Y., Cheng L.H. and Easa A.M., Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innov Food Sci Emerg Tech*, **2008**, *9*, 563-569.
- [70] Bédié G.K., Turgeon S.L. and Makhlof J., Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloid*, **2008**, *22*, 836-844.
- [71] Young S.L., Sadra X. and Rosenberg M., Microencapsulating properties of whey proteins 2. Combination of whey proteins with carbohydrates. *J Dairy Sci*, **1993**, *76*, 2878-2885.
- [72] Keogh M.K. and O'Kennedy B.T., Milk fat microencapsulation using whey proteins. *Int Dairy J*, **1999**, *9*, 657-663.
- [73] Lee S.J. and Rosenberg M., Microencapsulation of theophylline in whey proteins: effects of core-to-wall ratio. *Int J Pharm*, **2000**, *205*, 147-158.
- [74] Yu J.Y. and Lee W.C., Microencapsulation of pyrrolnitrin from *Pseudomonas cepacia* using gluten and casein. *J Ferment Bioeng*, **1997**, *84*, 444-448.
- [75] Drusch S., Serfert Y., Berger A., Shaikh M.Q., Rätzke K. et al., New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. *Food Hydrocolloid*, **2012**, *27*, 332-338.
- [76] Eldem T., Speiser P. and Hincal A., Optimization of spray-dried and -congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm Res*, **1991**, *8*, 47-54.
- [77] Lee K.E., Cho S.H., Lee H.B., Jeong S.Y. and Yuk S.H., Microencapsulation of lipid nanoparticles containing lipophilic drug. *J Microencapsul*, **2003**, *20*, 489-496.
- [78] Muller R.H., Radtke M. and Wissing S.A., Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm*, **2002**, *242*, 121-128.
- [79] McClements D.J., Decker E.A. and Weiss J., Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J Food Sci*, **2007**, *72*, 109-124.
- [80] Dardelle G., Normand V., Steenhoudt M., Bouquerand P., Chevalier M. et al., Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocolloid*, **2007**, *21*, 953-960.
- [81] Given P.S., Encapsulation of flavors in emulsions for beverages. *Cur Opin Colloid Interface Sci*, **2009**, *14*, 43-47.
- [82] Marcuzzo E., Sensidoni A., Debeaufort F. and Voilley A., Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavour release. *Carbohydr Polym*, **2010**, *80*, 984-988.
- [83] Wilson N. and Shah N.P., Microencapsulation of vitamins. Review paper. *ASEAN Food J*, **2007**, *14*, 1-4.

- [84] Pierucci A.P.T.R., Andrade L.R., Baptista E.B., Volpato N.M. and Rocha-Leao M.H.M., New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *J Microencapsul*, **2006**, *23*, 654-662.
- [85] Junyaprasert V.B., Mitrevej A., Sinchaipanid N., Broome P. and Wurster D.E., Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation. *Drug Dev Ind Pharm*, **2001**, *27*, 561-566.
- [86] Lokuwan J., Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray-drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloid*, **2007**, *21*, 928-935.
- [87] Priamo W.L., Cezaro A.M., Ferreira S.R.S. and Oliveira J.V., Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *J Supercrit Fluid*, **2010**, *54*, 103-109.
- [88] Somchue W., Sermsri W., Shiowatana J. and Siripinyanond A., Encapsulation of α -tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Res Int*, **2009**, *42*, 909-914.
- [89] Trombino S., Cassano R., Muzzalupo R., Pingitore A., Cione E. et al., Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of β -carotene and α -tocopherol. *Colloid Surface*, **2009**, *72*, 181-187.
- [90] Yoo S.H., Song Y.B., Chang P.S. and Lee H.G., Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *Int J Biol Macromol*, **2006**, *38*, 25-30.
- [91] Kapusniak J. and Tomasik P., Lipid microencapsulation in starch. *J Microencapsul*, **2006**, *23*, 341-348.
- [92] Wehrle K., Gallagher E., Neville D.P., Keogh M.K. and Arendt E.K., Microencapsulated high-fat powders in biscuit production. *Eur Food Res Tech*, **1999**, *208*, 388-393.
- [93] Abbasi S., Rahimi S. and Azizi M.H., Influence of microwave-microencapsulated citric acid on some sensory properties of chewing gum. *J Microencapsul*, **2009**, *26*, 90-96.
- [94] Hammill T.B. and Crawford R.L., Bacterial microencapsulation with three algal polysaccharides. *Can J Microbiol*, **1997**, *43*, 1091-1095.
- [95] Kailasapathy K., Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr Iss Intestin Microbiol*, **2002**, *3*, 39-48.
- [96] Anjani K., Kailasapathy K. and Phillips M., Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *Int Dairy J*, **2007**, *17*, 79-86.
- [97] Abbasi S. and Azari S., Efficiency of novel iron microencapsulation techniques: fortification of milk. *Int J Food Sci Techn*, **2011**, *46*, 1927-1933.
- [98] Irache J.M., Bergougnoux L., Ezpeleta I., Gueguen J. and Orecchioni A.M., Optimization and in vitro stability of legumin nanoparticles obtained by a coacervation method. *Int J Pharm*, **1995**, *126*, 103-109.
- [99] Hildebrand G.E. and Tack J.W., Microencapsulation of peptides and proteins. *Int J Pharm*, **2000**, *196*, 173-176.
- [100] Gharsallaoui A., Roudaut G., Beney L., Chambin O., Voilley A. et al., Properties of spray-dried food flavours microencapsulation with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. *Food Chem*, **2012**, *132*, 1713-1720.
- [101] Gharsallaoui A., Saurel R., Chambin O., Cases E., Voilley A. et al., Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chem*, **2010**, *122*, 447-454.
- [102] Ezpeleta I., Irache J.M., Stainmesse S., Chabenat C., Gueguen J. et al., Preparation of lectin-vicilin nanoparticle conjugates using the carbodiimide coupling technique. *Int J Pharm*, **1996**, *142*, 227-233.
- [103] Wang R., Tian Z. and Chen L., A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Res Int*, **2011**, *44*, 2735-2741.

- [104] Lazko J., Popineau Y., Renard D. and Legrand J., Microcapsules based on glycinin-sodium dodecyl sulfate complex coacervation. *J Microencapsul*, **2004**, *21*, 59-70.
- [105] Faqi A.S., Richards D., Hauswirth J.W. and Schroeder R., Maternal and developmental toxicity study of sodium azide in rats. *Regul Toxicol Pharm*, **2008**, *52*, 158-162.
- [106] Leung H.W., Ecotoxicology of glutaraldehyde: review of environmental fate and effects studies. *Ecotox Environ Safe*, **2001**, *49*, 26-39.
- [107] Pitaksuteepong T., Davies N.M., Tucker L.G. and Rades T., Factors influencing the entrapment of hydrophilic compounds in nanocapsules prepared by interfacial polymerisation of water-in-oil microemulsions. *Eur J Pharm Biopharm*, **2002**, *53*, 335-342.
- [108] Janssen L.J.J.M. and Nijenhuis K., Encapsulation by interfacial polycondensation. *J Membrane Sci*, **1992**, *65*, 59-75.
- [109] Bouchemal K., Briancon S., Fessi H., Chevalier Y., Bonnet I. et al., Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules. *Material Sci Eng*, **2006**, *26*, 472-480.
- [110] Liang C., Lingling X., Hongbo S. and Zhibin Z., Microencapsulation of butyl stearate as a phase change material by interfacial polycondensation in a polyurea system. *Energy Convers Manage*, **2009**, *50*, 723-723.
- [111] Zydowicz N., Chaumont P. and Soto-Portas M.L., Formation of aqueous core polyamide microcapsules obtained via interfacial polycondensation: Optimization of the membrane formation through pH control. *J Membrane Sci*, **2001**, *189*, 41-58.
- [112] Yu D.G. and An J.H., Titanium dioxide core/polymer shell hybrid composite particles prepared by two-step dispersion polymerization. *Colloid Surface*, **2004**, *237*, 87-93.
- [113] Bourgeat-Lami E. and Lang J., Encapsulation of inorganic particles by dispersion polymerization in polar media. *J Colloid Interf Sci*, **1999**, *210*, 281-289.
- [114] Xu Z.Z., Wang C.C., Yang W.L., Deng Y.H. and Fu S.K., Encapsulation of nanosized magnetic iron oxide by polyacrylamide via inverse miniemulsion polymerization. *J Magn Magn Mater*, **2004**, *277*, 136-143.
- [115] Kai Z., Qiang F., Jinghui F. and Dehui Z., Preparation of Ag/PS composite particles by dispersion polymerization under ultrasonic irradiation. *Mater Lett*, **2005**, *59*, 3682-3686.
- [116] Liu S., Elmer C., Low N.H. and Nickerson M.T., Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate-gum Arabic complexes. *Food Res Int*, **2010**, *43*, 489-495.
- [117] Moschakis T., Murray B.S. and Biliaderis C.G., Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloid*, **2010**, *24*, 8-17.
- [118] Dai R., Wu G., Li W., Zhou Q., Li X. et al., Gelatin/carboxymethylcellulose/dioctyl sulfosuccinate sodium microcapsule by complex coacervation and its application for electrophoretic display. *Colloid Surface*, **2010**, *362*, 84-89.
- [119] Dong Z.G., Xia S.Q., Hua S., Hayat K., Zhang X.M. et al., Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. *Colloid Surface*, **2008**, *63*, 41-47.
- [120] Strauss G. and Gibson S.M., Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloid*, **2004**, *18*, 81-89.
- [121] Onder E., Sarier N. and Cimena E., Encapsulation of phase change materials by complex coacervation to improve thermal performances of woven fabrics. *Thermochim Acta*, **2008**, *467*, 63-72.
- [122] Weinbreck F., Minor M. and Kruif C.G., Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. *J Microencapsul*, **2004**, *21*, 667-679.
- [123] Saravanan M. and Panduranga Rao K., Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydr Polym*, **2010**, *80*, 808-816.

- [124] Weib G., Knoch A., Laicher A., Stanislaus F. and Daniels R., Simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP) I. Temperature and pH dependency of coacervate formation. *Int J Pharm*, **1995**, *124*, 87-96.
- [125] Palomo M.E., Ballesteros M.P. and Frutos P., Solvent and plasticizer influences on ethylcellulose-microcapsules. *J Microencapsul*, **1996**, *13*, 307-318.
- [126] Mohanty B., Aswal V.K., Kohlbrecher J. and Bohidar H.B., Synthesis of gelatin nanoparticles via simple coacervation. *J Surf Sci Tech*, **2005**, *21*, 149-160.
- [127] Freitas S., Merkle H.P. and Gander B., Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release*, **2005**, *102*, 313-332.
- [128] Li M., Rouaud O. and Poncelet D., Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*, **2008**, *363*, 26-39.
- [129] Andreani L., Cercena R., Ramos B.G.Z. and Soldi V., Development and characterization of wheat gluten microspheres for use in a controlled release system. *Mater Sci Eng*, **2009**, *29*, 524-531.
- [130] Jones D.S. and Pearce K.J., An investigation of the effects of some process variables on the microencapsulation of propranolol hydrochloride by the solvent evaporation method. *Int J Pharm*, **1995**, *118*, 199-205.
- [131] Leo E., Forni F. and Bernabei M.T., Surface drug removal from ibuprofen-loaded PLA microspheres. *Int J Pharm*, **2000**, *196*, 1-9.
- [132] Heidebach T., Forst P. and Kulozik U., Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloid*, **2009**, *23*, 1670-1677.
- [133] Silva C.M., Ribeiro A.J., Figueiredo I.V., Goncalves A.R. and Veiga F., Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *Int J Pharm*, **2006**, *311*, 1-10.
- [134] Yufera M., Fernandez-Diaz C. and Pascual E., Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. *Aquaculture*, **2005**, *248*, 253-262.
- [135] Dewettinck K. and Huyghebaert A., Fluidized bed coating in food technology. *Trends Food Sci Tech*, **1999**, *10*, 163-168.
- [136] Hampel N., Bück A., Peglow M. and Tsotsas E., Continuous pellet coating in a wurster fluidized bed process. *Chem Engineer Sci*, **2013**, *86*, 87-98.
- [137] Ehlers H., Räikkönen H., Antikainen O., Heinämäki J. and Yliruusi J., Improving flow properties of ibuprofen by fluidized bed particle thin-coating. *Int J Pharm*, **2009**, *368*, 165-170.
- [138] Yuliani S., Torley P.J., D'Arcy B., Nicholson T. and Bhandari B., Extrusion of mixtures of starch and D-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food Res Int*, **2006**, *39*, 318-331.
- [139] Bocquel D., Microencapsulation d'arômes par extrusion. <http://itv.hevs.ch/switzerland/micro-encapsulation-aromes-extrusion.html>.
- [140] Gouin S., Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Tech*, **2004**, *15*, 330-347.
- [141] Chen A.Z., Li Y., Chau F.T., Lau T.Y., Hua J.Y. et al., Microencapsulation of puerarin nanoparticles by poly(L-lactide) in a supercritical CO₂ process. *Acta Biomaterialia*, **2009**, *5*, 2913-2919.
- [142] Garay I., Pocheville A. and Madariaga L., Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. *Powder Tech*, **2010**, *197*, 211-217.
- [143] Yeo S.D. and Kirana E., Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *J Supercrit Fluid*, **2005**, *34*, 287-308.
- [144] Thote A.J. and Gupta R.B., Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release. *Nanomedicine*, **2005**, *1*, 85-90.

- [145] Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A. and Saurel R., Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int*, **2007**, *40*, 1107-1121.
- [146] Rattes A.L.R. and Oliveira W.P., Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Tech*, **2007**, *171*, 7-14.
- [147] Wan L.S.C., Heng P.W.S. and Chia C.G.H., Preparation of coated particles using a spray drying process with an aqueous system. *Int J Pharm*, **1991**, *77*, 183-191.
- [148] Rosenberg M. and Sheu T.Y., Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey-protein-based wall system. *Int Dairy J*, **1996**, *6*, 273-284.
- [149] Godon B., Protéines végétales, **1985**, Technique et documentation (Lavoisier).
- [150] Lefebvre S., Gerland C., Maury C. and Gazzola M., Nouvelles colles végétales : origines, propriétés et performances. *Revue Française d'Oenologie*, **2000**, *184*, 28-32.
- [151] Osborne T.B., The vegetable proteins, **1924**, Green and Co.
- [152] Lakemond C.M.M., Jongh H.H.J., Hessing M., Gruppen H. and Voragen A.G.J., Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. *J Agric Food Chem*, **2000**, *48*, 1985-1990.
- [153] Kealley C.S., Rout M.K., Dezfouli M.R., Strounina E., Whittaker A.K. et al., Structure and molecular mobility of soy glycinin in the solid state. *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 2937-2947.
- [154] Badley R.A., Atkinson D., Hauser H., Oldani D., Green J.P. et al., The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin. *Biochim Biophys Acta*, **1975**, *412*, 214-228.
- [155] Adachi M., Kanamori J., Masuda T., Yagasaki K., Kitamura K. et al., Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homo-hexamers. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2003**, *100*,
- [156] Somero G.M., Proteins and temperature. *Annu Rev Physiol*, **1995**, *57*, 43-68.
- [157] Foegeding E.A. and Davis J.P., Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloid*, **2011**, *25*, 1853-1864.
- [158] Mathew J., Aravindakumar C.T. and Aravind U.K., Effect of ionic strength and protein concentration on the transport of proteins through chitosan/polystyrene sulfonate multilayer membrane. *J Membrane Sci*, **2008**, *325*, 625-632.
- [159] Boulet M., Britten M. and Lamarche F., Aggregation of some food proteins in aqueous dispersions: effects of concentration, pH and ionic strength. *Food Hydrocolloid*, **2000**, *14*, 135-144.
- [160] Kunugi S. and Tanaka N., Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochim Biophys Acta*, **2002**, *1595*, 329-344.
- [161] Venir E., Marchesini G., Biasutti M. and Innocente N., Dynamic high pressure-induced gelation in milk protein model systems. *J Dairy Sci*, **2010**, *93*, 483-494.
- [162] Dissanayake M. and Vasiljevic T., Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *J Dairy Sci*, **2009**, *92*, 1387-1397.
- [163] Ibanoglu E. and Ercelebi E.A., Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums. *Food Chem*, **2007**, *101*, 626-633.
- [164] Ju Z.Y., Hettiarachchy N.S. and Rath N., Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *J Food Sci*, **2001**, *66*, 229-232.
- [165] Liu Y., Zhao G., Ren J., Zhao M. and Yang B., Effect of denaturation during extraction on the conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Innov Food Sci Emerg Tech*, **2011**, *12*, 375-380.
- [166] Choi K.O., Ryu J., Kwak H.S. and Ko S., Spray-dried conjugated linoleic acid encapsulated with Maillard reaction products of whey proteins and maltodextrin. *Food Sci Biotechnol*, **2010**, *19*, 957-965.
- [167] Drusch S., Berg S., Scampicchio M., Serfert Y., Somoza V. et al., Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. *Food Hydrocolloid*, **2009**, *23*, 942-948.

- [168] Augustin M.A., Sanguansri L. and Bode O., Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *J Food Sci*, **2006**, *71*, 25-32.
- [169] Rusli J.K., Sanguansri L. and Augustin M.A., Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein-glucose syrup mixtures. *JAACS*, **2006**, *83*, 965-971.
- [170] Sant'Anna V., Malheiros P.S. and Brandelli A., Liposome encapsulation protects bacteriocin-like substance P34 against inhibition by Maillard reaction products. *Food Res Int*, **2011**, *44*, 326-330.
- [171] Oliver C., Melton L. and Stanley R., Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2006**, *46*, 337-350.
- [172] O'Regan J. and Mulvihill D.M., Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. *Food Res Int*, **2010**, *43*, 224-231.
- [173] Lesmes U. and McClements D.J., Controlling lipid digestibility: Response of lipid droplets coated by β -lactoglobulin-dextran Maillard conjugates to simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloid*, **2012**, *26*, 221-230.
- [174] Dulnap C.A. and Côte G.L., β -Lactoglobulin-dextran conjugates: effect of polysaccharide size on emulsion stability. *J Agric Food Chem*, **2005**, *53*, 419-423.
- [175] Zhao J., Tian Z. and Chen L., Effects of deamidation on aggregation and emulsifying properties of barley glutelin. *Food Chem*, **2011**, *128*, 1029-1036.
- [176] Liu Y., Li X., Zhou X., Yu J., Wang F. et al., Effects of glutaminase deamidation on the structure and solubility of rice glutelin. *Food Sci Technol*, **2011**, *44*, 2205-2210.
- [177] Suppavorasatit I., Mejia E.G. and Cadwallader K.R., Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein. *J Agric Food Chem*, **2011**, *59*, 11621-11628.
- [178] Lakkis J. and Villota R., Comparative performance of chemically and enzymatically modified whey proteins. *Food Chem*, **1992**, *43*, 93-105.
- [179] Wright T.H., Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins. *Crit Rev Biochem Mol*, **1991**, *26*, 1-52.
- [180] Cott E.M., Muszbek L. and Laposata M., Fatty acid acylation of platelet proteins. *PLEFA*, **1997**, *57*, 33-37.
- [181] Rondel C., Alric I., Mouloungui Z., Blanco J.-F. and Silvestre F., Synthesis and properties of lipoamino acid-fatty acid mixtures: influence of the amphiphilic structure. *J Surfact Deterg*, **2009**, *12*, 269-275.
- [182] Mikhalkin A.P., The synthesis, properties, and applications of *N*-acyl- α -aminoacids. *Russian Chem Rev*, **1995**, *64*, 259-275.
- [183] Mhaskar S.Y., Prasad R.B.N. and Lakshminarayana G., Synthesis of *N*-acyl amino acids and correlation of structure with surfactant properties of their sodium salts. *JAACS*, **1990**, *67*, 1015-1019.
- [184] Wong P.Y.Y., Nakamura S. and Kitts D.D., Functional and biological activities of casein glycomacropeptide as influenced by lipophilization with medium and long chain fatty acid. *Food Chem*, **2006**, *97*, 310-317.
- [185] Vastag Z., Popovic L., Popovic S., Krimer V. and Pericin D., Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food Bioprod Process*, **2010**, *88*, 277-282.
- [186] Chabanon G., Chevalot I., Framboisier X., Chenu S. and Marc I., Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochem*, **2007**, *42*, 1419-1428.
- [187] Yust M.M., Pedroche J., Millan-Linares M.C., Alcaide-Hidalgo J.M. and Millan F., Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chem*, **2010**, *122*, 1212-1217.

- [188] Pericin D., Radulovic-Popovic L., Vastag Z., Madarev-Popovic S. and Trivic S., Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chem*, **2009**, *115*, 753-757.
- [189] Nouri L., Legrand J., Popineau Y. and Belleville P., Enzymatic hydrolysis of wheat proteins Part I. Enzymatic kinetics and study of limited hydrolysis in a batch stirred reactor. *Chem Engineer J*, **1997**, *65*, 187-194.
- [190] Nouri L., Legrand J., Popineau Y. and Belleville P., Enzymatic hydrolysis of wheat proteins Part 2. comparison of performance of batch-stirred and torus reactors. *Chem Engineer J*, **1997**, *65*, 195-199.
- [191] Malabat C., Sanchez-Vioque R., Rabiller C. and Gueguen J., Emulsifying and foaming properties of native and chemically modified peptides from the 2S and 12S proteins of rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Americ Oil Chem Soc*, **2001**, *78*, 235-241.
- [192] Ortiz S.E.M. and Wagner J.R., Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Res Int*, **2002**, *35*, 511-518.
- [193] Lamsal B.P., Jung S. and Johnson L.A., Rheological properties of soy protein hydrolysate obtained from limited enzymatic hydrolysis. *Food Sci Technol*, **2007**, *40*, 1215-1223.
- [194] Achouri A., Zhang W. and Shiyong X., Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succination on the functional properties of resulting hydrolysates. *Food Res Int*, **1998**, *31*, 617-623.
- [195] Kong X.Z., Guo M.M., Hua Y.F., Cao D. and Zhang C.M., Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technol*, **2008**, *99*, 8873-8879.
- [196] Martinez K.D., Baezaa R.I., Millan F. and Pilosof A.M.R., Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloid*, **2005**, *19*, 361-369.
- [197] Gerrard J.A. and Brown P.K., Protein cross-linking in food: mechanisms, consequences, applications. *Int Congress Series*, **2002**, *1245*, 211-215.
- [198] Guo J., Zhang Y. and Yang X.Q., A novel enzyme cross-linked gelation method for preparing food globular protein-based transparent hydrogel. *Food Hydrocolloid*, **2012**, *26*, 277-285.
- [199] Ali N.A., Ahmed S.H., Mohamed E.S.A., Ahmed I.A.M. and Babiker E.E., Effect of transglutaminase cross linking on the functional properties as a function of NaCl concentration of legumes protein isolate. *Engineer Technol*, **2010**, *61*, 1024-1029.
- [200] Ali N.A., Ahmed S.H., Mohamed E.S.A., Ahmed I.A.M. and Babiker E.E., Changes in functional properties by transglutaminase cross linking as a function of pH of legumes protein isolate. *Innov Romanian Food Biotechnol*, **2010**, *7*, 12-20.
- [201] Gan C.Y., Latiff A.A., Cheng L.H. and Easa A.M., Gelling of microbial transglutaminase cross-linked soy protein in the presence of ribose and sucrose. *Food Res Int*, **2009**, *42*, 1373-1380.
- [202] Gujral H.S. and Rosell C.M., Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *Journ of Cereal Sci*, **2004**, *39*, 225-230.
- [203] Kiick-Fischer K.L. and Tirrell D.A., Controlling absorbency in gelatin networks: preparation and characterization of alkylated, crosslinked gelatin. *Journ Appl Polym Sci*, **1998**, *68*, 281-292.
- [204] Ramirez-Suarez J.C. and Xiong Y.L., Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures. *Meat Sci*, **2003**, *65*, 899-907.
- [205] Sun X.D. and Arntfield S.D., Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. *Food Hydrocolloid*, **2011**, *25*, 25-31.
- [206] Tang C.H., Chen Z., Li L. and Yang X.Q., Effects of transglutaminase treatment on the thermal properties of soy protein isolates. *Food Res Int*, **2006**, *39*, 704-711.
- [207] Tang C.H., Sun X., Yin S.W. and Ma C.Y., Transglutaminase-induced cross-linking of vicilin-rich kidney protein isolate: Influence on the functional properties and in vitro digestibility. *Food Res Int*, **2008**, *41*, 941-947.

- [208] Walsh D.J., Cleary D., McCarthy E., Murphy S. and FitzGerald R.J., Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. *Food Res Int*, **2003**, *36*, 677-683.
- [209] Wang J.S., Zhao M.M., Yang X.Q., Jiang Y.M. and Chun C., Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. *Food Hydrocolloid*, **2007**, *21*, 174-179.
- [210] Zohuriaan-Mehr M.J., Pourjavadi A., Salimi H. and Kurdtabar M., Protein- and homo poly(amino acid)-based hydrogels with super-swelling properties. *Polym Adv Technol*, **2009**, *20*, 655-671.
- [211] Shand P.J., Ya H., Pietrasik Z. and Wanasundara P.K.J.P.D., Transglutaminase treatment of pea proteins: Effect on physicochemical and rheological properties of heat-induced protein gels. *Food Chem*, **2008**, *107*, 692-699.
- [212] Sun X.D. and Arntfield S.D., Gelation properties of myofibrillar/pea protein mixtures induced by transglutaminase crosslinking. *Food Hydrocolloid*, **2012**, *27*, 394-400.
- [213] Li J., Vasanthan T. and Bressler D.C., Cationization of field pea starch in salt-free aqueous suspension. *Carbohydr Polym*, **2011**, *83*, 1598-1603.
- [214] Thomas J.J., Rekhla M.R. and Sharma C.P., Dextran-glycidyltrimethylammonium chloride conjugate/DNA nanoplex: A potential non-viral and haemocompatible gene delivery system. *Int Journ Pharmac*, **2010**, *389*, 195-206.
- [215] Bendoraitiene J., Kavaliauskaite R., Klimaviciute R. and Zemaitaitis A., Peculiarities of starch cationization with glycidyltrimethylammonium chloride. *Starch*, **2006**, *58*, 623-631.
- [216] Channasanon S., Graisuwan W., Kiatkamjornwong S. and Hoven V.P., Alternating bioactivity of multilayer thin films assembled from charged derivatives of chitosan. *J Colloid Interf Sci*, **2007**, *316*, 331-343.
- [217] Xu Y., Du Y., Huang R. and Gao L., Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier. *Biomaterials*, **2003**, *24*, 5015-5022.
- [218] Prado H.J., Matulewicz M.C., Bonelli P.R. and Cukierman A.L., Studies on the cationization of agarose. *Carbohydr Res*, **2011**, 311-321.
- [219] Wang J., Guo J., Yue T., Yuan Y., Liu X. et al., Cationization of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in concentrated alkaline solutions as gene carriers. *Carbohydr Polym*, **2012**, *88*, 966-972.
- [220] Wang Y. and Xie W., Synthesis of cationic starch with a high degree of substitution in an ionic liquid. *Carbohydr Polym*, **2010**, *80*, 1172-1177.
- [221] Kavaliauskaite R., **2007**, Interaction of starch with glycidyltrimethylammonium chloride and properties of derived products. In *Technological Sciences*, Kaunas University of Technology.
- [222] Sarkar J. and Ramesh M., **2002**, Modification of soy flour proteins for producing coagulants in papermaking and waste water treatment application. Patent N° WO02056095.
- [223] Pereira H.V.R., Saraiva K.P., Carvalho L.M.J., Andrade L.R., Pedrosa C. et al., Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Res Int*, **2009**, *42*, 115-121.
- [224] Pierucci A.P.T.R., Andrade L.R., Farina M., Pedrosa C. and Rocha-Leao M.H.M., Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *J Microencapsul*, **2007**, *24*, 201-213.
- [225] Wang R., Tian Z. and Chen L., Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *Int J Pharm*, **2011**, *406*, 153-162.
- [226] Yu C., Wang W., Yao H. and Liu H., Preparation of phospholipid microcapsules by spray drying. *Dry Technol*, **2007**, *25*, 695-702.
- [227] Duce V., Richard J., Saulnier P., Popineau Y. and Boury F., Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloid Surface*, **2004**, *232*, 239-247.

- [228] Mauguet M.C., Legrand J., Brujes L., Carnelle G., Larre C. et al., Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. *J Microencapsul*, **2002**, *19*, 377-384.
- [229] Mendanha D.V., Ortiz S.E.M., Favaro-Trindade C.S., Mauri A., Monterrey-Quintero E.S. et al., Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Res Int*, **2009**, *42*, 1099-1104.
- [230] Nori M.P., Favaro-Trindade C.S., Alencar S.M., Thomazini M. and Balieiro J.C.C., Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *Food Sci Technol*, **2010**, *44*, 429-435.
- [231] Parris N., Cooke P.H. and Hicks K.B., Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *J Agric Food Chem*, **2005**, *53*, 4788-4792.
- [232] Patel A.R., Heussen P.C.M., Hazekamp J., Dorst E. and Velikov K.P., Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chem*, **2012**, *133*, 423-429.
- [233] Ruiz-Henestrosa V.P., Sanchez C.C., Escobar M.M.Y., Jimenez J.J.P., Rodriguez F.M. et al., Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloid Surface*, **2007**, *309*, 202-215.
- [234] Gu X., Campbell L.J. and Euston S.R., Effects of different oils on the properties of soy protein isolate emulsions and gels. *Food Res Int*, **2009**, *42*, 925-932.
- [235] Pastor-Cavada E., Juan R., Pastor J.E., Alaiz M. and Vioque J., Protein isolates from two Mediterranean legumes: *Lathyrus clymenum* and *Lathyrus annuus*. Chemical composition, functional properties and protein characterisation. *Food Chem*, **2010**, *122*, 533-538.
- [236] Rui X., Boye J.I., Ribereau S., Simpson B.K. and Prasher S.O., Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. *Food Res Int*, **2011**, *44*, 2497-2504.
- [237] Jun-xia X., Hai-yan Y. and Jian Y., Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem*, **2011**, *125*, 1267-1272.
- [238] Rampon V., Riaublanc A., Anton M., Genot C. and McClements D.J., Evidence that homogenization of BSA-stabilized hexadecane-in-water emulsion induces structure modification of the nonadsorbed protein. *J Agric Food Chem*, **2003**, *51*, 5900-5905.
- [239] Magdassi S., Surface activity of proteins chemical and physico-chemical modifications, **1996**, Marcel Dekker, New York.
- [240] Wagner J.R. and Gueguen J., Effects of dissociation, deamidation, and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. *J Agric Food Chem*, **1995**, *43*, 1993-2000.
- [241] Koyoro H. and Powers J.R., Functional properties of pea globulin fractions. *Cereal Chem*, **1987**, *64*, 97-101.
- [242] Akintayo E.T., Oshodi A.A. and Esuoso K.O., Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chem*, **1999**, *66*, 51-56.
- [243] Raymundo A., Gouveia L., Batista A.P., Empis J. and Sousa I., Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Res Int*, **2005**, *38*, 961-965.
- [244] Klassen D.R. and Nickerson M.T., Effect of pH on the formation of electrostatic complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum Arabic polysaccharides. *Food Res Int*, **2012**, *46*, 167-176.
- [245] Ezpeleta I., Irache J.M., Gueguen J. and Orecchioni A.M., Properties of glutaraldehyde cross-linked vicilin nano- and microparticles. *J Microencapsul*, **1997**, *14*, 557-565.
- [246] Duce V., Richard J., Popineau Y. and Boury F., Adsorption kinetics and rheological interfacial properties of plant proteins at the oil-water interface. *Biomacromolecules*, **2004**, *5*, 2088-2093.
- [247] McClements D.J., Food emulsions: Principles, practice and techniques, **1999**, Boca Raton, FL: CRC Press.

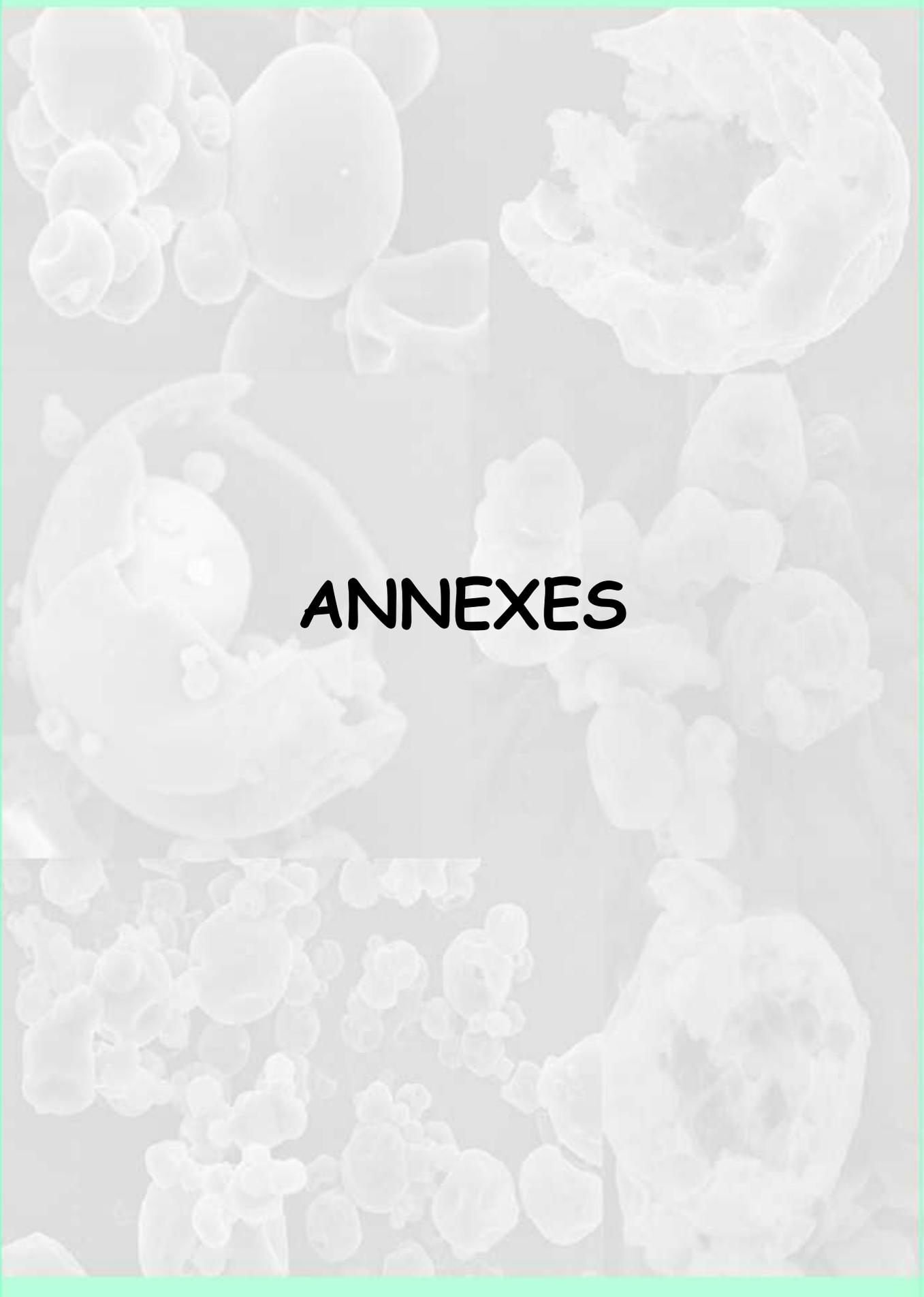
- [248] Bietz J.A. and Rothfus J.A., Comparison of peptides from wheat gliadin and glutenin. *Cereal Chem*, **1970**, *47*, 381-392.
- [249] Day L., Augustin M.A., Batey I.L. and Wrigley C.W., Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends Food Sci Tech*, **2006**, *17*, 82-90.
- [250] Ducel V., Richard J., Popineau Y. and Boury F., Rheological interfacial properties of plant protein-arabic gum coacervates at the oil-water interface. *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 790-796.
- [251] Iwami K., Hattori M., Nakatani S. and Ibuki F., Spray-dried gliadin powders inclusive of linoleic acid (microcapsules): their preservability, digestibility and application to bread making. *Agric Biol Chem*, **1987**, *51*, 3301-3307.
- [252] Sun S., Song Y. and Zheng Q., Rheological behavior of heat-induced wheat gliadin gel. *Food Hydrocolloid*, **2009**, *23*, 1054-1056.
- [253] Zhong Q., Jin M., Davidson P.M. and Zivanovic S., Sustained release of lysozyme from zein microcapsules produced by a supercritical anti-solvent process. *Food Chem*, **2009**, *115*, 697-700.
- [254] Beck M., Tomka I. and Waysek E., Physico-chemical characterization of zein as a film polymer. A direct comparison with ethyl cellulose. *Int J Pharm*, **1996**, *141*, 137-150.
- [255] Hamada J.S., Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *J Food Sci*, **2000**, *65*, 305-310.
- [256] Bienvenido O.J., Le riz dans la nutrition humaine, **1994**, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.
- [257] Kaewka K., Therakulkait C. and Cadwallader K.R., Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. *J Cereal Sci*, **2009**, *50*, 56-60.
- [258] Pinciroli M., Vidal A.A., Anon M.C. and Martinez E.N., Comparison between protein functional properties of two rice cultivars. *Food Sci Technol*, **2009**, *42*, 1605-1610.
- [259] Hata S., Wiboonsirikul J., Maeda A., Kimura Y. and Adachi S., Extraction of defatted rice bran by subcritical water treatment. *Biochem Eng J*, **2008**, *40*, 44-53.
- [260] Sereewatthanawut I., Prapintip S., Watchirarujj, K., Goto M., Sasaki M. et al., Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource Technol*, **2008**, *99*, 555-561.
- [261] Cao X., Wen H., Li C. and Gu Z., Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. *J Cereal Sci*, **2009**, *50*, 184-189.
- [262] Chandi G.K. and Sogi D.S., Functional properties of rice bran protein concentrates. *J Food Eng*, **2007**, *79*, 592-597.
- [263] Wang M., Hettiarachchy N.S., Qi M., Burks W. and Siebenmorgen T., Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J Agric Food Chem*, **1999**, *47*, 411-416.
- [264] Fabian C.B., Huynh L.H. and Ju Y.H., Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate. *Food Sci Technol*, **2010**, *43*, 375-379.
- [265] Chronakis I.S., Fredholm A., Öste Triantafyllou A. and Öste R., Complex formation in aqueous medium of partially hydrolysed oat cereal proteins with sodium stearyl-2 lactylate (SSL) lipid surfactant and implications for bile acids activity. *Colloid Surface*, **2004**, *35*, 175-184.
- [266] Yao X. G. H., Chen Z., Shan L. and Zhang M., Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chem*, **2007**, *10*, 163-170.
- [267] Mohamed A., Biresaw G., Xu J., Hojilla-Evangelista M. and Rayas-Duarte P., Oats protein isolate: Thermal, rheological, surface and functional properties. *Food Res Int*, **2009**, *42*, 107-114.
- [268] Orliac O., **2002**, Valorisation des protéines de tournesol: Etude de leur comportement thermique, rhéologique et de leur réactivité chimique - application à la fabrication de nouveaux matériaux biodégradables. In *Thèse de Doctorat*, INP de Toulouse.

- [269] Dalgalarondo M., Raymond J. and Azanza J.L., Sunflower seed protein: size and charge heterogeneity in subunits of the globulin fraction. *Biochim*, **1985**, *67*, 629-632.
- [270] Molina M.I., Petruccelli S. and Anon M.S., Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (*Helianthus annuus*). *J Agric Food Chem*, **2004**, *52*, 6023-6029.
- [271] Patino J.M.R., Conde J.M., Linaresa H.M., Jimenez J.J.P., Sanchez C.C et al., Interfacial and foaming properties of enzyme-induced hydrolysis of sunflower protein isolate. *Food Hydrocolloid*, **2007**, *21*, 782-793.
- [272] Pickardt C., Neidhart S., Griesbach C., Dube M., Knauf U. et al., Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annus L.*) meal. *Food Hydrocolloid*, **2009**, *23*, 1966-1973.
- [273] Salgado P.R., Drago S.R., Ortiz S.E.M., Petruccelli S., Andrich O. et al., Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus L.*) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *Food Sci Technol*, **2012**, *45*, 65-72.
- [274] Caillard R., Remondetto G.E. and Subirade M., Physicochemical properties and microstructure of soy protein hydrogels co-induced by Maillard type cross-linking and salts. *Food Res Int*, **2009**, *42*, 98-106.
- [275] Hua Y., Cui S.W., Wang Q., Mine Y. and Poysa V., Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Res Int*, **2005**, *38*, 377-385.
- [276] Nunes M.C., Batista P., Raymundo A., Alves M.M. and Sousa I., Vegetable proteins and milk puddings. *Colloid Surface*, **2003**, *31*, 21-29.
- [277] The American Soybean Association, www.soygrowers.com.
- [278] Masudaa T. and Goldsmith P.D., World soybean production: area harvested, yield, and long-term projections. *Int Food Agribusiness Manag Rev*, **2009**, *12*, 143-162.
- [279] Composition of soy, World Initiative for Soy in Human Health, www.wishh.org.
- [280] Kumar V., Rani A., Solanki S. and Hussain S.M., Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. *J Food Compos Analys*, **2006**, *19*, 188-195.
- [281] Stevenson D.G., Jane J.L. and Inglett G.E., Structures and physicochemical properties of starch from immature seeds of soybean varieties (*Glycine max* (L.) Merr.) exhibiting normal, low-linolenic or low-saturated fatty acid oil profiles at maturity. *Carbohydr Polym*, **2007**, *70*, 149-159.
- [282] Kapshuk S., Ukraine: export potential of sunseeds and sunflower oil. *International Conference of Oilseeds & Oils*, **October 2010**, Istanbul, Turkey.
- [283] Marechal V. and Rigal L., Characterization of by-products of sunflower culture – commercial applications for stalks and heads. *Ind Crop Prod*, **1999**, *10*, 185-200.
- [284] Kuhn D.D., Lawrence A.L., Boardman G.D., Patnaik S., Marsh L. et al., Evaluation of two types of bioflocs derived from biological treatment of fish effluent as feed ingredients for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **2010**, *303*, 28-33.
- [285] Mondor M., Iprersiel D., Lamarche F. and Boye J.I., Production of soy protein concentrates using a combination of electroacidification and ultrafiltration. *J Agric Food Chem*, **2004**, *52*, 6991-6996.
- [286] Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L., *Biochemistry*, **2002**, Freeman, New York, US.
- [287] Nieuwenhuis R. and Nieuwelink J., *Soya and other leguminous crops*, **2002**, Agromisa Foundation, Wageningen, Netherlands.
- [288] George A.A. and Lumen B.O., Determination of amino acid composition of soybeans (*Glycine max*) by near-infrared spectroscopy. *J Agric Food Chem*, **1991**, *39*, 224-227.
- [289] Zamora A., **2005**, Proteins, amino acids, peptides, and polypeptides. www.scientificpsychic.com
- [290] Schingoethe D.J. and Ahrar M., Protein solubility, amino acid composition, and biological value of regular and heat-treated soybean and sunflower meals. *J Dairy Sci*, **1979**, *62*, 925-931.

- [291] Conde J.M., Escobar M.M., Pedroche J.J.J., Rodriguez F.M. and Rodriguez P.J.M., Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *J Agric Food Chem*, **2005**, *53*, 8038-8045.
- [292] Ali M.A.M., Tinay A.H.E., Mohamed I.A. and Babiker E.E., Supplementation and cooking of pearl millet: changes in protein fractions and sensory quality. *Word J Dairy&Food Sci*, **2009**, *4*, 41-45.
- [293] Puppo M.C., Beaumal V., Chapleau N., Speroni F., Lamballerie M. et al., Physicochemical and rheological properties of soybean protein emulsions processed with a combined temperature/high pressure treatment. *Food Hydrocolloid*, **2008**, *22*, 1079-1089.
- [294] Fennema O.R., Food chemistry (2nd ed.), **1993**, Marcel Dekker Inc.
- [295] Guo M. and Narsimhan G., Solubility of globular proteins in polysaccharide solutions. *Biotechnol Prog*, **1991**, *7*, 54.
- [296] Lee K.H., Ryu H.S. and Rhee K.C., Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. *JAOCS*, **2003**, *80*, 85-90.
- [297] Kabirullah M. and Wills R.B.H., Characterization of sunflower protein. *J Agric Food Chem*, **1983**, *31*, 953-956.
- [298] Giddings J.C., A new separation concept based on coupling of concentration and flow nonuniformities. *Separ Sci*, **1966**, *1*, 123-125.
- [299] Yohannes G., Jussila M., Hartonen K. and Riekkola M.L., Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *J Chromatogr*, **2011**, *1218*, 4104-4116.
- [300] Rosenberg M., Kopelman I.J. and Talmon Y., Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *J Agric Food Chem*, **1990**, *38*, 1288.
- [301] Liu X.D., Atarashi T., Furuta T., Yoshii H., Aishima S. et al., Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavors by spray-drying. *Dry Technol*, **2001**, *19*, 1361.
- [302] Augusto P.E.D., Ibarz A. and Cristianini M., Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of a fruit juice serum model. *J Food Eng*, **2012**, *111*, 474-477.
- [303] Flourey J., Desrumaux A., Axelos M.A.V. and Legrand J., Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation. *Food Hydrocolloid*, **2002**, *16*, 47-53.
- [304] Correding M. and Wicker L., Changes in the molecular weight distribution of three commercial pectins after valve homogenization. *Food Hydrocolloid*, **2001**, *15*, 17-23.
- [305] Puppo M.C., Speroni F., Chapleau N., Lamballerie M., Anton C. et al., Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloid*, **2005**, *19*, 289-296.
- [306] Puppo C., Chapleau N., Speroni F., Lamballerie-Anton M., Michel F. et al., Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates. *J Agric Food Chem*, **2004**, *52*, 1564-1571.
- [307] Wang T., Nie J. and Yang D., Dextran and gelatin based photocrosslinkable tissue adhesive. *Carbohydr Polym*, **2012**, *90*, 1428-1436.
- [308] Haag A.P., Maier R.M., Combie J. and Geesey G.G., Bacterially derived biopolymers as wood adhesives. *Int J Adhes Adhes*, **2004**, *24*, 495.
- [309] Duarte A.P., Coelho J.F., Bordado J.C., Cidade M.T. and Gil M.H., Surgical adhesives: Systematic review of the main types and development forecast. *Prog Polym Sci*, **2012**, *37*, 1031.
- [310] Sabliov C.M., Fronczek C., Astete C.E., Khachatryan M., Khachatryan L. et al., Effects of temperature and UV light on degradation of α -tocopherol in free and dissolved form. *J Am Oil Chem Soc*, **2009**, *86*, 895-902.
- [311] Chang P.S., Lee J. and Lee J., Development of a new colorimetric method determining the yield of microencapsulation of α -tocopherol. *J Agric Food Chem*, **2005**, *53*, 7385-7389.
- [312] Verleyen T., Verhe R., Huyghebaert A., Dewettinck K. and Greyt W., Identification of α -tocopherol oxidation products in triolein at elevated temperatures. *J Agric Food Chem*, **2001**, *49*, 1508-1511.

- [313] Luo Y., Zhang B., Whent M., Yu L. and Wang Q., Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its *in vitro* controlled release study. *Colloid Surface*, **2011**, *85*, 145-152.
- [314] Fuchs M., Turchiuli C., Bohin M., Cuvelier M.E., Ordonnaud C. et al., Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *J Food Eng*, **2006**, *75*, 27.
- [315] Guerrero P., Retegi A., Gabilondo N. and Caba K., Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *J Food Eng*, **2010**, *100*, 145-151.
- [316] Schmidt V., Giacomelli C. and Soldi V., Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. *Polym Degrad Stabil*, **2005**, *87*, 25-31.
- [317] Wang H., Jiang L. and Fu L., Properties of molded soy protein isolate plastics. *J Appl Polym Sci*, **2007**, *106*, 3716-3720.
- [318] Laine P., Toppinen E., Kivela R., Taavitsainen V.M., Knuutila O. et al., Emulsion preparation with modified oat bran: Optimization of the emulsification process for microencapsulation purposes. *J Food Eng*, **2011**, *104*, 538-547.
- [319] Flourey J., Desrumaux A., Axelos M.A.V. and Legrand J., Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *J Food Eng*, **2003**, *58*, 227-238.
- [320] Flourey J., Desrumaux A. and Lardieres J., Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov Food Sci Emerg Tech*, **2000**, *1*, 127-134.
- [321] Anton M., Chapeau N., Beaumal V., Delepine S. and Lamballerie-Anton M., Effect of high-pressure treatment on rheology of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. *Innov Food Sci Emerg Tech*, **2001**, *2*, 9-21.
- [322] Brochette P., Elaboration et étude des émulsions. *Techniques d'Ingénieur*, **1999**, *J 2 150*, 1-18.
- [323] Gonzalez-Perez S., Koningsveld G.A., Vereijken J.L., Merck K.B., Gruppen H. et al., Emulsion properties of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J Agric Food Chem*, **2005**, *53*, 2261-2267.
- [324] Jayasundera M., Adhikari B., Aldred P. and Ghandi A., Surface modification of spray dried food and emulsion powders with surface-active proteins: A review. *J Food Eng*, **2009**, *93*, 266-277.
- [325] Desai K.G.H. and Park H.J., Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *J Microencapsul*, **2005**, *22*, 179-192.
- [326] Jayasundera M., Adhikari B., Adhikari R. and Aldred P., The effect of protein types and low molecular weight surfactants on spray drying of sugar-rich foods. *Food Hydrocolloid*, **2011**, *25*, 459-469.
- [327] Sansone F., Mencherini T., Picerno P., Amore M., Aquino R.P. et al., Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *J Food Eng*, **2011**, *105*, 468-476.
- [328] Su Y.L., Fu Z.Y., Zhang J.Y., Wang W.M., Wang H. et al., Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. *Powder Tech*, **2008**, *184*, 114-121.
- [329] Xie Y., Wan A., Lu Q. and Hui M., The effects of rheological properties of wall materials on morphology and particle size distribution of microcapsule. *Czech J Food Sci*, **2010**, *28*, 433-439.
- [330] Robins M.M., Emulsions - creaming phenomena. *Cur Opin Colloid Interface Sci*, **2000**, *5*, 265-272.
- [331] Kawakatsu T., Tragardh G. and Tragardh C., The formation of oil droplets in a pectin solution and the viscosity of the oil-in-pectin solution emulsion. *J Food Eng*, **2001**, *50*, 247-254.
- [332] Zorba O., The effects of the amount of emulsified oil on the emulsion stability and viscosity of myofibrillar proteins. *Food Hydrocolloid*, **2006**, *20*, 698-702.
- [333] Reiffers-Magnani C.K., Cuq J.L. and Watzke H.J., Composite structure formation in whey protein stabilized O/W emulsions. 1. Influence of the dispersed phase on viscoelastic properties. *Food Hydrocolloid*, **1999**, *13*, 303-316.
- [334] Ré M.I., Microencapsulation by spray-drying. *Dry Technol*, **1998**, *16*, 1195-1236.

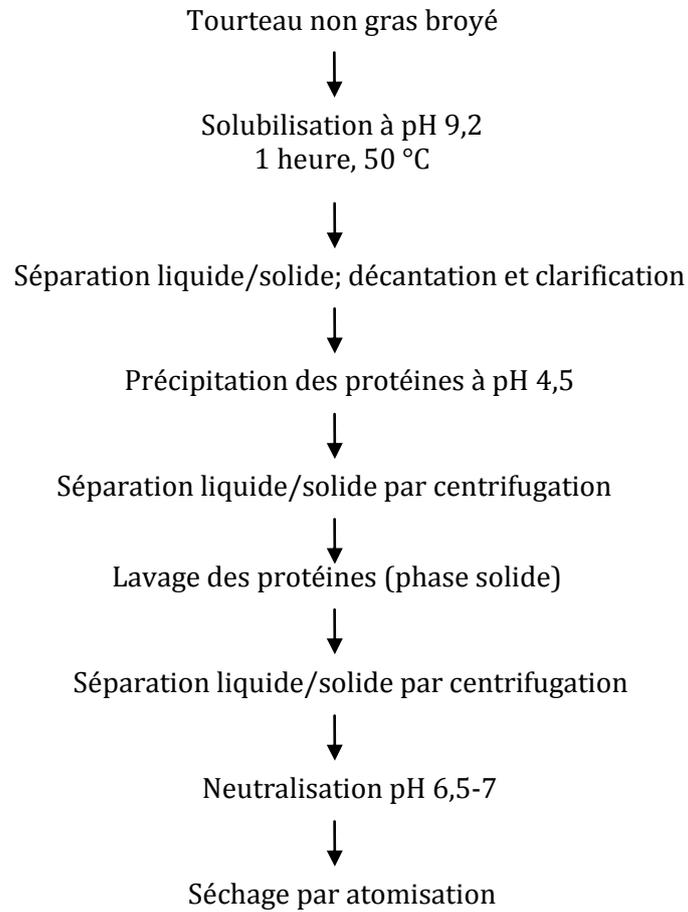
- [335] Zeng W., Martinuzzi F. and MacGregor A., Development and application of novel UV method for the analysis of ascorbic acid. *J Pharm Biomed*, **2005**, *36*, 1107-1111.
- [336] Wanasundara P.K.J.P.D. and Shahidi F., Antioxidants: science, technology, and applications, **2005**, John Wiley & Sons, New York, US.
- [337] Uddin M.S., Hawlader M.N.A. and Zhu H.J., Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. *J Microencapsul*, **2001**, *18*, 199-209.
- [338] Moreira G.E.G., Azeredo H.M.C., Medeiros M.F.D., Brito E.S. and Souza A.C.R., Ascorbic acid and anthocyanin retention during spray drying of acerola pomace extract. *J Food Process Pres*, **2010**, *34*, 915-925.
- [339] Trindade M.A. and Grosso C.R.F., The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *J Microencapsul*, **2000**, *17*, 169-176.
- [340] Crompton T.R., Polymer reference book, **2006**, Rapra Technology Limited, Shawbury, UK.
- [341] Nordqvist P., Lawther M., Malmström E. and Khabbaz F., Adhesive properties of wheat gluten after enzymatic hydrolysis or heat treatment – A comparative study. *Ind Crop Prod*, **2012**, *38*, 139.
- [342] Schmitz, J.F., **2009**, Enzyme modified soy flour adhesives. In *PhD Thesis*, Iowa State University
- [343] Anastas P.T. and Zimmerman J.B., Peer reviewed: Design through the 12 principles of green engineering. *Environ Sci Technol*, **2003**, *37*, 94-101.
- [344] Derkatch S.R., Levachov S.M., Kuhkushkina A.N., Novosyolova N.V., Kharlov A.E. et al., Rheological properties of concentrated emulsions stabilized by globular protein in the presence of nonionic surfactant. *Colloid Surface*, **2007**, *298*, 225-234.
- [345] Renou F., **2008**, Transition liquide-solide de micelles polymères en solutions denses. In *Thèse de doctorat*, Université du Maine
- [346] Doll K.M. and Erhan S.Z., Evaluation of a sugar-based edible adhesive using a tensile strength tester. *J Lab Automn*, **2011**, *16*, 153.
- [347] Claire A.B., Franich R.A., Lomax T.D., McDonald A.G. and Meder A.R., Preparation, characterization, and performance of cross-linkable maltodextrin-based lignocellulosic adhesives. *J Adhes Sci Technol*, **2002**, *16*, 317.
- [348] Popello I.A., Suchkov V.V., Grinberg V.Y. and Tolstoguzov V.B., Effects of pH upon the liquid-liquid phase equilibria in solutions of legumins and vicilins from broad beans and peas. *Food Hydrocolloid*, **1992**, *6*, 147-152.
- [349] Helrich K., Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, **1990**, AOAC.
- [350] McGeehan S.L. and Naylor D.V., Automated instrumental analysis of carbon and nitrogen in plants and soil samples. *Communic Soil Sci Plant Analys*, **1988**, *19*, 493-505.



ANNEXES

Annexe I. Méthode d'extraction des protéines de tournesol à partir de tourteau

La production d'extrait protéique de tournesol se déroule suivant plusieurs étapes :

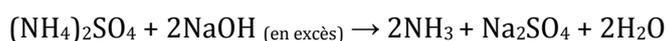


Annexe II. Dosage des protéines par la méthode Kjeldahl

L'analyse par la méthode Kjeldahl permet de déterminer la teneur en protéines d'un échantillon par le dosage de l'azote contenu dans celui-ci. L'analyse s'effectue en plusieurs étapes. Dans un premier temps, la minéralisation des protéines (0,01-0,1 g de matière sèche selon la teneur en protéine) est effectuée pour transformer l'azote organique des protéines en azote minéral. Cette réaction s'effectue à l'aide d'un appareil Tecator Digestor 2020 (Foss, Suède), à 400 °C pendant 90 minutes, en présence de 12,5 mL d'acide sulfurique concentré à 95 % et d'un mélange de catalyseurs (K_2SO_4 et $CuSO_4$).



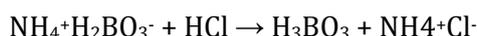
Ensuite, pour libérer l'ammoniac à partir du sel d'ammonium, 50 mL d'une solution de soude concentrée à 40 % w/w est ajoutée. En chauffant le minéralisat alcalinisé, l'ammoniac se dégage sous forme de vapeurs. Ces vapeurs sont ensuite captées, condensées et recueillies pour le dosage à l'aide d'un appareil Kjelttec 2200 (Foss, Suède).



L'ammoniac distillé est mis en contact avec 30 mL d'acide borique, qui le retient sans réagir, car c'est un acide faible.



Pour déterminer la teneur en azote total dans la matière organique, l'ammoniac est titré par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 N grâce au virage d'un mélange d'indicateurs colorés (rouge de méthyle et vert de bromocrésol) dans une solution d'acide borique à 4 %. Le volume d'acide chlorhydrique utilisé pour la titration est proportionnel à la quantité d'azote dans l'échantillon.



Par convention, la teneur en protéines de l'échantillon est obtenue en multipliant la teneur en azote total par un facteur de conversion empirique. Ce coefficient (6,25 pour les matières d'origine végétale) prend en compte la masse molaire moyenne des acides aminés composant les protéines à quantifier. La teneur en protéines est alors calculée par la relation suivante :

$$\text{Protéines, \%} = \frac{M_N \times C \times (V_1 - V_0)}{m} \times 6,25 \times 100$$

avec M_N – masse molaire de l'azote, 14,007 g/mol ;

C – concentration de la solution d'acide chlorhydrique, mol/L ;

V_0 – volume d'acide chlorhydrique utilisé pour la titration du blanc, mL ;

V_1 – volume d'acide chlorhydrique utilisé pour la titration de l'échantillon, mL ;

m – masse de l'échantillon, mg.

Annexe III. Dosage des fonctions amines par la méthode OPA

La méthode OPA (ortho-phthaldialdéhyde)^[1] est utilisée pour le dosage des groupes α et ϵ aminés dans les molécules à fonctions amines (acides aminés, peptides et protéines). Grâce à la réaction entre le groupement amine, le réactif OPA et le β -mercaptoéthanol, le composé isoindole est formé (Figure A-1). Cette molécule absorbe fortement à 340 nm, ce qui permet de quantifier les groupes amines libres de l'échantillon analysé, par spectrométrie UV.

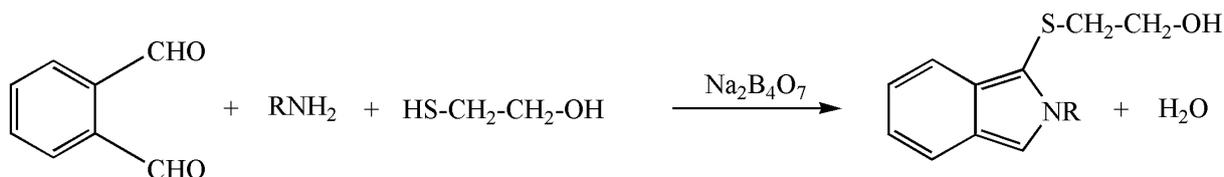


Figure A-1. Formation du composé isoindole lors du dosage par la méthode OPA.

Le réactif de la méthode OPA est préparé le jour de l'analyse. Dans une fiole de 50 mL, les composés suivants sont mélangés : 25 mL de tétraborate de sodium (0,1 M), 2,5 mL de solution de dodécyle sulfate de sodium (20 % w/w), 40 mg d'OPA dissous dans 1 mL de méthanol, 100 μ L de β -mercaptoéthanol, l'ensemble est complété à 50 mL par de l'eau déminéralisée. Le réactif est couvert par du papier aluminium pour le protéger de la lumière, pendant 2 heures avant l'analyse.

5-10 mg de l'échantillon à analyser sont dissous par ultrasons dans 10 mL d'un tampon de tétraborate de sodium 0,0125 M et de dodécyle sulfate de sodium à 2 % w/w (pH 9,4). Si la solubilité de l'extrait protéique est faible, la solution est agitée pendant 10 minutes dans un bain chauffé à 70 °C. Les solutions de L-leucine (0,1 mM à 1 mM), dans le même tampon, sont utilisées pour la réalisation de la droite de calibration. Cette droite est tracée pour chaque série d'analyses.

2 mL de réactif OPA et 1 mL de solution d'échantillon sont introduits dans un tube en verre, mélangés rapidement à l'aide d'un agitateur Vortex (Heidolph, Burladingen, Allemagne) et incubés pendant 2 min à température ambiante. Puis, la densité optique de ce mélange est mesurée à 340 nm à l'aide d'un Spectrometer UV (1800 SHIMADZU, Koyoto, Japan).

^[1] Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. and Catignani G.L., *J Dairy Sci*, **1983**, *66*, 1219-1227.
Goodno C.C., Swaisgood H.E. and Catignani G.L., **1981**, *115*, 203-211.

Annexe IV. Méthode de dosage de l' α -tocophérol

IV.1. Choix du solvant

Le solvant choisi pour l'analyse doit bien solubiliser les composés hydrophobes, notamment les tocophérols. Trois solvants ont été testés : le cyclohexane, le méthanol et le dichlorométhane. D'autre part, pour une bonne efficacité du dosage, la solubilité des extraits protéiques de soja et de tournesol dans le solvant donné doit être minimale. Pour vérifier cette solubilité, 0,1 g d'extrait protéique de soja ou de tournesol est mélangé avec 10 mL de chaque solvant dans un récipient en verre pendant 10 minutes. La solution protéique est ensuite filtrée à 0,2 μ m à l'aide d'un filtre en PTFE. La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 280 nm, qui correspond à l'absorbance maximale des protéines. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le [Tableau A-1](#).

Tableau A-1. Test de la solubilité des extraits protéiques dans les différents solvants.

Solvant	Absorbance à 280 nm	
	Protéines de soja	Protéines de tournesol
Cyclohexane	0,09	0,03
Méthanol	2,4	0,76
Dichlorométhane	0,2	0,09

Le solvant le plus sélectif pour solubiliser l' α -tocophérol sans dissoudre les extraits protéiques est le cyclohexane. Il est choisi pour analyser les microparticules.

IV.2. Droite d'étalonnage

A partir d'une solution-mère d' α -tocophérol dans le cyclohexane, une gamme de concentrations allant de 10 mg/mL à 110 mg/mL est préparée. La droite d'étalonnage tracée correspond à la concentration en fonction de l'absorbance à 298 nm ([Figure A-2](#)). L'absorbance à 298 nm représente le maximum sur le spectre d'absorbance entre 200 nm et 900 nm pour la molécule de l' α -tocophérol ([Figure A-3](#)).

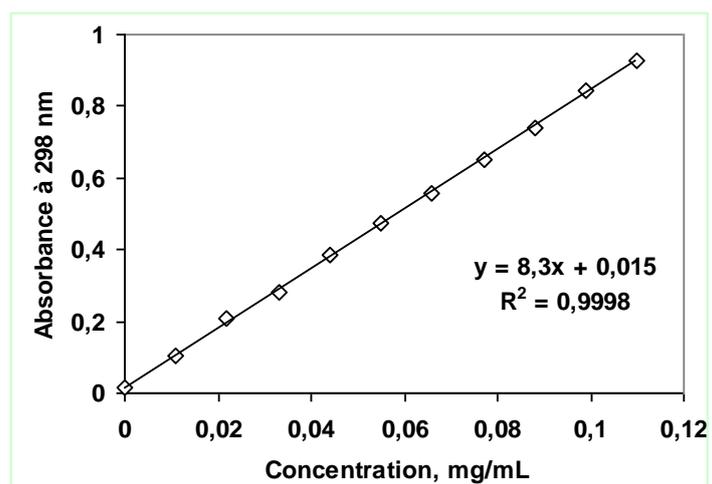


Figure A-2. Droite d'étalonnage de l' α -tocophérol dans le cyclohexane à 298 nm.

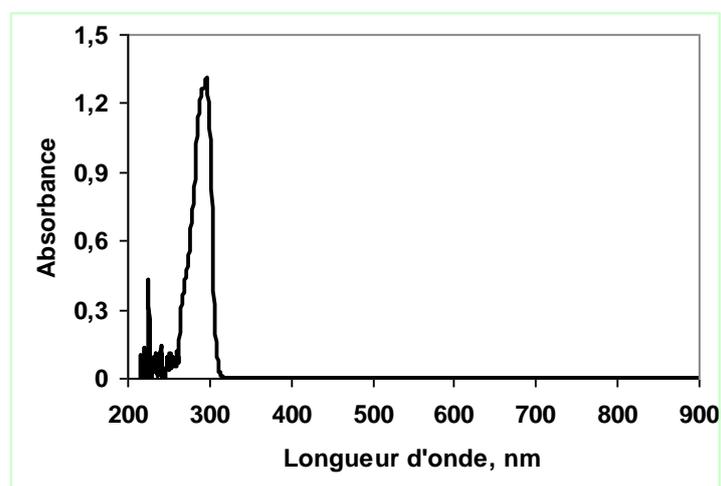


Figure A-3. Spectre d'absorbance de l' α -tocophérol dans le cyclohexane entre 200 nm et 900 nm.

Annexe V. Méthode de dosage de l'acide ascorbique

V.1. Principe du dosage

L'acide ascorbique est une substance hydrophile comme les protéines. Ainsi, il est difficile de trouver un solvant sélectif pour séparer ces deux composés et de doser le principe actif après microencapsulation. Il est donc nécessaire de trouver une technique qui permet de doser l'acide ascorbique en présence de protéines. Une méthode de dosage de l'acide ascorbique par titrage indirect faisant intervenir une réaction d'oxydoréduction avec le diiode a été choisie^[1] (Figure A-4a). Les chaînes protéiques peuvent aussi partiellement réagir avec la solution de diiode^[2] par les ponts disulfures (Figure A-4b) ou par les groupements sulfhydryles de la cystéine (Figure A-4c).

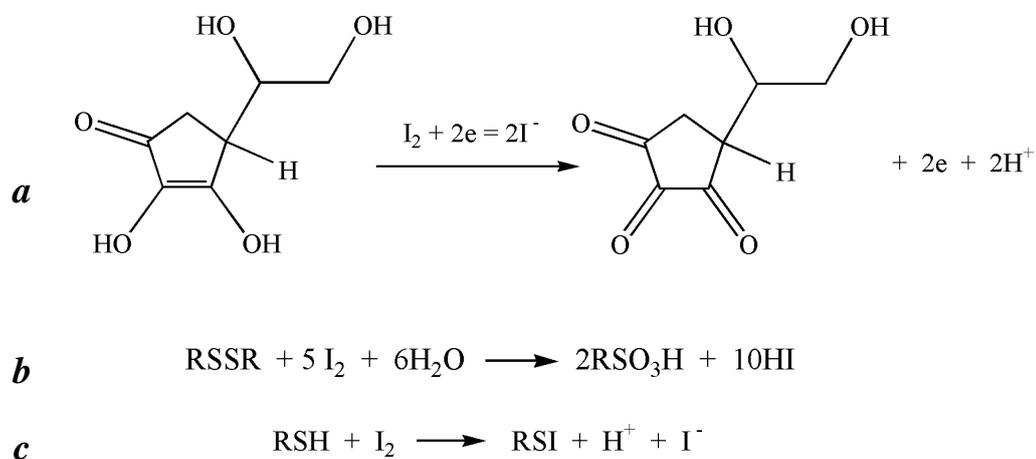


Figure A-4. Réaction d'oxydation de l'acide ascorbique (a) et de la protéine (b,c) par le diiode en excès.

Pour pouvoir analyser les microparticules obtenues par atomisation, il est donc nécessaire de tracer une droite d'étalonnage.

^[1] Food and nutrition board Institute of medicine national, academy of sciences. 14th Ed., Food Chemicals Codex. National Academy Press, Washington, USA, 1996, 33.

^[2] Ramachandran L.K., *Chem Rev*, 1956, 56, 199-218.

V.2. Droite d'étalonnage

Des mélanges avec différentes proportions protéique de soja/acide ascorbique ont été préparés (avec m_{aa} – la masse initiale d'acide ascorbique, m_{prot} – la masse initiale des protéines et $m_{éch}$ – la masse initiale du mélange). Le diiode est dissout dans l'eau en ajoutant l'iodure de potassium (pour assurer une meilleure solubilisation) afin d'obtenir une concentration finale en diiode de 5 mmol/L. La solution de diiode est préalablement étalonnée par la solution de thiosulfate de sodium à 5 mmol/L. Les quantités nécessaires des produits (extrait protéique et acide ascorbique) sont introduites dans un flacon ainsi que 5 ml de solution de diiode (m_{I_2}). Le diiode réagit à la fois avec l'acide ascorbique et les protéines (Figure A-4). Le diiode en excès, qui n'a pas réagi avec les protéines et l'acide ascorbique (m_{I_2} résiduel), est titré par la solution de thiosulfate de sodium. La quantité de diiode ayant réagi avec l'échantillon (m_{I_2} ayant réagi) est proportionnelle à la quantité d'acide ascorbique et de protéines dans le mélange. On peut composer deux équations :

$$m_{I_2 \text{ ayant réagi}} = a \times m_{aa} + b \times m_{prot}$$

$$m_{aa} + m_{prot} = m_{éch}$$

avec a, b – constantes que l'on cherche à déterminer.

Les deux équations obtenues nous permettent de trouver la relation suivante :

$$m_{I_2 \text{ ayant réagi}}/m_{éch} = (a-b) \times m_{aa}/m_{éch} + b$$

Chaque mélange extrait protéique/acide ascorbique est préparé en triplicata et la valeur moyenne de m_{I_2} ayant réagi est exploitée. A l'aide de cette dernière relation, on peut tracer la courbe de calibration (Figure A-5).

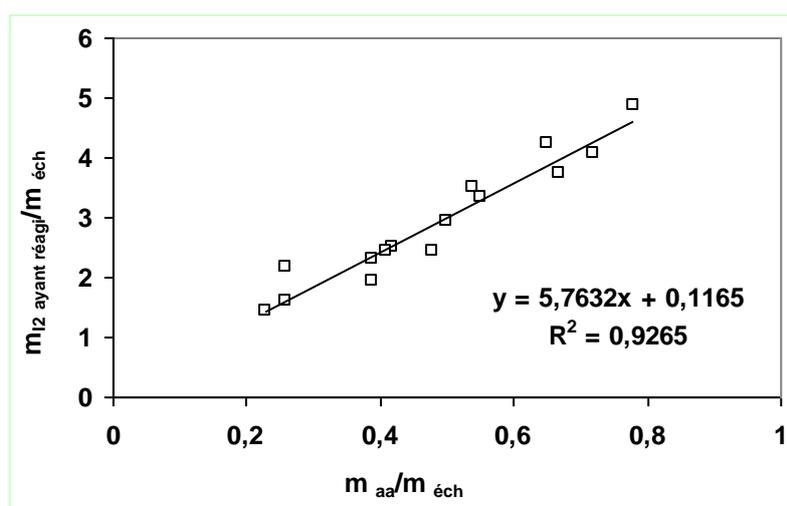


Figure A-5. Droite d'étalonnage permettant de doser l'acide ascorbique dans les microparticules par titration indirecte avec le diiode.

Cette courbe est utilisée pour la quantification d'acide ascorbique dans les échantillons de microparticules atomisées. En effet, dans ce cas la masse totale d'échantillon est connue ($m_{\text{éch}}$), et le dosage permet de déterminer $m_{\text{aa}}/m_{\text{éch}}$ qui correspond au taux d'encapsulation réel.

Annexe VI. Analyse AsFIFFF

VI.1. Principe de la technique

La cellule AsFIFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation) est constituée de deux blocs, entre lesquels sont placés une membrane et un spacer (Figure A-6). Le spacer représente une fine lamelle de forme trapézoïdale, qui en se plaçant entre les deux blocs, détermine le volume de la zone de fractionnement. La membrane d'ultrafiltration, posée sur le fritté, permet à une fraction d'éluent, ainsi qu'aux particules de taille inférieure à sa porosité de passer à travers, sous influence du flux croisé. La taille des pores de la membrane détermine la limite inférieure de quantification.

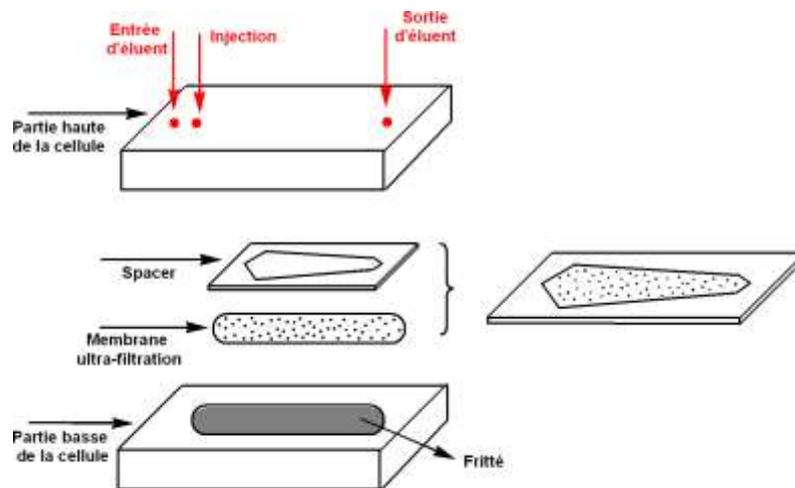


Figure A-6. Représentation schématique d'une cellule AsFIFFF.

Après la stabilisation du système, l'analyse commence par le "focus", quand l'éluent entre des deux côtés de la cellule et s'évacue à travers la membrane (Figure A-7a).

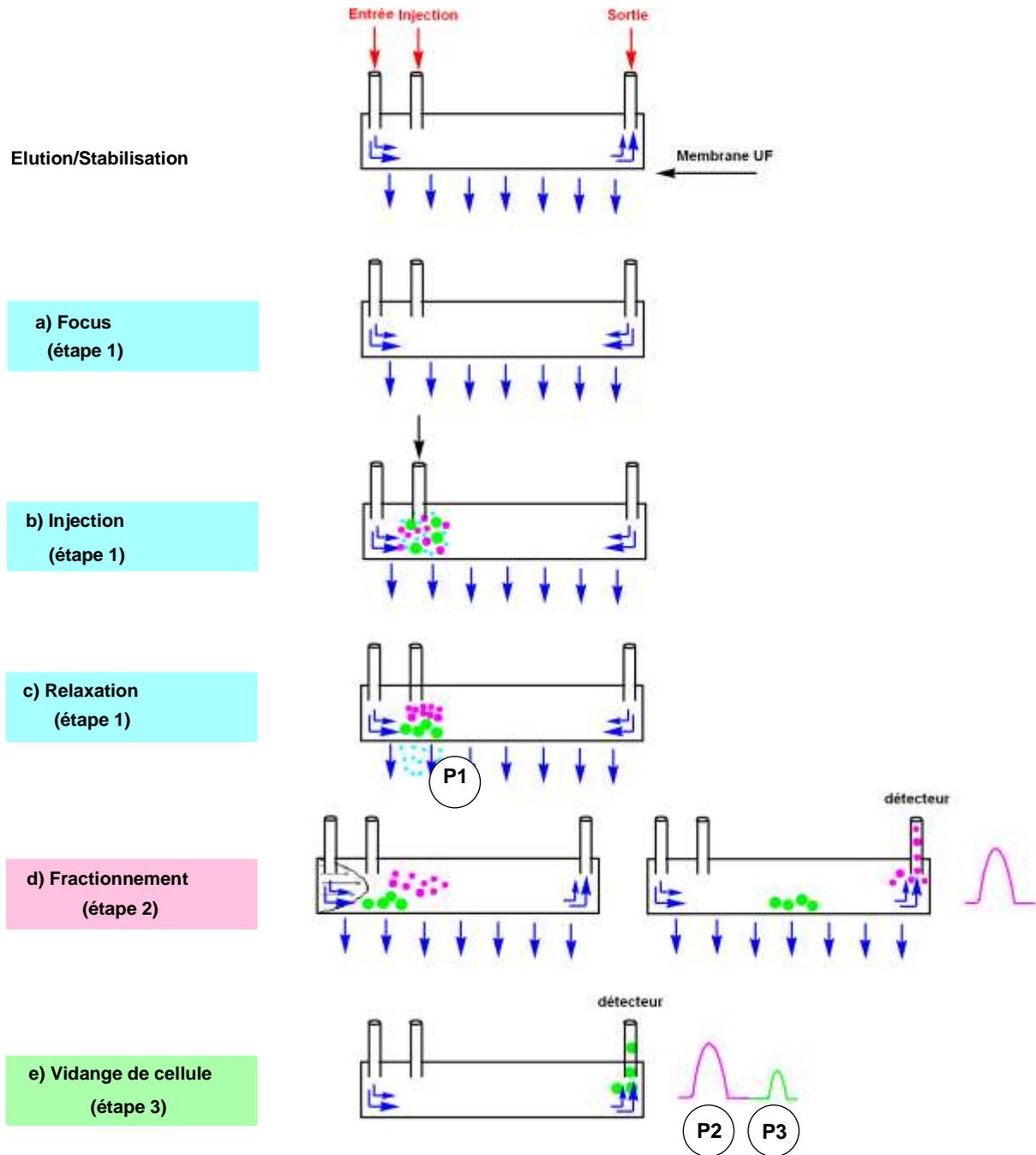


Figure A-7. Principe du fonctionnement d'une cellule AsFIFFF; les différentes étapes correspondent aux conditions d'analyse décrites dans le **Tableau IV - 1**.

Après injection (**Figure A-7b**), les particules de l'échantillon sont soumises à une séparation par application d'un champ de force perpendiculaire à la direction d'élution, appelé aussi flux croisé. Les particules se déplacent grâce au mouvement Brownien, qui dépend de leur coefficient de diffusion. Ce coefficient est inversement proportionnel au rayon hydrodynamique de la particule et peut être déterminé par la relation de Stokes-Enstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

avec D – coefficient de diffusion, m^2/s ;
 k – constante de Boltzmann, $1,38 \cdot 10^{-23} J/K$;
 T – température, K ;
 η – viscosité de l'éluant, $Pa \cdot s$;
 R_h – rayon hydrodynamique de la particule, m.

Grâce à l'effet de relaxation, les plus petites particules, ayant le coefficient de diffusion le plus élevé, sont plus éloignées de la membrane, alors que les plus grosses, ayant un coefficient de diffusion plus faible sont plus proches de la membrane (Figure A-7c). Les petites particules, ayant une taille inférieure au seuil de coupure (10 kDa) passent à travers la membrane et ne sont pas analysées.

Lors de la phase d'éluion, le régime est laminaire et le profil de vitesse parabolique. Le gradient de vitesse formé pendant l'éluion permet dans un premier temps la sortie des petites particules vers le détecteur, puis la sortie des plus grandes (Figure A-7d), car le temps de rétention est proportionnel au rayon hydrodynamique de la particule.

Le coefficient de diffusion, ainsi que le rayon hydrodynamique peuvent être déterminés en tenant compte des paramètres expérimentaux et du temps de la rétention :

$$D = \frac{t^0 \cdot V_{cr} \cdot w^2}{6 \cdot V^0} \cdot \frac{1}{t_r}$$

$$R_h = \frac{k \cdot T \cdot V^0}{\pi \cdot \eta \cdot V_{cr} \cdot w^2 \cdot t^0} \cdot t_r$$

avec t^0 – temps mort correspondant à la traversée du volume de la cellule, s ;
 V_{cr} – débit de flux croisé, m^2/s ;
 w – épaisseur de la cellule, m ;
 t_r – temps de rétention de particule, s ;
 V^0 – volume de la cellule, m^3 .

La grandeur de t^0 dépend des dimensions du spacer, de la position du point d'injection, ainsi que du débit de flux croisé :

$$t^0 = \frac{V^0}{V_{cr}} \times \ln\left(1 + A \frac{V_{cr}}{V_{lin}}\right)$$

avec A – coefficient qui dépend de la position du point d'injection et de la géométrie du canal ;
 V_{lin} – débit de flux linéaire, m^2/s .

Dans notre cas, le débit de flux croisé (V_{cr}) est variable en fonction du temps, ainsi il est nécessaire d'en tenir compte dans le calcul du rayon hydrodynamique.

A la fin de l'analyse, le flux croisé est coupé, afin que toutes les particules non fractionnées sortent vers le détecteur (Figure A-7e).

VI.2. Détermination des fractions de différentes populations

Afin d'évaluer d'une manière précise les pertes de l'échantillon à travers la membrane (population P1) ainsi que le coefficient d'extinction molaire (ϵ), une courbe de calibration est tracée. L'expérience doit être effectuée pour chaque échantillon de nature différente. Différents volumes de 4 μm à 12 μm sont injectés. L'échantillon est analysé par AsFIFFF sans application de flux croisé. Dans les conditions expérimentales utilisées, la totalité des particules injectées arrive vers le détecteur, car rien ne passe à travers la membrane (sans flux croisé). Un exemple sur l'extrait protéique de soja natif est présenté sur la Figure A-8a. L'aire de chaque pic est proportionnelle à la masse de protéines injectées. Ainsi, une courbe de calibration peut être tracée (Figure A-8b).

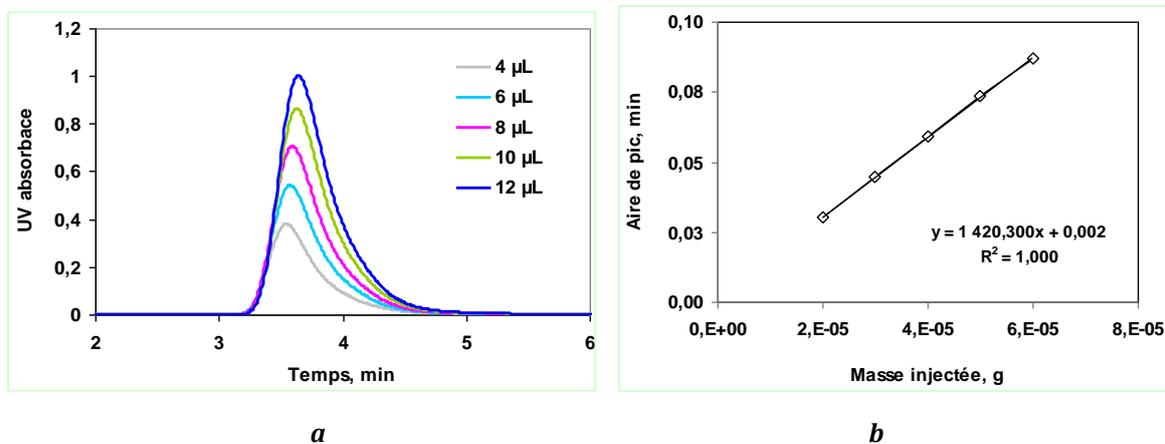


Figure 8. Influence de la masse injectée sur (a) l'aire de pic de fractogrammes AsFIFFF de l'extrait protéique de soja ; (b) la courbe de calibration tracée pour l'extrait protéique de soja.

La pente de la courbe obtenue sur la Figure A-8b est proportionnelle au coefficient d'extinction (ϵ). Ce coefficient peut alors être déterminé en tenant compte de débit d'éluant (1 mL/min). Les valeurs de coefficient d'extinction obtenues pour les différents échantillons de protéines (à partir de courbes de calibration correspondantes) sont présentées dans le Tableau A-2.

Tableau A-2. Coefficient d'extinction obtenu grâce à l'analyse AsFIFFF pour les extraits protéiques natifs et hydrolysés.

Coefficient d'extinction molaire, L/(g×cm)			
Extrait protéique de soja		Extrait protéique de tournesol	
natif	1,42	natif	3,18
DH = 4,0 %	1,23	DH = 5,0 %	3,12
DH = 7,3 %	1,10	DH = 12,7 %	3,29
DH = 13,2 %	0,92	DH = 18,6 %	2,99
DH = 18,8 %	0,86	DH = 23,7 %	3,01

Dans le cas du fractionnement des échantillons (avec application de flux croisé), on peut évaluer la masse exacte d'échantillon arrivée vers le détecteur, grâce à la détermination de l'aire des pics de chaque fractogramme et de l'équation de la courbe de calibration correspondante. Ainsi, la différence entre cette masse et la masse injectée correspond aux pertes de l'échantillon à travers la membrane. La fraction de protéines ayant une masse inférieure à 10 kDa (P1) peut être alors déterminée.

En tenant compte de la masse injectée et des pertes à travers la membrane, la quantité de l'échantillon analysée (passée par le détecteur) peut être évaluée. Cette quantité correspond à l'aire totale de pics sur le fractogramme. Ainsi, les fractions P2 et P3 peuvent être quantifiées en prenant en considération les aires de pics correspondantes.

Annexe VII. Analyse statistique

Afin de déterminer la différence significative entre les données expérimentales, celles-ci sont traitées par une analyse de la variance ANOVA. La variance d'un paramètre choisi est étudiée pour les différents échantillons. Quand la probabilité P est inférieure à 0,05 (seuil de la confiance au résultat de 5 %), il existe une différence significative entre les valeurs analysées. Dans ce cas, le test de comparaison multiple des valeurs est adopté. Dans notre travail, la comparaison des valeurs expérimentales est effectuée par le test de Tukey à l'aide de logiciel Minitab16.

Publications et communications scientifiques

Articles dans des revues internationales à comité de lecture :

Nesterenko A., Alric I., Silvestre F., Durrieu V.
"Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation"
Food Research International, **2012**, 48, 387-396

Nesterenko A., Alric I., Silvestre F., Durrieu V.
"Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness"
Industrial Crops and Products, **2013**, 42, 469-479

Nesterenko A., Alric I., Violleau F., Silvestre F., Durrieu V.
"New way of biomaterials valorization : use of sunflower protein for α -tocopherol microencapsulation "
Soumise au *Food Research International*

Communications scientifiques orales lors de colloques nationaux :

Nesterenko A., Durrieu V., Alric I., Silvestre F.
"Protéines végétales – biopolymères pour la microencapsulation"
40^{ème} Colloque National de GFP – 21-24 Novembre 2011, Pau, France.

Nesterenko A., Alric I., Silvestre F., Durrieu V.
"Nouvelle voie de valorisation des bioressources : Utilisation des protéines végétales en microencapsulation"
3^{ème} Journée des Polyméristes Toulousains – 18 Octobre 2012, Toulouse, France.

Communications scientifiques orales lors de congrès internationaux :

Nesterenko A., Durrieu V., Alric I., Silvestre F.
"New way of biomaterials valorisation : Use of sunflower protein for α -tocopherol microencapsulation"
2nd International Conference on Bio-based Materials and Composites ICBMC'12 – 22-24 Février 2012, Marrakech, Maroc.

Nesterenko A., Durrieu V., Alric I., Silvestre F.
"Influence of vegetable proteins modifications on their encapsulating properties"
8th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries RRB8 – 4-6 Juin 2012, Toulouse, France.

Communications par affiche :

Nesterenko A., Durrieu V., Alric I., Silvestre F.
"Influence of chemical modifications to the encapsulating properties of soy protein"
7th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries RRB7 – 8-10 Juin 2011, Bruges, Belgique.

Nesterenko A., Durrieu V., Alric I., Silvestre F.
"Using of native and modified soy proteins as biopolymers for α -tocopherol microencapsulation"
3rd International Conference on Biodegradable and Biobased Polymers BIOPOL'11 – 29-31 Août 2011, Strasbourg, France.

Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation

Doctorat de l'Université de Toulouse – 5 décembre 2012 – Alla NESTERENKO

RESUME

Les protéines extraites des végétaux sont des matériaux relativement peu coûteux, non toxiques, biocompatibles et biodégradables. Elles représentent une bonne alternative aux protéines d'origine animale et aux polymères dérivés du pétrole. Dans le cadre de cette étude, les protéines extraites de graines de soja et de tournesol ont été utilisées en tant que matériaux enrobants pour la microencapsulation de la matière active hydrophobe (α -tocophérol) ou hydrophile (acide ascorbique) par le procédé d'atomisation. Les protéines de soja sont largement utilisées dans les applications alimentaires et non-alimentaires, notamment en microencapsulation. Elles sont donc étudiées dans ce travail comme matériau enrobant de référence. Les protéines de tournesol n'ont quant à elles pas d'application industrielle concrète, si ce n'est sous la forme de tourteaux dans l'alimentation animale. C'est pourquoi il nous semble pertinent de trouver des nouvelles voies de valorisation pour ce coproduit d'origine agricole.

Plusieurs modifications des protéines, telles que l'hydrolyse enzymatique, l'acylation, la réticulation enzymatique et la cationisation ont été étudiées dans le but d'améliorer les propriétés encapsulantes du matériau enrobant. Dans le contexte de la chimie verte, toutes les modifications ont été effectuées sans utilisation de solvants organiques ni de catalyseurs chimiques. L'influence des modifications chimiques et enzymatiques des protéines, et des paramètres du procédé (pression d'homogénéisation, ratio matériau enrobant/matière active et concentration en protéines) sur les différentes caractéristiques des préparations liquides et des microparticules (viscosité, taille des gouttelettes dans le cas des émulsions, morphologie et taille des microparticules), ainsi que sur les paramètres liés au procédé d'atomisation (rendement et efficacité de microencapsulation) a été particulièrement étudiée au cours de ce travail. Les résultats obtenus confirment que l'extrait protéique de tournesol est tout à fait pertinent comme matériau enrobant et permet d'obtenir des efficacités de microencapsulation significativement plus élevées par rapport à celles obtenues avec l'extrait protéique de soja.

Mots-clefs : microencapsulation, protéines de soja, protéines de tournesol, atomisation, α -tocophérol, acide ascorbique, fonctionnalisation, hydrolyse enzymatique, acylation, réticulation enzymatique, cationisation.

ABSTRACT

Proteins extracted from vegetables are relatively low-cost, non-toxic, biocompatible and biodegradable raw materials. They represent a good alternative to animal-based proteins and petroleum-extracted polymers. In this study, proteins derived from soybean and sunflower seeds were used as wall materials for microencapsulation of hydrophobic (α -tocopherol) or hydrophilic (ascorbic acid) active material by spray-drying technique. Soybean proteins are widely used in food and non-food applications, especially in microencapsulation. They were studied in this work as wall material of reference. Sunflower proteins are not actually used in industrial application, but only in the form of oil-cake for animal feeding. That's why new ways of valorization of this agricultural by-product should be investigated.

Several proteins' modifications such as enzymatic hydrolysis, acylation, cross-linking and cationization were studied in order to improve encapsulating properties of wall material. In the context of green chemistry, all the modifications and preparations were performed without use of organic solvents and chemical catalysts. The effect of protein chemical and enzymatic modifications, and process parameters (homogenization pressure, wall/core ratio and protein concentration) on different characteristics of liquid preparations and microparticles (viscosity, emulsion droplet size, microparticle size and morphology) and on parameters related to the spray-drying process (yield and efficiency of microencapsulation) was particularly investigated in this study. The obtained results confirmed that sunflower proteins are quite suitable as encapsulating agent and provide the microencapsulation efficiencies significantly higher compared to those obtained with soy proteins.

Keywords : microencapsulation, soy proteins, sunflower proteins, spray-drying, α -tocopherol, ascorbic acid, functionalization, enzymatic hydrolysis, acylation, enzymatic cross-linking, cationization.