UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

PHARMACOTECHNIE ET BIOPHARMACIE

ANNÉE 2010 - 2011 SÉRIE DOCTORAT N° 1103

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 21/02/2011

par

Mme Eléonore JOUANNY - BOUYER

STABILISATION D'ÉMULSIONS D'INTÉRÊT PHARMACEUTIQUE PAR DES PROTÉINES ET DES POLYSACCHARIDES : exemples de la β-lactoglobuline, de la gomme arabique et de la gomme xanthane

Directeur de thèse :	Florence Agnely	Professeur (Université Paris-Sud 11)
Co-directeur de thèse :	Ghozlene MEKHLOUFI	Maître de conférences (Université Paris-Sud 11)

Composition du jury :

Rapporteurs :	Odile CHAMBIN	Professeur (Université de Bourgogne)
	Yves CHEVALIER	Directeur de recherche CNRS (LAGEP, Lyon)
Examinateurs :	Alain DURAND	Professeur (ENSIC, Nancy)
	Véronique ROSILIO	Professeur (Université Paris-Sud 11)

RÉSUMÉ :
L'objectif de cette étude a été de formuler et caractériser des émulsions simples huile/eau d'intérêt pharmaceutique stabilisées par de la β-lactoglobuline (β-lg), de la gomme arabique (GA), de la gomme xanthane (GX) et des mélanges β-lg:GA et β-lg:GX. Les concentrations massiques totales des dispersions de biopolymères étaient de 1 % et ont été augmentées à 2,5 % si les émulsions formulées n'étaient pas stables. Le mélange β-lg:GA a été réalisé à pH 4,2 afin de permettre la formation de complexes par interactions électrostatiques attractives entre la β-lg et la GA. Deux ratios β-lg:GA ont été étudiés : 2:1 et 1:2. Enfin, le mélange β-lg:GX a été effectué à pH 7, où les deux biopolymères étant chargés négativement ne se complexent pas et à un ratio de 1:1. Une étude de stabilité des émulsions a été menée sur 6 mois. Les stabilités obtenues ont pu être classées par ordre croissant : GA 2,5 % < β-lg:GA 2,5 % < β-lg 2,5 % < GX 1 % = β-lg:GX 1 %. Plusieurs mécanismes de stabilisation ont été mis en évidence grâce à l'étude des propriétés interfaciales des biopolymères, à l'étude des propriétés rhéologiques des émulsions et à des observations au microscope confocal à balayage laser des émulsions après marquage des biopolymères à la fluorescence. La β-lg et la GA sont toutes deux capables de s'adsorber à l'interface des globules huileux alors que la GX augmente la viscosité de la phase continue. L'association β-lg:GA conduit à la formation d'une double couche interfaciale stabilisante. Enfin, l'association β-lg:GX combine les mécanismes de stabilisation de la protéine, par adsorption interfaciale et de la gomme, par augmentation de la viscosité de la phase continue.

Stabilization of pharmaceutical emulsions by proteins and polysaccharides: examples of β-lactoglobulin, gum arabic and xanthan gum

SUMMARY:
The main objective of this study was to formulate and characterize oil-in-water simple emulsions of pharmaceutical interest stabilized by β-lactoglobulin (β-lg), gum arabic (GA), xanthan gum (XG), and mixtures of β-lg:GA and β-lg:XG. The total biopolymer final concentration in the dispersions was 1 (w/w) % and could be raised to 2.5 (w/w) % if the formulated emulsions were not stable. β-lg:GA mixing was performed at pH 4.2 to allow attractive electrostatic interactions between the two biopolymers and thus the formation of complexes. Two protein:polysaccharide ratios were investigated: 2:1 and 1:2. Conversely, β8lg:XG mixing was performed at pH 7, where both biopolymers are negatively charged, in order to avoid the complex formation, and with a 1:1 ratio. A stability study was conducted for emulsions over a 6-month period. The obtained stabilities could be classified increasingly: GA 2.5 % < β-lg:GA 2.5 % < β-lg 2.5 % < XG 1 % = β-lg:XG 1 %. Several stabilization mechanisms were evidenced by the study of the biopolymer interfacial properties, the study of emulsion rheology and by confocal laser scanning microscopy observations with labeled fluorescent biopolymers. β-lg and GA were both able to adsorb at the interface of oil globule. XG enhanced the continuous phase viscosity. β-lg:GA mixing led to the formation of a stabilizing interfacial double layer. Finally, β-lg:XG association combined the stabilization mechanisms of both biopolymers, respectively: interfacial adsorption and enhancement of the continuous phase viscosity.

MOTS CLÉS : émulsion, stabilisation, β-lactoglobuline, gomme arabique, gomme xanthane, complexes protéine :polysaccharide, adsorption couche par couche, tension interfaciale, rhéologie interfaciale, microscopie confocale à balayage laser.

KEY WORDS : emulsion, stabilization, β-lactoglobulin, gum arabic, xanthan gum, protein:polysaccharide complexes, layer-by-layer deposition, interfacial tension, interfacial rheology, confocal laser scanning microscopy.

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT :
Laboratoire de Physique Pharmaceutique (Equipe 3) - UMR CNRS 8612 Physico-chimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie. Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11 - 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex.

A Pierre, mon époux.

Ce travail te doit beaucoup…
Qu'il soit pour toi le témoignage de mon infinie reconnaissance pour ces années de compréhension.

A Constance, notre fille.

A mes parents.

REMERCIEMENTS

Au cours de ces années de thèse, j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes. Elles ont fait de cette expérience un apprentissage agréable par les discussions tant scientifiques qu'extra-professionnelles que nous avons pu avoir et ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Ce travail de recherche s'est déroulé au sein de l'UMR CNRS 8612. Je remercie en premier lieu les directeurs de l'unité qui se sont succédés pendant ma thèse : le Pr. Patrick Couvreur et le Pr. Elias Fattal pour m'avoir permis d'y effectuer ce travail. Je remercie le précédent responsable du Laboratoire de Physique Pharmaceutique (UMR CNRS 8612), le Pr. Jean-Louis Grossiord de m'y avoir accueillie et d'avoir commencé la direction de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Pr. Florence Agnely, ma directrice de thèse et responsable du Laboratoire de Physique Pharmaceutique (UMR CNRS 8612), pour son accompagnement, sa patience et ses suggestions pertinentes dont elle a pu me faire part lors de la réalisation de ce projet. Je tiens également à la remercier pour nos agréables séances de natations qui ont ponctué ces années et pour tous les échanges que nous avons pu y avoir.

Je remercie également le Dr. Ghozlene Mekhloufi, ma co-directrice de thèse, pour la confiance qu'elle m'a témoignée durant toutes ces années et pour son implication quotidienne dans l'interprétation des résultats et l'orientation de ce travail. J'ai été enchantée de partager son bureau pendant ces quelques années !

Je tiens particulièrement à remercier Mme Odile Chambin et M. Yves Chevalier qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également à M. Alain Durand et Mme Véronique Rosilio d'avoir eu la gentillesse de prendre part à ce jury afin d'examiner mon travail.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes avec lesquelles ce travail m'a amené à collaborer, notamment, le Pr. Véronique Rosilio, le Dr. Catherine Ringard, le Dr. Isabelle Le Potier, le Dr. Christine Vaulthier, le Dr. Sylviane Lesieur, le Dr. Vincent Faivre et Mme Valérie Nicolas pour leurs précieux conseils et leur aide sur certaines parties de ma thèse. Merci au Dr. Nicolas Huang pour les indispensables discussions que nous avons eu en rhéologie volumique et interfaciale.

Je voudrais souligner le travail d'Anne-Sophie, Clotilde, Goundo, Mohamed, Marie-Noëlle, Lisbeth, Morgane, Ni et Typhaine qui ont fait leur stage avec moi. Je les remercie pour leurs très bons et très loyaux services : ils ont fait beaucoup d'expérimentations et toujours dans la bonne humeur.

Je remercie tous les autres membres de l'unité (passés et présents) qui ont contribué à l'ambiance et donc à la qualité de vie pendant ces années, notamment : Virginie, Hammadi, Nadia, Nouha, Monique, Bernard, Sandrine, Nour Eddine, Antoine, Chérifa, Carole, Emile, Van, Vanessa, Perrine, Vincent, Ali, Katia, et bien d'autres…

Enfin, je remercie mon entourage pour le travail de fond qu'ils ont fait. Merci à mes amis pour les pauses divertissements que nous avons pu avoir et qui m'ont permis d'être plus à même de retourner travailler. Merci à toute ma famille et en particulier à ma mère et ma grand-mère qui m'ont toujours soutenue durant ces années d'études. Merci à mon père d'être aussi admiratif devant mon travail accompli. Merci à toi Guy pour ta générosité et ta disponibilité perpétuelle : toujours là quand on a besoin d'aide ! Et Pierre, tu sais bien sûr à quel point notre bonheur me porte… Merci pour ta présence au quotidien. J'embrasse bien fort notre fille Constance, qui nous apporte joie et bonne humeur, tout en ayant une pensée pour celle qui arrive bientôt !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES PRINCIPAUX SYMBOLES 12
INTRODUCTION GENERALE 14
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE 17
CHAPITRE 1 - Physico-chimie des émulsions 19
I. Définition 19
II. Classification et composition 19
III. Mécanismes de déstabilisation 21
IV. Mécanismes de stabilisation 22
V. Procédés d'émulsification 25
VI. Conclusion 26
CHAPITRE 2 - Biopolymères naturels pour la stabilisation d'émulsions pharmaceutiques : une alternative aux tensioactifs synthétiques. 27
PUBLICATION 1: Natural biopolymers for stabilizing pharmaceutical emulsions: an alternative to synthetic surfactants. 29
CHAPITRE 3 - Présentation des biopolymères utilisés 87
I. Introduction 87
II. La β-lactoglobuline (β-lg) 87
1 - Généralités 87
2 - Structures 88
3 - Influence des paramètres environnementaux sur la structure quaternaire 90
III. La gomme arabique (GA) 91
1 - Généralités 91
2 - Structure 91
3 - Propriétés 93
IV. La gomme xanthane (GX) 93
1 - Généralités 93
2 - Structure 93
3 - Propriétés 96

V. Les mélanges de protéines et polysaccharides en milieux aqueux 97
1 - L'association β-lactoglobuline : gomme arabique 98
2 - L'association β-lactoglobuline : gomme xanthane 99
VI. Conclusion 99
PARTIE EXPERIMENTALE 101
CHAPITRE 4 - Caractérisation des composants des émulsions. 103
I. Introduction 103
II. Matériels et préparation des solutions de biopolymères 104
1 - Matériels 104
2 - Préparation des solutions de biopolymères 105
III. Techniques d'analyses mises en œuvre 105
1 - Indices d'acide et de peroxyde 105
2 - Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée 106
3 - Chromatographie d'Exclusion Stérique 108
4 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium 110
5 - Méthode Kjeldahl 111
6 - Electrophorèse Capillaire d'Affinité 112
IV. Résultats et Discussion 116
1 - Indices d'acide et de peroxyde 116
2 - Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée 116
3 - Chromatographie d'Exclusion Stérique 117
4 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium 119
5 - Méthode Kjeldahl 120
6 - Electrophorèse Capillaire d'Affinité 121
V. Conclusion 121
CHAPITRE 5 - Formulation d'émulsions avec la β-lactoglobuline et la gomme arabique : mécanisme de stabilisation et comportement interfacial des biopolymères 123
I. Introduction - résumé 123
II. Techniques d'analyses mises en œuvre 125
1 - Mesure du potentiel zêta (ζ) 125
2 - Analyse de la taille des particules 127
2-1 - Diffraction laser 127
2-2 - Diffusion dynamique de la lumière 129
3 - Mesure de la tension interfaciale 130
4 - Rhéologie interfaciale 132

III. Etude préliminaire : Evaluation de l'influence d'un conservateur sur le comportement interfacial des biopolymères. 134

IV. Mécanisme de stabilisation d'émulsions huile-dans-eau par la β-lactoglobuline et la gomme arabique. 137

PUBLICATION 2: Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β-lactoglobulin and gum arabic 137

V. Etude de la diffusion de la β-lactoglobuline à l'interface huile-eau. 150

CHAPITRE 6 - Etude de la stabilité d'émulsions huile-dans-eau formulées à l'aide de β-lactoglobuline, de gomme arabique et/ou de gomme xanthane. 155

I. Introduction - résumé 155

II. Principales techniques d'analyses mises en œuvre 156

1 - Turbiscan™ 156

2 - Microscopie Confocale à Balayage Laser 157

III. Etude de la stabilité d'émulsions huile-dans-eau formulées à l'aide de β-lactoglobuline, de gomme arabique et/ou de gomme xanthane. 160

PUBLICATION 3: β-lactoglobulin, gum arabic, and xanthan gum for emulsifying sweet almond oil: formulation and stabilization mechanisms 160

CHAPITRE 7 - DISCUSSION GENERALE 193

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 199

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 203

ANNEXE 213

Formulation et caractérisation d'émulsions huile-dans-eau stabilisées par de la β-lactoglobuline et de la gomme arabique 214

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES PRINCIPAUX SYMBOLES

A	aire interfaciale
ACN	acétonitrile
AG	arabinogalactane
AGP	arabinogalactane-protéine
BSA	albumine de sérum bovin
C	concentration molaire
C_{INI}	concentration protéique initiale
C_{SER}	concentration protéique dans le sérum
d_{32}	diamètre moyen volume-surface
d_{43}	diamètre moyen volumique
D	coefficient de diffusion
DMSO	diméthyl sulfoxide
DTT	dithiothréitol
E	champ électrique
E*	module viscoélastique complexe
E'	module élastique
E"	module visqueux
E/H	eau-dans-huile
ECA	électrophorèse capillaire d'affinité
f(ka)	fonction de Henry
F	force
FITC	fluorescéine isothiocyanate
F_S	énergie libre interfaciale
g	accélération de la pesanteur
GA	gomme arabique
GP	glycoprotéine
GX	gomme xanthane
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HPMC	hydroxypropyl-méthylcellulose
H/E	huile-dans-eau
I	force ionique
I_A	indice d'acide
IgE	immunoglobuline E
I_P	indice de peroxyde
K	constante de complexation du substrat avec le ligand
k_B	constante de Boltzmann
L	périmètre de mouillage
[L]	concentration en ligand libre
LBL	layer-by-layer

M	masse molaire
p	pente
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pH	potentiel hydrogène
p*I*	point isoélectrique
R	constante des gaz parfaits
R_h	rayon hydrodynamique
RITC	rhodamine B isothiocyanate
RP-HPLC	chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée
S	surface spécifique
[S]	concentration en substrat libre
$[S]_t$	concentration totale en substrat
SDS	dodécylsulfate de sodium
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
[SL]	concentration du complexe substrat:ligand
T	température
TA	tensioactif
TEMED	NNN'N'-tétraméthyl-éthylènediamine
TFA	acide trifluoroacétique
Tr	temps de rétention
TTAB	bromure de tétradécyltriméthyl ammonium
v	vitesse des gouttelettes
V_C	volume de la phase continue
V_{OIL}	volume de la phase huileuse
α-la	α-lactalbumine
β-lg	β-lactoglobuline
δ	déphasage
ΔP	surpression de Laplace
Δρ	différence de masses volumiques
ε	constante diélectrique
Φ	fraction volumique de l'huile
γ	tension interfaciale ou superficielle
Γ	concentration interfaciale
η	viscosité
μ_{ep}	mobilité électrophorétique
μ_{epS}	mobilité électrophorétique du substrat en présence de ligand
$\mu_{epS,0}$	mobilité électrophorétique du substrat en l'absence de ligand
μ_{epSL}	mobilité électrophorétique du complexe substrat:ligand
ν	facteur correctif de la viscosité et de la force ionique
θ	angle de mouillage
τ_0	contrainte seuil de cisaillement
ζ	zêta

INTRODUCTION GENERALE

Le terme émulsion désigne un système colloïdal comprenant au moins deux liquides non miscibles (habituellement l'eau et l'huile), dont l'un est dispersé en petites gouttes dans une phase continue constituée par l'autre liquide, sous une forme plus ou moins stable.

Les émulsions sont constamment présentes dans notre quotidien et les domaines où on les rencontre sont très nombreux. Il est possible de les retrouver à l'état naturel (lait, latex d'hévéa), comme produit temporaire de certains procédés industriels (polymérisation en émulsion), comme produit indésirable (exploitation des gisements pétroliers), ou enfin comme produits finis ou d'usage courant (vinaigrette, mayonnaise, crèmes, shampoings, peintures, bitumes) (Canselier et Poux, 2004).

Leur élaboration est une opération du génie des procédés dont le principal enjeu est de combiner de façon adéquate les propriétés physico-chimiques des constituants de l'émulsion et les conditions hydrodynamiques liées à la technique mise en œuvre pour réaliser l'émulsification. Ce sont des systèmes thermodynamiquement instables, qui sont donc sujet à une déstabilisation se traduisant par un état final de séparation des phases (Tadros et Vincent, 1983 ; Tadros 2009). Le formulateur peut ralentir ou inhiber les mécanismes physiques conduisant à la démixtion et permettre ainsi la formation d'une émulsion plus stable dans le temps. Ceci s'effectue bien souvent par l'ajout d'agents tensioactifs. Le principal rôle de ces derniers est d'abaisser la tension interfaciale entre les deux liquides non miscibles donnant lieu à la formation de gouttelettes de plus petite taille sous agitation mécanique et formant un film protecteur autour de ces gouttelettes pour ainsi limiter leur agrégation.

Les agents émulsifiants et stabilisants les plus couramment utilisés dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques sont des produits de synthèse chimique. Ces tensioactifs synthétiques sont potentiellement irritants (Secchi, 2008), et il serait intéressant de les remplacer par d'autres molécules plus naturelles afin de développer des émulsions

pharmaceutiques et cosmétiques qui s'inscrivent dans la tendance actuelle de produits naturels et biodégradables. Deux stratégies sont actuellement étudiées : stabiliser les émulsions à l'aide de particules solides ou bien à l'aide de biopolymères. C'est cette deuxième approche que nous avons choisi de développer dans ce travail.

Les biopolymères tels que les protéines et les polysaccharides sont des exemples d'émulsifiants et stabilisants naturels couramment utilisés dans la formulation d'émulsions alimentaires pour contrôler la structure, la texture et la stabilité des produits grâce, entre autres, à leur propriétés de surface et de gélification. De nombreuses protéines peuvent agir comme émulsifiants en raison de leur capacité à s'adsorber à l'interface huile-eau (Möbius et Miller, 1998). Les protéines laitières telles que la β-lactoglobuline (β-lg) et les caséines, par exemple, possèdent non seulement des propriétés nutritionnelles très intéressantes, mais elles sont également d'excellents agents émulsifiants et stabilisants. Les polysaccharides, quant à eux, sont pour la plupart des polymères hydrophiles qui possèdent peu ou pas d'activité de surface. Ils sont le plus souvent utilisés dans la formulation des émulsions pour leur propriété stabilisante, en augmentant la viscosité de la phase continue aqueuse (Dickinson, 2009) ou en la gélifiant (Weiss *et al.*, 2005 ; Benna-Zayani *et al.*, 2008). C'est le cas de la gomme xanthane (GX), par exemple, qui épaissit la phase aqueuse externe de l'émulsion et est alors capable de ralentir le rapprochement des gouttelettes lipidiques (Sun *et al.*, 2007). Cependant, quelques polysaccharides possèdent une activité de surface et sont alors capables de stabiliser les émulsions en s'adsorbant à l'interface entre les deux liquides. Les plus connus sont la gomme arabique (GA), l'amidon modifié, ou encore la pectine acétylée de la betterave à sucre (Dickinson, 2003 ; Garti et Reichman, 1993). La combinaison des avantages des protéines et des polysaccharides dans des conditions appropriées (concentrations, ratio protéine : polysaccharide, pH, force ionique, température) est de plus en plus étudiée dans la littérature dans le but d'améliorer la stabilité des émulsions (Dickinson, 1995, 2008a, 2008b ; Guzey et McClements, 2006). Les protéines et les polysaccharides peuvent former des complexes au travers de liaisons covalentes ou d'interactions électrostatiques attractives. Dans ce dernier cas, des couches de biopolymères chargés de façon opposée peuvent être alternativement déposées à la surface des gouttelettes huileuses afin d'obtenir une membrane multicouche stabilisante. Ces couches sont capables de conférer une stabilisation électrostatique et stérique améliorant la stabilité de l'émulsion aux conditions de stress environnemental (refroidissement, congélation) (Gu *et al.*, 2007 ; Aoki *et al.*, 2005).

Dans ce contexte, notre travail s'est attaché à étudier les potentialités de la β-lg, de la GA et de la GX ainsi que de leur combinaison pour la formulation et la stabilisation d'émulsions simples (huile d'amande douce/eau) d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique d'application dermatologique. Nous souhaitons ainsi montrer la possibilité de formuler des émulsions plus « naturelles », qui seraient potentiellement mieux tolérées que les émulsions classiques. Néanmoins, nous sommes tout à fait conscients que la présence d'éléments d'origine naturelle, notamment la β-lg (El-Agamy, 2007), pourrait également engendrer une intolérance. Cette protéine a été choisi comme protéine modèle car elle est bien connue, cependant, nous souhaiterions pouvoir à terme la remplacer par des protéines de pois par exemple, qui seraient potentiellement moins allergisantes de par leur origine végétale et non animale. Leur composition est cependant plus complexe et actuellement moins bien définie que celle de la β-lg car il s'agit d'un mélange de protéines.

Nous nous proposons dans un premier temps de situer le contexte de l'étude en matière de stabilisation d'émulsions à l'aide de biopolymères par une analyse bibliographique. Tout d'abord, quelques généralités sur les émulsions et les techniques courantes permettant leur caractérisation sont détaillées (Chapitre 1). Puis un état actuel des connaissances dans le domaine de la stabilisation d'émulsion par des biopolymères, ainsi que leurs différentes applications pharmaceutiques possibles sont présentés (Chapitre 2). Enfin, le Chapitre 3 est consacré à la présentation des différents biopolymères utilisés dans ce travail de thèse.

Dans la seconde partie de ce mémoire, sont présentés nos travaux expérimentaux. La caractérisation des différents biopolymères utilisés pour la stabilisation des émulsions est détaillée dans le Chapitre 4. Notre objectif a ensuite été de formuler et d'étudier le mécanisme de stabilisation d'émulsions huile-dans-eau par la β-lg et la GA, ainsi que leur comportement interfacial (Chapitre 5). Enfin, notre dernier objectif a été d'étudier l'action d'un autre biopolymère, la GX, seul et en combinaison avec la β-lg et de comparer ce mécanisme de stabilisation avec ceux étudiés précédemment. Nous avons dans ce but étudié la stabilité d'émulsions huile-dans-eau formulées à l'aide de β-lg, de GA et/ou de GX (Chapitre 6). Enfin, dans le Chapitre 7, l'ensemble des résultats de cette étude sera discuté.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette étude bibliographique, une présentation générale des émulsions sera tout d'abord donnée afin de mieux comprendre les paramètres importants intervenants dans leur formulation et leur stabilisation.

Dans un second chapitre, une présentation des potentialités de divers biopolymères naturels pour la stabilisation d'émulsions à visée pharmaceutique sera détaillée sous la forme d'un article de revue prochainement soumis à *Pharmaceutical Research*.

Le dernier chapitre de cette partie sera dédié aux biopolymères qui nous ont particulièrement intéressés lors de cette thèse.

CHAPITRE 1 - Physico-chimie des émulsions

I. Définition

Il est possible de définir une émulsion comme une dispersion de gouttelettes d'un liquide A dans une phase liquide continue B. Ce sont des systèmes finement divisés qui sont caractérisés par le développement important d'une interface entre les deux liquides A et B non miscibles. Ces systèmes sont thermodynamiquement instables et peuvent être stabilisés cinétiquement par l'ajout d'émulsifiants. Ces derniers peuvent être de différentes natures : des agents tensioactifs, de fines particules solides ou bien des biopolymères, qui vont ainsi conférer des propriétés particulières à l'interface et jouer un rôle fondamental dans la stabilisation de l'émulsion. Cette dernière peut être fluide, crémeuse ou même gélifiée, ce qui permet d'explorer une large gamme de textures.

II. Classification et composition

Il existe deux types d'émulsions : les émulsions simples et les émulsions multiples. Les premières sont constituées d'une phase dispersée dans une phase continue, et sont de type « huile-dans-eau » (H/E) si la phase continue est constituée d'un liquide polaire associé (d'ordinaire, il s'agit d'eau ou d'une solution aqueuse) (Figure 1a). Dans le cas inverse, cette émulsion est appelée « eau-dans-huile » (E/H) (Figure 1b). Les émulsions multiples, quant à elles, consistent en une émulsion simple dispersée à son tour dans une phase continue externe. Elles sont alors du type E/H/E ou H/E/H (Figures 1c et 1d).

Une émulsion est composée d'une phase aqueuse, d'une phase huileuse et d'un agent émulsifiant. La phase aqueuse (ou assimilée) peut contenir des électrolytes, des composés organiques plus ou moins solubles (hydrophiles), *etc*. La phase organique est constituée par une huile d'origine minérale (hydrocarbure, dérivés halogénés…), végétale ou animale, une huile de silicone, *etc*. Quant à l'interface, elle consiste le plus souvent en une monocouche d'émulsifiants adsorbée, mais peut également renfermer des cristaux liquides lyotropes, de

fines particules solides (silice par exemple) ou même des électrolytes inorganiques (Canselier et Poux, 2004).

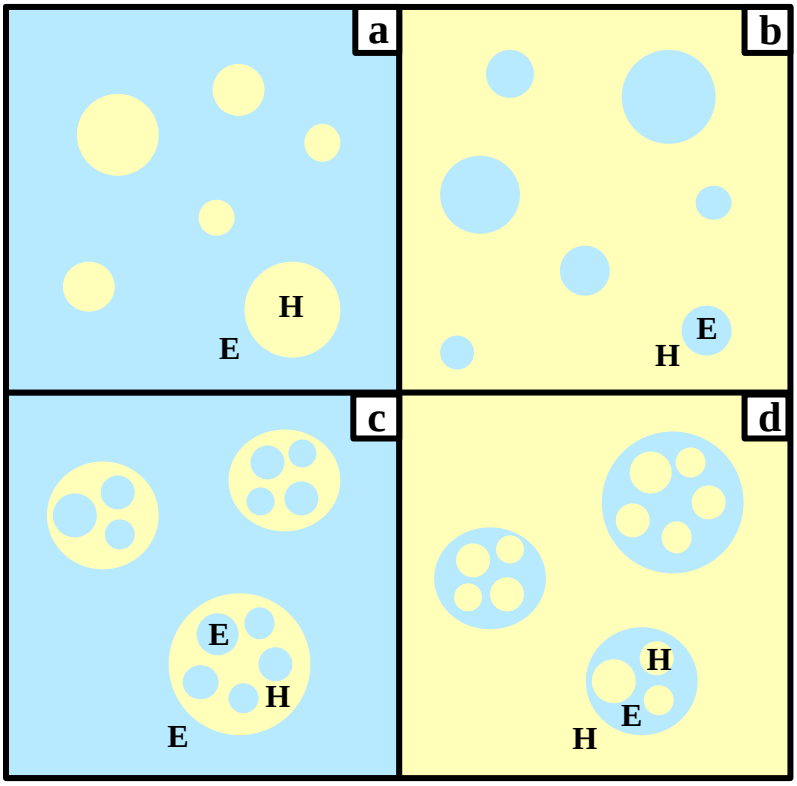


Figure 1 : *Représentation schématique d'une émulsion a : Huile-dans-Eau, b : Eau-dans-Huile, c : Eau-dans-Huile-dans-Eau, d : Huile-dans-Eau-dans-Huile.*

Une autre classification des émulsions est également possible suivant la taille des gouttelettes dispersées. La taille des gouttes formant la phase dispersée d'une macro-émulsion est typiquement de l'ordre du micromètre (0,1 à 100 µm) et impose l'aspect blanc opaque commun à la plupart des émulsions (Brochette, 1999). Les micro-émulsions, pour leur part, sont thermodynamiquement stables et contiennent généralement un tensioactif et un co-surfactant permettant la formation spontanée du système. Ce sont principalement des émulsions transparentes avec une très faible viscosité (Friberg et Venable, 1983). La taille des gouttelettes varie de 100 Å à 0,1 µm (Solans *et al.*, 1997). La dernière catégorie concerne les nano-émulsions avec des tailles de gouttelettes allant de 20 à 200 nm, et d'apparence quasi transparentes (Solans *et al.*, 2005). Ces nano-émulsions ne sont néanmoins pas thermodynamiquement stables.

III. Mécanismes de déstabilisation

Au cours du temps, une émulsion évolue généralement vers l'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire vers une séparation appelée "démixtion" des phases, correspondant à une surface de contact minimale entre la phase aqueuse et la phase huileuse. Les principaux mécanismes de déstabilisation d'une émulsion sont la floculation, la sédimentation ou le crémage, la coalescence et le mûrissement d'Ostwald (Damodaran, 2005).

Sous l'influence de l'agitation thermique (mouvement brownien) et des forces de Van der Waals, la migration des gouttelettes débute par une association réversible sous forme de "flocs" (floculation) (Derjaguin et Landau, 1941) et, selon les masses volumiques relatives des phases, aboutit généralement à un crémage (ascension de la phase huileuse pour une émulsion H/E) ou à une sédimentation (chute de la phase aqueuse pour une émulsion E/H) (Tadros, 2004). La vitesse de migration des gouttes peut être ralentie, en diminuant le diamètre des gouttes, en ayant une différence de densité minimale entre les deux phases et/ou encore en augmentant la viscosité de la phase continue.

La coalescence correspond à la fusion irréversible du film interfacial de deux ou plusieurs gouttelettes afin de diminuer l'aire interfaciale et donc l'énergie libre du système. D'après Gibbs (1931), l'énergie libre interfaciale (F_S) est associée à la formation d'une surface de contact (A) entre les deux phases (Equation 1).

$$F_S = \frac{\partial F}{\partial A} A = \gamma A \qquad \text{Equation 1}$$

avec γ la tension interfaciale, représentant la variation d'énergie libre associée à une variation dA de l'interface. L'énergie libre sera donc minimale lorsque l'aire interfaciale sera la plus petite.

Le mûrissement d'Ostwald (1901) est un phénomène irréversible de diffusion de molécules de la phase dispersée au sein de la phase continue. Il est déclenché par la différence de pression entre les gouttelettes. La surpression de Laplace (ΔP) (Equation 2) est supérieure dans les gouttes de petit rayon (R), ce qui induit un flux de matière tendant à vider les petites gouttes au profit des plus grosses. Ce phénomène est conditionné par la solubilité de la phase discontinue dans la phase continue et par la polydispersité des tailles des gouttes de la phase dispersée. Ce phénomène a pour conséquence la diminution du rayon des petites gouttes

jusqu'à leur disparition complète et conduit ainsi à l'augmentation de celui des plus grosses, modifiant considérablement la granulométrie.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R} \qquad \text{Equation 2}$$

Il est important de noter que la déstabilisation n'est pas toujours indésirable. Elle peut néanmoins être voulue et provoquée par exemple lorsqu'une molécule active doit être libérée au niveau de son site d'action. Une modification de la pression osmotique, du pH, l'application d'un cisaillement permet alors la déstabilisation de l'émulsion et la libération du principe actif qu'elle contient au moment voulu (Li *et al.*, 2010).

IV. Mécanismes de stabilisation

La stabilité des émulsions est gouvernée par de nombreux paramètres tels que le pH, la force ionique, le ratio phase/volume, la viscosité et la température. Cependant, le paramètre le plus important est celui de la taille des gouttelettes (Das et Kinsella, 1990). Il est donc possible de moduler de nombreux paramètres lorsque l'on souhaite ralentir les phénomènes physico-chimiques responsables de la démixtion des phases.

La viscosité de la phase aqueuse, lorsqu'elle est augmentée, permet de ralentir la migration des gouttelettes au sein de l'émulsion et donc de retarder la floculation, la sédimentation ou le crémage. La viscosité de l'émulsion peut également être augmentée lorsque la fraction volumique de la phase dispersée est importante. Ainsi, les gouttelettes se déplacent moins au sein de l'émulsion en raison d'un manque de place ce qui rend le système plus stable.

Enfin, la granulométrie de l'émulsion (taille et distribution de taille) dépend de la fraction volumique de la phase dispersée, du procédé de fabrication et de la nature des interactions colloïdales (fréquence et efficacité des collisions). Les émulsifiants vont donc influencer de façon considérable la granulométrie et la stabilité des émulsions suivant leurs nature, concentration, rapidité d'adsorption, pouvoir tensioactif, capacité à former une couche protectrice (Dickinson et Rodriguez Patino, 1999). Leur rôle est de faciliter la formation des gouttelettes en s'adsorbant à l'interface entre les deux phases. Les émulsifiants peuvent ainsi

généralement diminuer la tension interfaciale, l'énergie à apporter au système pour former des gouttelettes et réduire leur diamètre afin de retarder les phénomènes de déstabilisation. Il existe différents types d'émulsifiants : les tensioactifs (TA), les particules solides et les chaînes de polymères (Figure 2). Les plus couramment utilisés sont les TA monomériques (Figure 2a).

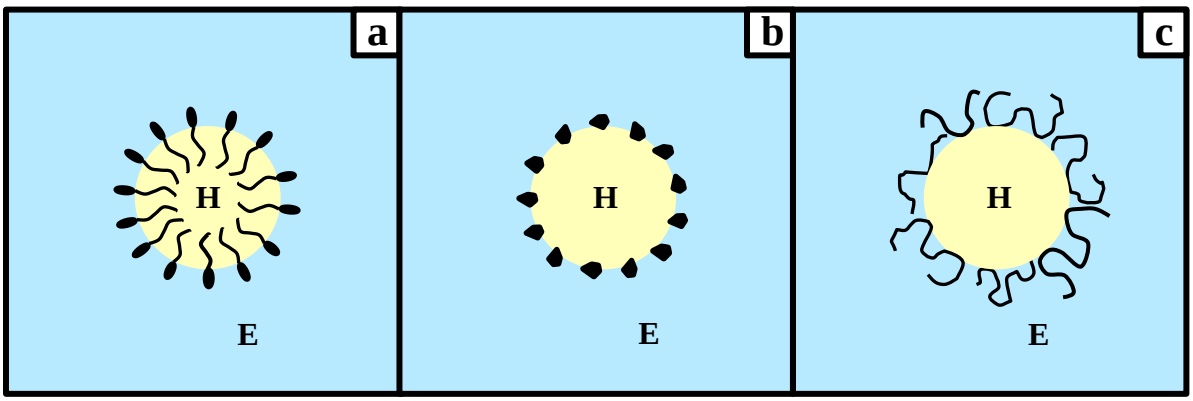


Figure 2 : *Représentation schématique des différents mécanismes de stabilisation pour une émulsion H/E. a : TA monomériques, b : particules solides, c : chaînes polymériques. (adapté de Myers, 1999).*

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles constituées de deux parties distinctes : une partie lipophile composée généralement d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées aliphatiques ayant une affinité pour la phase huileuse et une partie hydrophile représentée par un ou plusieurs groupements polaires, ioniques ou non ioniques présentant une affinité pour la phase aqueuse. Du fait de cette structure, ils ont tendance à s'adsorber aux interfaces. En raison de leur diversité, les TA sont répartis en quatre classes suivant la nature de leur partie hydrophile. La première est constituée des TA anioniques ayant une tête polaire chargée négativement (ex : le dodécyl sulphate de sodium ou SDS). La seconde comprend les TA cationiques dont la tête polaire est chargée positivement (ex : le bromure de tetradecyltrimethyl ammonium ou TTAB). La troisième contient les TA zwittterioniques ou amphotères dont la partie hydrophile est chargée à la fois positivement et négativement, conduisant à une charge globale nulle (ex : le lauroamphodiacetate disodium ou Miranol). Enfin, la dernière classe est constituée des TA non ioniques qui ne possèdent pas de charge sur leur partie hydrophile (ex : le polyoxyéthylène sorbitane monolaurate ou Tween® 20) (Myers, 1999). Suivant leur classe, ils peuvent être potentiellement irritants pour la peau. Les

cationiques notamment sont d'une façon générale bien plus irritants que les zwitterioniques ou que les non ioniques. Ces derniers étant les mieux tolérés (Martini, 2007 ; Secchi, 2008).

Les particules solides (Figure 2b) peuvent, dans certains cas, stabiliser des émulsions qui sont alors appelées émulsions de Pickering (Pickering, 1907 ; Ramsden, 1903). Ces particules sont de dimension colloïdale (inférieure à quelques centaines de nanomètres). Le mécanisme de stabilisation vient de leur adsorption interfaciale (sans abaissement de la tension interfaciale) et des interactions interparticulaires. Les particules doivent être mouillées par les deux phases de l'émulsion. La présence des particules solides à la surface des gouttes assure une stabilisation stérique empêchant leur coalescence (Tambe et Sharma, 1994). La présence de particules dans la phase continue peut également entraîner la formation d'un réseau tridimensionnel réduisant ainsi les possibilités de migration des globules (Binks et Horozov, 2006). Plusieurs types de particules solides (métalliques, minérales et organiques) peuvent être utilisés, tels que : le dioxyde de titane, l'oxyde de fer, les hydroxydes métalliques, les silices, les argiles, le carbonate de calcium et les latex de polystyrène (Aveyard *et al.*, 2003 ; Wang et Hobbie, 2003). Une stabilisation efficace a également été rapportée avec des cristaux liquides, des bactéries, des pollens ou des spores (Dorobantu *et al.*, 2004 ; Binks *et al.*, 2005).

Enfin, les polymères (Figure 2c) sont des macromolécules capables de s'adsorber à l'interface entre les deux liquides afin de diminuer la tension interfaciale et permettre une stabilisation des gouttelettes. L'adsorption est possible de par la présence de régions hydrophobes au sein de leur structure. Ils peuvent être naturels tels que les protéines (Norde, 2003) et certaines gommes (Dickinson, 2003) ou bien synthétiques comme la polyvinylpyrrolidone et l'acide polyacrylique. Il existe également des polymères capables de stabiliser les émulsions sans s'adsorber à l'interface. Ils agissent alors par augmentation de la viscosité de la phase continue aqueuse (Paraskevopoulou *et al.*, 2004). Cette viscosité ralentit ensuite le rapprochement des gouttelettes d'huile les unes par rapport aux autres. La stabilisation des émulsions par les biopolymères est décrite plus en détails dans le Chapitre 2.

Ces deux dernières catégories d'émulsifiants/stabilisants (Figures 2b et 2c) permettent une approche plus naturelle de la stabilisation des émulsions et pourraient être intéressantes pour tenter de s'affranchir de la toxicité potentielle des tensioactifs de synthèse.

V. Procédés d'émulsification

La formulation d'émulsions se déroule généralement suivant quatre étapes (Canselier et Poux, 2004). La première consiste à mettre les différents constituants à la même température et à additionner l'émulsifiant dans la phase externe le plus souvent. La seconde comporte la pré-émulsification de la phase dispersée au sein de la phase continue avec des tailles de gouttes assez grossières. La troisième est une étape d'homogénéisation permettant la réduction de la taille des gouttelettes. Enfin, la dernière étape est une étape de refroidissement où peuvent être ajoutés des additifs permettant de corriger la viscosité, la brillance, la couleur...

La deuxième étape de pré-émulsification est généralement réalisée à l'aide de turbines assurant la dispersion de la phase dispersée au sein de la phase continue. L'étape d'homogénéisation, quant à elle, est réalisée par des homogénéisateurs comprenant les systèmes rotor-stator, haute-pression, ultrasons et membranes microcanaux (Schubert *et al.*, 2003 ; Canselier et Poux, 2004) (Figure 3). Il convient de noter qu'il existe également des procédés non mécaniques tels que la précipitation de la phase dispersée au sein de la phase continue, et l'inversion de phase, généralement lors de l'ajustement de la température à celle d'inversion de phase (Figure 3) (Schubert *et al.*, 2003).

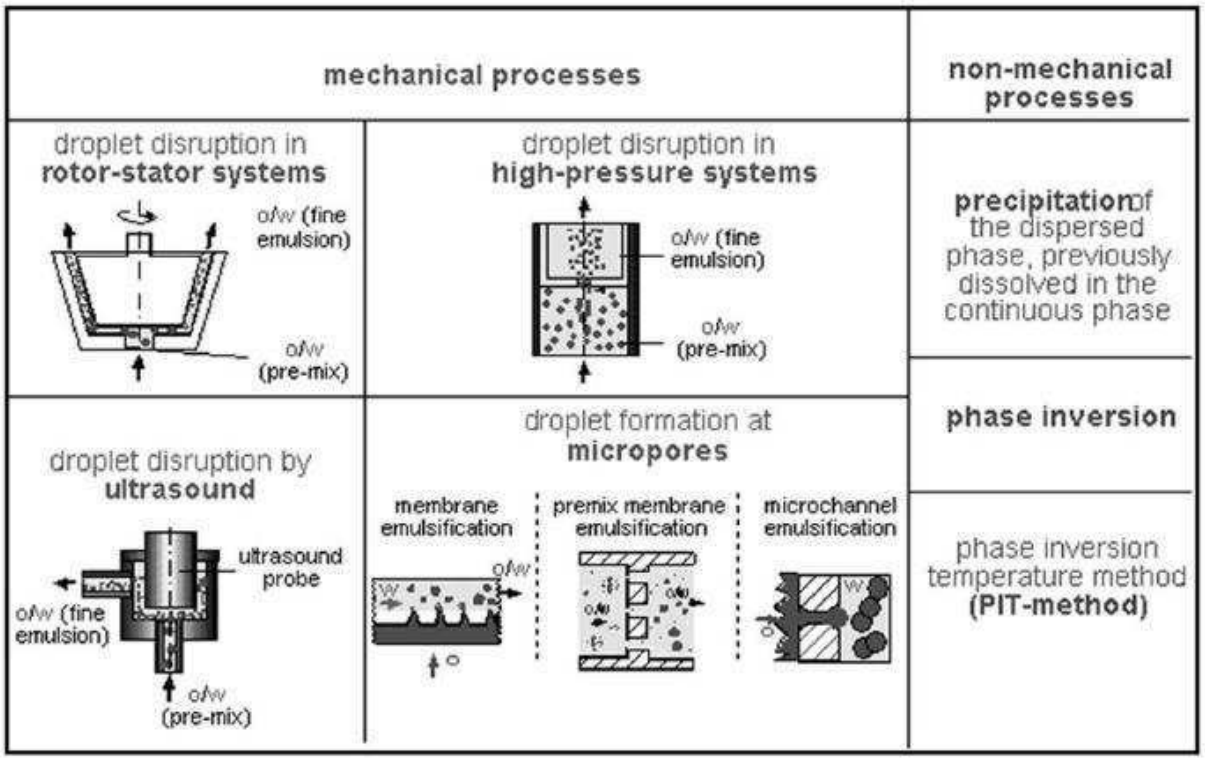


Figure 3 : *Représentation des différents procédés d'émulsification (Schubert et Engel, 2004).*

VI. Conclusion

Ce chapitre sur la physico-chimie des émulsions montre toute la complexité de la formulation et de la stabilisation de ces systèmes. Beaucoup de paramètres physico-chimiques (pH, force ionique, fraction volumique de la phase dispersée, nature et concentration de l'émulsifiant…) et physiques (procédé, température…) sont à considérer pour contrôler la stabilisation de l'émulsion (ou sa déstabilisation si elle est recherchée). Le choix de l'émulsifiant semble être un paramètre clé pour l'émulsification. De nombreux émulsifiants et/ou stabilisants ont été présentés dans ce chapitre montrant le large choix de molécules existant. Nous avons également montré notre intérêt pour l'utilisation de constituants naturels et c'est dans cette perspective que le Chapitre 2 a été rédigé.

CHAPITRE 2 - Biopolymères naturels pour la stabilisation d'émulsions pharmaceutiques : une alternative aux tensioactifs synthétiques.

Ce chapitre comprend un article de revue devant être soumis au journal *Pharmaceutical Research* et s'inscrit dans la continuité du Chapitre 1 précédent.

L'objectif de ce chapitre est de montrer les potentialités qu'ont de nombreux biopolymères naturels pour la stabilisation d'émulsions. Leur utilisation est envisagée en remplacement des tensioactifs de synthèse, potentiellement irritants, afin de répondre à une demande croissante de produits et d'excipients plus naturels et respectueux de l'environnement.

Le présent article reprend tout d'abord les points essentiels de la stabilisation d'émulsions par des biopolymères tels que les mécanismes et les différentes méthodes de caractérisation. Deux types de biopolymères, les protéines et les polysaccharides, sont présentés comme alternative à l'utilisation des tensioactifs usuels. Ils sont couramment utilisés dans l'industrie agroalimentaire et apparaissent comme des candidats prometteurs dans le domaine des émulsions pharmaceutiques. Ces deux types de biopolymères peuvent aussi être associés au travers de liaisons covalentes ou d'interactions électrostatiques attractives. L'association des avantages de ces deux types de biopolymères dans des conditions appropriées (concentration, ratio protéine : polysaccharide, pH, force ionique, température) permet d'améliorer la stabilité des émulsions. Il est aussi possible de déposer autour des globules une alternance de couches de biopolymères chargés de façon opposés, afin d'obtenir une « membrane » multicouche interfaciale protectrice. Ces couches permettent une stabilisation électrostatique et stérique améliorant la stabilité thermique et la résistance aux traitements extérieurs des émulsions.

Des biopolymères comme la β-lactoglobuline, la caséine, la gélatine, les alginates, les carraghenannes, la gomme arabique, la gomme xanthane, le chitosan et leurs complexes sont décrit. L'accent a ensuite été mis sur les perspectives prometteuses d'applications pharmaceutiques de ces émulsions en tant que systèmes d'encapsulation et de libération contrôlée.

PUBLICATION 1:

Natural biopolymers for stabilizing pharmaceutical emulsions: an alternative to synthetic surfactants.

Eléonore Bouyer[1, 2], *Ghozlene Mekhloufi*[1, 2], *Véronique Rosilio*[1, 2], *Jean-Louis Grossiord*[1, 2], *Florence Agnely*[1, 2,*]

[1] Univ Paris Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France.

[2] CNRS, UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France.

[*] Corresponding author: CNRS, UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France.
Tel.: +33 1 46 83 56 26; fax: +33 1 46 83 58 82.
E-mail address: florence.agnely@u-psud.fr.

Article de revue prochainement soumis à *Pharmaceutical Research*

Abstract

Emulsions are widely used in pharmaceutics for the encapsulation, solubilization, entrapment, and controlled delivery of various active ingredients. They are not thermodynamically stable systems and are thus prone to phase separation. Addition of emulsifiers allows the formulation of emulsions with improved stability thanks to formation of structured interfacial films or thickening of the continuous phase. In order to answer the increasing demand for natural and clean label excipients, potentially irritative synthetic surfactants can be replaced by naturally occurring biopolymers. Proteins and polysaccharides are examples of biomacromolecules capable of stabilizing emulsions. They are currently used in the food industry and appear as promising candidates in the field of pharmaceutical emulsions too. Proteins and polysaccharides may be associated either through covalent bonding or attractive electrostatic interactions. The combination of the properties of these biopolymers under appropriate conditions leads to increased emulsion stability. Alternative layers of oppositely charged biopolymers can also be formed around the globules to obtain multi-layered "membranes". These layers can provide electrostatic and steric stabilization thus improving thermal stability and resistance to external treatment. Various pharmaceutical applications of these novel biopolymer-stabilized emulsions such as encapsulation, controlled digestion, and targeted release are proposed and demonstrate the great potential of these systems.

Keywords: emulsion, stabilization, biopolymer, delivery systems, layer-by-layer.

1. Introduction

An emulsion consists of a dispersed liquid into another one, each liquid being immiscible, or poorly miscible in the other [1]. The dispersed phase forms droplets into the continuous phase. Emulsions are not thermodynamically stable systems: they can destabilize and phase separate [1, 2]. Addition of emulsifiers with interfacial and/or thickening properties allows their formation and stabilization. Emulsions can be classified into two groups: simple emulsions and multiple ones. Two classes of simple emulsions can be defined, namely oil-in-water (O/W), and water-in-oil (W/O) (Figure 1). A more sophisticated system is constituted by multiple emulsions. The simplest ones are double emulsions like oil-in-water-in-oil (O/W/O) or water-in-oil-in-water (W/O/W) (Figure 1). In this last case for example, the emulsion is composed of aqueous droplets, which are dispersed inside oily drops, these oily drops being themselves dispersed in an external aqueous phase [3]. Emulsions can also be classified according to their droplet size into three categories: macro-emulsions, micro-emulsions, and nano-emulsions. Macro-emulsions are emulsion systems with droplet sizes ranging from 0.1 to 100 µm. These sizes allow light scattering and give their white color to these systems. Micro-emulsions generally contain both a surfactant and co-surfactant that induce spontaneous formation of the system. Micro-emulsions are often transparent to the eye, with low viscosity, and are thermodynamically stable [4]. This stability is due to very low interfacial tensions, typically 10^{-1}-10^{-2} mN/m [5]. Their droplet size varies from 100 Å to 100 nm [6]. The last category, nano-emulsions, is often referred to emulsions with droplet sizes in the nanometric scale, generally 20-200 nm, with transparent or translucent appearance due to their characteristic size [7]. Contrary to micro-emulsions, they are not thermodynamically stable. Numerous applications are found for emulsions such as in food, agricultural, pharmaceutical, cosmetic, and petroleum industries [8]. In the pharmaceutical field, emulsions are mainly used for parenteral, oral, and topical (skin and eye) deliveries [8]. They are either directly used as such or as a step to obtain nano- and micro-particle systems for the vectorisation of active ingredients [9].

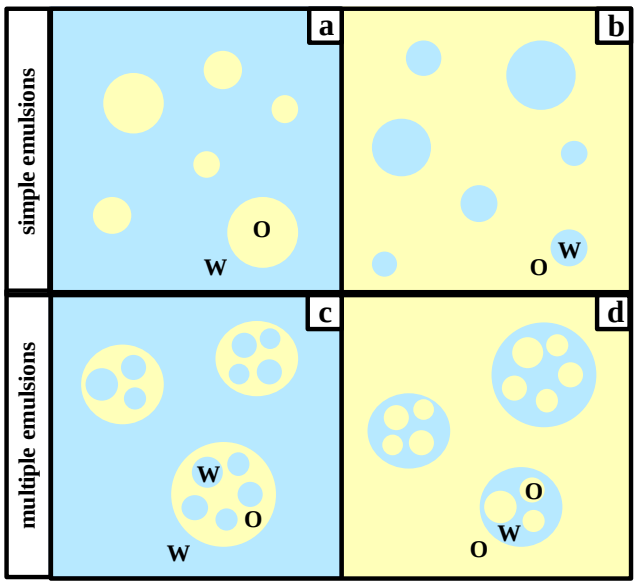


Figure 1: Schematic representation of a: Oil-in-Water, b: Water-in-Oil, c: Water-in-Oil-in-Water, and d: Oil-in-Water-in-Oil emulsions.

The present review explores the potentialities of natural emulsifiers for the replacement of synthetic irritative surfactants that are usually used in pharmaceutical emulsions, in order to answer the increasing demand for natural excipients and sustainable development. Biopolymers such as proteins and polysaccharides are good examples of natural emulsifiers/stabilizers currently encountered in the food industry and could be used to stabilize pharmaceutical emulsions. In the pharmaceutical field, they are already used for other applications such as capsule formation (gelatin), tablet binder (gum arabic, chitosan, hypromellose), suspending agent (gum arabic, hypromellose), mucoadhesive formulations (chitosan), matrix for extended-release tablets (hypromellose), *etc*. [10]. Many proteins can act as emulsifiers because of their ability to adsorb at the oil-water interface [11] and increase emulsion stability [12]. Milk proteins such as caseins and β-lactoglobulin are currently used for this purpose. Most polysaccharides can act as stabilizers for emulsions by forming an extended network in the continuous phase which thus becomes highly viscous [13] and can even form a gel [14, 15]. This network is able to slow down droplets movements and even entrap them. Only few polysaccharide derivatives possess surface properties allowing their adsorption at the oil-water interface. The most widely used are gum arabic, modified starches, modified celluloses, some kinds of pectin, and

galactomannans [16, 17]. Combining the properties of proteins and polysaccharides under appropriate conditions (concentration, protein-to-polysaccharide ratio, pH, ionic strength, temperature) may be a valuable strategy for improving emulsion stability [18-21]. Indeed, proteins and polysaccharides can form complexes through covalent binding or attractive electrostatic interactions. In the latter case, alternative layers of oppositely charged biopolymers can be formed around the oil globules to obtain multi-layered "membranes". These layers provide both electrostatic and steric stabilizations thus improving thermal stability and resistance to external treatment (*i.e.* thermal processing, chilling, and freezing) [21-23]. In the stability of emulsions, the formulation process is also a key parameter that influences their microstructure (droplet size). Emulsions can be formulated by many different protocols, involving rotor-stator systems, ultrasound, high-pressure systems, phase inversion temperature, micropores, *etc* [24]. However, it is out of the scope of this review to give a detailed description of these formulation processes. After a general presentation of emulsion stabilization and destabilization mechanisms, this article reviews ongoing research on emulsion stabilization by proteins, polysaccharides, and their mixtures. The potential pharmaceutical applications of these novel biopolymer emulsions stabilizers are then described.

2. Emulsion stability and characterization

2.1. Destabilization mechanisms

During emulsification, the interfacial area between the continuous and the dispersed phases is considerably augmented compared to the interface before dispersion. The interfacial free energy is therefore significantly increased. In accordance with the thermodynamic dictum that all systems should be at their global energy minimum state, emulsions rapidly tend to phase separate in order to minimize the interfacial contact area and free energy. This instability manifests itself by various mechanisms: flocculation, coalescence, creaming or sedimentation, and Ostwald ripening (Figure 2). Flocculation and coalescence are the major destabilization mechanisms [25]. Flocculation is the result of attractive forces between the droplets and leads to the formation of flakes of dispersed phase. It may occur in biopolymer stabilized emulsions, either by depletion or bridging mechanisms (Figure 3).

Depletion flocculation arises when biopolymer concentration exceeds a critical value. Indeed, the presence of non-adsorbing or excess biopolymer in the continuous phase increases the attractive force between the droplets by osmotic effects and provokes the exclusion of the biopolymer chains from the narrow region surrounding two droplets [26]. Bridging flocculation occurs when a single biopolymer molecule adsorbs to the surface of more than one emulsion droplet. It thus acts as a polymeric link and promotes bridging flocculation [21]. The formed flakes are the first step of sedimentation (in W/O emulsions) or creaming (in O/W emulsions) and coalescence.

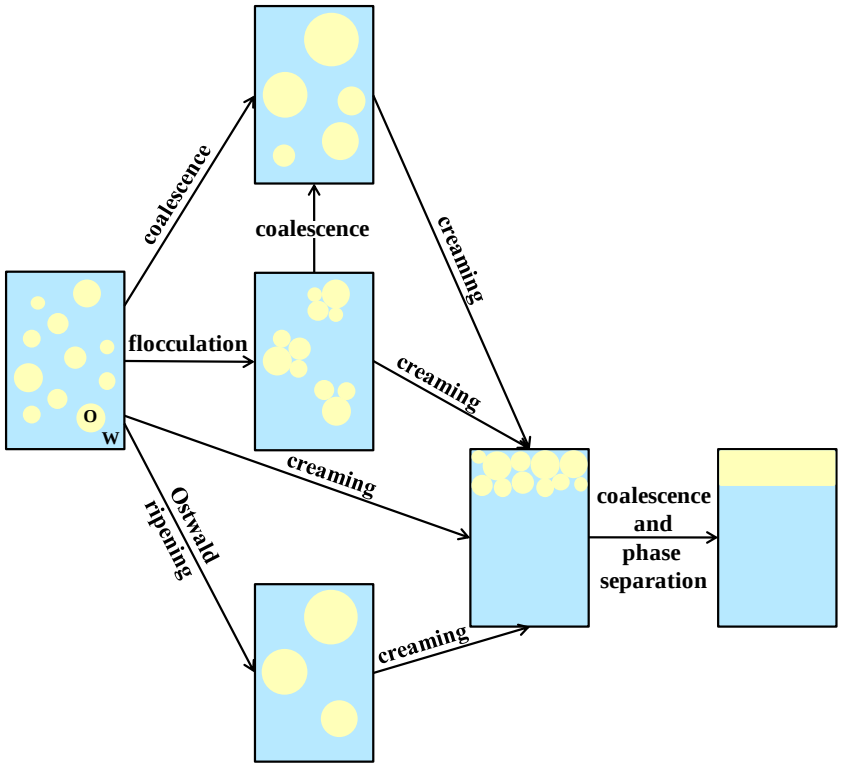


Figure 2: Schematic representation of the various destabilization mechanisms for an Oil-in-Water emulsion.

In some cases, the flocculation mechanism is reversible and simple magnetic stirring or hand shaking can break the flakes. However, in some other cases, it is irreversible and droplets coalesce. Small droplets fuse together and progressively form larger globules. Emulsions can also undergo creaming or sedimentation, which consists in the migration of globules to the top or bottom of the dispersion, depending on the relative densities of the two liquid phases. Finally, Ostwald ripening is a diffusion mechanism of dispersed phase molecules through the continuous phase, without any contact between

droplets, related to the solubility of the dispersed phase in the external phase. This diffusion takes place from small droplets to larger ones, driven by a higher Laplace pressure existing in the former ones. Over time, the droplet size distribution shifts toward larger values. Ultimately, these mechanisms can lead to the oiling off and the emulsion breaks up into separated oil and water phases. Flocculation, sedimentation and creaming are reversible mechanisms of droplets migration, whereas Ostwald ripening and coalescence are non-reversible mechanisms of droplets size increase. For in-depth understanding of these destabilization mechanisms, a very good description can be found in the review of Damodaran [27].

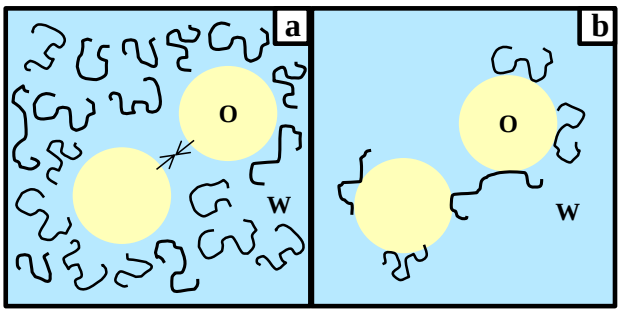


Figure 3: Schematic representation of a: depletion and b: bridging flocculation in presence of polymer.

In the pharmaceutical field, it is necessary to control these destabilization mechanisms. Depending on the applications it may be important to slow down the emulsion destabilization mechanisms to a maximum or to know the exact environmental conditions (shear rate, pH, *etc*.) that will allow the destabilization of the emulsion and the consequent release of the encapsulated active pharmaceutical ingredient at the right time to the targeted site.

2.2. Stabilization methods

Emulsifiers and stabilizers are commonly used to kinetically stabilize emulsions. They are classified in four categories [28]. The first class is composed of non-surfactant ions that can adsorb to the droplets surface without affecting the interfacial tension nor facilitating the emulsification process. However, some may, under appropriate conditions, impose a slight electrostatic barrier between approaching

droplets thus contributing to emulsion stabilization. The second class is composed of small non-surfactant colloidal solids that adsorb (*i.e.* silica or clay particles of Pickering emulsions) and form a physical barrier between droplets, thereby delaying or preventing coalescence. The third class is constituted of classical monomeric surfactants, like sodium dodecyl sulphate. They decrease interfacial tension and increase emulsion stability but can be quite irritative and potentially toxic towards the environment. Finally, the fourth class comprises polymer surfactants. In addition to their general interfacial tension lowering properties, they induce steric or electrostatic interactions, changes in the interface viscosity or elasticity, or changes in the bulk viscosity of the system thus improving emulsion stability.

Biopolymers (proteins and polysaccharides) described in this review, belong to this last class. They combine several mechanisms to prevent flocculation and coalescence. Biopolymer gels and non-adsorbing thickening polysaccharides reduce droplets movements and encounters in emulsions by increasing the viscosity of the continuous phase. Adsorbing biopolymers act on inter-droplet interactions. Indeed, flocculation and coalescence can also be avoided by inducing repulsive electrostatic interactions or steric hindrance between droplets.

Emulsion stabilization or destabilization by a biopolymer depends on various parameters, such as polymer nature, polymer concentration, pH, ionic strength, *etc*. When formulating a biopolymer-stabilized emulsion, it is thus necessary to control them.

2.3. Emulsion characterization

This paragraph gives a general overview of various techniques used for emulsion characterization and elucidation of stabilization mechanisms. However, this following list is not exhaustive.

Emulsion type

The continuous phase of an emulsion can be water (in O/W emulsion) or oil (in W/O emulsion). However, the general aspect of both systems is often very similar, even if some sensorial techniques rapidly allow the identification of one or the other emulsion type (shining aspect, oily touch, dilution

in water, dissolution of methylene blue) [29]. Measurement of the external phase conductivity is more accurate. Indeed, an aqueous continuous phase has a higher conductivity than an oily one [30]. Most biopolymers are water soluble, and thus tend to form O/W emulsions.

Emulsion granulometry

The granulometry of an emulsion is a very important parameter which is related to the formulation process. The droplet size distribution and polydispersity can be measured by means of various experimental techniques, such as laser diffraction [31, 32], dynamic light scattering [33, 34], and optical microscopy [33]. The most popular definitions available to obtain the droplet-size are [35]:

the volume-surface (or Sauter) mean diameter: $d_{32} = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2}$ Eq. 1

the volume-moment mean diameter: $d_{43} = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3}$ Eq. 2

where n_i and d_i are the number and diameter of the globule population i, respectively;

and the hydrodynamic radius: $R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$ Eq. 3

where k_B is the Boltzmann constant, T the temperature, η the viscosity of the continuous phase, and D the diffusion coefficient of a droplet.

Emulsion stability

Emulsion stability is a result of physical stability (no phase separation), chemical stability (no chemical reaction), and microbiological stability (no germ development). The physical stability can be evaluated by two accelerated aging methods, which mimic conditions that formulations could undergo during transport and storage. The first one consists in evaluating samples stored at different temperatures (from 0 to 40 °C) and for various periods of time (from 24 h to 15 days). It may also

include repeated hot-cold cycles. The second method enhances by centrifugation the sedimentation or creaming processes that can lead to coalescence [36]. Accelerated aging studies by centrifugation allow determination of the emulsion stability index (ES) following Equation 4:

$$ES(\%) = \frac{\text{remaining emulsion height}}{\text{initial emulsion height}} \times 100 \qquad \text{Eq. 4}$$

However, one must be careful when drawing conclusions from results obtained by these methods, as they do not perfectly mimic the natural aging process.

Another way and relatively new approach is to evaluate emulsion stability by using a Turbiscan (Formulaction®, L'Union, France). The apparatus is composed of a reading head consisting of a pulsed near infrared light source (λ = 850 nm) and two synchronous detectors that scan the entire length of an emulsion filled tube. The transmission detector measures the light flux transmitted (at 0° angle) through the emulsion, and the backscattering detector receives the light backscattered (at 135° angle) by the emulsion. Diffuse reflectance and transmittance *versus* sample height and time are obtained, allowing detection of flocculation and coalescence processes even at an early stage (invisible to the eye) [37, 38].

Rheological properties

The flow characteristics of emulsions are influenced by various interaction forces that occur in the system during sedimentation or creaming, flocculation, coalescence, and Ostwald ripening. Several factors affect emulsion rheology such as volume fraction and viscosity of the dispersed phase, droplet granulometry, viscosity of the continuous phase as well as its chemical composition (polarity, pH), nature and electrolyte concentration, and interfacial rheology [39]. Numerous methods are available to investigate emulsion flow properties. It is possible to perform flow, creep, and oscillatory experiments. In oscillatory measurements, a viscoelastic material is subjected to a sinusoidally varying strain (or stress). The response in stress (respectively strain) is then monitored. From these measurements, it is possible to determine emulsion viscoelastic parameters such as storage (G') and loss moduli (G"). G' modulus represents the elastically stored energy in the emulsion, and G" modulus the energy

dissipated in viscous flow [39]. Depending on their properties, emulsions can either maintain the necessary fluidity for their transport and distribution or exhibit a yield behavior allowing the absence of flow under small shear stress. The shear-thinning behavior is probably the most encountered rheological behavior in the field of emulsions: the apparent viscosity decreases when increasing the shear rate. From the variation of the different rheological parameters, it is possible to infer the stability of emulsions, their texture, syringeability, and conditioning possibilities for future applications [39].

Zeta potential measurements

This technique may help predicting flocculation and coalescence because emulsion stability can be influenced by the interfacial electric charges [31-34]. The effective charge of a droplet differs from its real charge because of the presence of counter-ions in the solution. The closest ones are attached by electrostatic attractions. They are in immediate contact with the droplet surface and form the Stern layer. These attached counter-ions decrease the droplet real charge. Their concentration then rapidly decreases when deviating from the droplet surfaces till reaching its equilibrium solution concentration. In an electrical field, the adsorbed counter-ions of the Stern layer move jointly with the droplet. The electrophoretic mobility (μ_{ep}) is first calculated using the von Smoluchowski theory modified by Henry [40] (Equation 5), with v, the droplets rate and E, the applied electrical field.

$$\mu_{ep} = \frac{v}{E} \qquad \text{Eq. 5}$$

The zeta (ζ-) potential can then be calculated applying Henry's relation (Equation 6):

$$\mu_{ep} = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \qquad \text{Eq. 6}$$

where ε is the liquid dielectric constant, η its viscosity, and f(ka) is Henry's function being equal to 1.5 when approximating with Smoluchowski. The ζ-potential corresponds to the potential measured at the Stern layer. A high absolute value of the ζ-potential avoids flocculation. Conversely, a small value (close to zero) allows the droplets to come in closer contact with each other and flocculate.

The ionic strength is of importance in emulsion stability as high ionic strength can induce droplet flocculation if the electrolyte concentration is high enough to electrostatically screen droplets charge [41]. This screening can be detected by ζ-potential measurement because its value gets closer to zero.

Determination of biopolymer adsorption

It is possible to plot adsorption isotherms of a biopolymer at the oil-water interface. The graph represents the adsorbed amount of polymer on an interfacial area *versus* the concentration of the polymer [42]. The shape of the curve indicates when the interface is entirely covered by ending as a plateau. It also gives information about the adsorbed molecule conformation and about competitive adsorption [43].

In the case of proteins, their interfacial concentration (Γ) can also be calculated from the specific surface area of the oil droplets, and from the difference between the amount of protein used to prepare the emulsion and that measured in the aqueous phase after the emulsification process. After a centrifugation step, the following mass balance (Equation 7) is frequently used [36, 44-46]:

$$\Gamma = \frac{V_C (C_{INI} - C_{SER})}{SV_{OIL}} = \frac{(1-\Phi)d_{32}}{6\Phi}(C_{INI} - C_{SER}) \qquad \text{Eq. 7}$$

where S is the specific surface area of the droplets, V_C and V_{OIL} are volumes of the continuous and oil phases, respectively, Φ is the oil volume fraction, C_{INI} is the initial protein concentration in the solution, and C_{SER} is the protein concentration in the aqueous phase (in the serum) after emulsification determined by the Bradford method [47]. It is important to note that to perform such a characterization, the equilibrium between the adsorbed and the non-adsorbed chains should not be modified by the centrifugation step.

Interfacial tension measurements

Three techniques can allow interfacial tension measurements: the pendant (or rising) drop method, based on the analysis of the shape of a drop, the Wilhelmy plate and the Du Noüy ring methods consisting in measuring the force that can pull out a plate or ring from the studied liquid surface. An

emulsifier is often considered as a surfactant which decreases the interfacial tension. Indeed, the lower the interfacial tension, the more stable the emulsion [48]. Adsorption kinetics is of importance and is influenced by the molecular weight of the surfactant: a small monomeric one adsorbs at the interface very quickly. This rapid adsorption during emulsification process contributes to the production of small droplets, which in turn, favors good stability to the system. However, decreasing the interfacial tension is not the only mechanism of emulsion stabilization by emulsifiers. For example, some high molecular weight biopolymers which slowly adsorb at the interface and/or decrease the interfacial tension to a small extent only, still confer the interface very good viscoelastic properties allowing stabilizing emulsions [49].

Interfacial rheology measurements

Stress/strain relationships occurring at interfaces of bi-dimensional phases such as surfactants or biopolymers single-/multi-layers in an emulsion can be studied by interfacial rheology. Elastic and viscous moduli are obtained for each interfacial strain. The drop method can be used for dilational rheological measurements. The volume of a pendant (or a rising) drop is submitted to sinusoidal variations, thus resulting in expanding or compressing the surface of the drop. The interfacial tension is determined by analyzing the profile of the drop according to the Laplace equation, by means of a CCD camera connected to a computer. Another technique consists in using a rheometer equipped with a bi-conical disk. This disk is placed at the interface between the two liquids and rotates to determine the viscous, and elastic shear rheological parameters of the studied interface. A complex modulus (E*) can be defined for both techniques as follows (Equation 8):

$$E^* = E' + iE'' \qquad \text{Eq. 8}$$

where E' is the elastic modulus describing the elastic properties of the interface, and E" the viscous modulus correlated to its viscous resistance. The phase angle (δ) is related to E' and E" moduli by Equation 9:

$$\tan\delta = \frac{E''}{E'} \qquad \text{Eq. 9}$$

δ values below 45 ° reveal a predominantly elastic behavior, a more favourable condition for emulsion stability. Correspondingly, a high elastic modulus compared to the viscous one is correlated to good emulsion stability. Bos *et al.* [50] consider that dilational elasticity and viscosity are very important indicators of film rupture, since this rupture can mainly be seen as a dilational deformation. If we consider emulsion stability, this means that when two droplets of the emulsion encounter, the elastic interface resists to the strain stress created by the deformation of the droplets, thus preventing coalescence and favouring emulsion stability [51]. Emulsions containing adsorbing biopolymers are very well stabilized because of the formation of such viscoelastic adsorbed layers [12, 50].

Interfacial film thickness and refractive index

The thickness of an interfacial film can be determined by ellipsometry. This technique can be applied to the adsorption of surfactants molecules at the air-liquid interface [52, 53] as well as the oil-water one [54, 55]. The principle of the measurements is based on the change in the state of polarization of the reflected polarized light against the studied interface. This change is expressed in amplitude ratio (Ψ) and phase shift (Δ). These two parameters give the refractive index of the two materials provided that the interface is clean. In the case of an adsorbed interfacial film, they depend on its thickness and refractive index. It is then possible to obtain the adsorbed layer thickness, and its mean refractive index, knowing these parameters (Ψ, Δ) for several surrounding medium. The monitoring of Ψ and Δ allows studying the process of interfacial layer formation upon adsorption of an emulsifying agent [54, 56]. For example, Russev *et al.*, obtained a thickness of 1.8 nm for the first β-casein layer adsorbed at the oil-water interface, and 5.4 nm for the second one [56]. It is thus possible to apply this technique to a multi-layered interfacial film.

3. Protein-stabilized emulsions

Many proteins are able to adsorb at the interface and facilitate droplets disruption by lowering the interfacial tension [57]. However, at equivalent interfacial concentration small synthetic surfactants are generally more effective than proteins in reducing the interfacial tension. Typically, most proteins decrease the oil-water tension by about 15 to 20 mN/m at saturated monolayer coverage compared

with 30 to 40 mN/m for small synthetic surfactants [58]. However, proteins lead to thermodynamically and kinetically more stable emulsions [27, 50]. In their primary structure, proteins contain hydrophilic and hydrophobic residues randomly spread all over the structure. In the tertiary folded conformation, some of these residues exist as segregated patches. At the oil-water or air-water interface, protein adsorption proceeds in three main stages [59]: diffusion from the bulk to the vicinity of the interface, actual adsorption, and reorganization of the adsorbed protein. During adsorption, only a fraction of the protein hydrophobic groups is embedded into the lipophilic phase and most of the protein structure remains into the aqueous one. Proteins then undergo conformational changes in order to maximize the number of favorable interactions and minimize the number of unfavorable ones in their environment. Intermolecular interactions between adsorbed protein molecules can lead to the formation of a highly viscoelastic film that prevents coalescence [60]. The remaining protein residues in the aqueous phase also provide steric stabilization against flocculation and coalescence [61]. It is important to note that all proteins possess various amounts of hydrophobic groups and exhibit different flexibility. Consequently, they exert diverse interfacial properties.

Typically, 1 to 3 wt % protein concentration is used to stabilize emulsions [27]. In this concentration range, protein adsorption rate is not a limiting factor to emulsion formulation. The effectiveness of proteins in emulsion stabilization can be improved through physical, enzymatic, and genetic modifications. For example, partial denaturation or unfolding of proteins can be obtained under controlled heating and shear conditions [62, 63]. These modifications allow them to expose more hydrophobic groups towards the air or oil phase.

Among others, caseins, whey proteins, gelatins, and pea proteins are commonly used in the food industry. We describe them in more details in the following sections.

Caseins

Caseins are the main protein components of mammalian milk. In emulsion formulation, sodium caseinate is generally used. It mainly consists of a partially aggregated mixture of four individual flexible caseins (α_{s1}, α_{s2}, β, κ) (19,000 - 25,000 g/mol) [64]. In milk, caseins are intimately associated

with calcium phosphate in the form of colloidal particles called "casein micelles" [65]. The two major individual caseins, α_{s1} and β, are extremely effective emulsifying agents. They are able to decrease the interfacial tension during emulsification, and to protect newly formed fine droplets against flocculation and coalescence by a combination of electrostatic and steric repulsions [64]. Moreover, adsorbed β-casein layers at the air-water interface display a viscoelastic behavior as evidenced by magnetic rod interfacial shear rheometry [66] and electrocapillary wave diffraction [67]. Casein-stabilized emulsions do, however, destabilize by a flocculation mechanism in presence of calcium salts, as observed by Dickinson and Davis [64] by droplet-size measurements. Dalgleish and others [68, 69] explained this phenomenon by the strong specific calcium ion binding to the negatively charged phosphoserine groups of casein, which reduces the net negative charge and thickness of the adsorbed caseins layer. To our knowledge, no marketed pharmaceutical emulsion containing caseins exists to this date, but these proteins can be used in some nutritional supplementation formulations.

Whey proteins

Milk globular whey proteins are a mixture of α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and several other minor proteins (immunoglobulins, serum albumin) that are less flexible than caseins. They are currently used with success in food emulsions, especially β-lactoglobulin (18,300 g/mol) and α-lactalbumin (14,200 g/mol) [46, 70]. For example, Kim *et al.* [71] have shown that it was possible to stabilize emulsions with β-lactoglobulin at pH 7, as this protein bears a net negative charge and induces relatively strong electrostatic repulsion between droplets. Indeed, the p*I* for this protein is 5.2. However, these authors also observed by particle size measurements that β-lactoglobulin-stabilized emulsions were rather heat sensitive and flocculated during heat treatments [71]. This finding is in agreement with Ye's results [44]. Indeed, temperature should not exceed a certain critical value (~ 70 °C) otherwise proteins unfold and expose reactive groups that increase attractive interactions between them [71], leading to extensive droplet flocculation [12]. Beside its stabilizing effect by electrostatical interactions, β-lactoglobulin is also able to decrease the air-water or oil-water interfacial tension [72, 73]. Moreover, Wüstnek *et al.* [73] have performed interfacial dilational rheology measurements using the pendant drop method and reported its elastic behavior. They described that at low protein

concentrations, the adsorption proceeds first at a clean interface that is free of biopolymer molecules. When the first molecules reach the interface in optimal conditions, they can fully adsorb at any locus and occupy a maximum interface area. However, at higher concentrations, abundant lateral protein-protein interactions induce a more compact conformation of the protein. At interfacial saturation, elastic and viscous moduli reach a maximum and for higher interfacial concentrations, both moduli decrease. In a previous work, we also observed this behavior in the oil-β-lg solution system [49]. Bovine serum albumin (66,338 g/mol [74]) can also form an interfacial elastic film, as inferred from pendant drop and surface pressure-area measurements [75-77].

To this day, there is no example of β-lactoglobulin and α-lactalbumin applications in the pharmaceutical industry. Human serum albumin, however, can be used in case of hypovolemia [78].

Gelatin

Gelatin is a relatively high molecular weight protein derived from animal collagen, *e.g.* pig, cow or fish [79]. The latter is often preferred because there is no concern about contamination with bovine spongiform encephalitis, and because it can be eaten by ethnic groups that do not consume pig or cow. Collagen is hydrolyzed by boiling in the presence of acid (Type A gelatin, p*I* ~ 7-9) or alkaline (Type B gelatin, p*I* ~ 5) [80]. Gelatin is slightly surface active and can act as an emulsifier in oil-in-water emulsions [81]. Surh *et al*. [82] have confirmed that physically stable oil-in-water emulsions could be obtained with fish gelatin at concentrations equal to or above 4.0 wt %. However, these authors observed a small fraction of relatively large droplets (> 10 µm). They explained it by the relatively low surface activity of fish gelatin compared to β-lactoglobulin, for example [82]. Gelatin is currently used as a binder in emulsions containing light sensitive silver halide salts for photographic films [83, 84]. In the pharmaceutical field, gelatin remains mostly used in the manufacture of capsules [85].

Pea proteins

The two major protein components of pea proteins are the storage globulins: 7S (vicilin, 150,000 - 180,000 g/mol) and 11S (legumin, 360,000 g/mol) [86]. They have a regular quaternary structure,

trimeric for vicilin proteins and hexameric for legumin ones. It has been shown that pea proteins are able to decrease the oil-water interfacial tension and contribute to emulsions stabilization by the formation of a rigid membrane at the interface [87, 88]. However, pea proteins stabilized emulsions can be very sensitive to environmental factors such as pH and ionic strength. For this reason, they are usually combined with another emulsifier/stabilizer such as high methoxyl pectin [31, 89]. To the authors' knowledge, no marketed pharmaceutical product containing pea proteins exists.

4. Polysaccharide-stabilized emulsions

Polysaccharides are known for their water-holding and thickening properties because of their hydrophilic character and high molecular weight. Their main emulsion stabilizing effect is *via* viscosity modification or gelation of the aqueous continuous phase, which slows down droplets movement and encounter [90]. They have little surface activity, with some exceptions like gum arabic, chemically modified starch or cellulose derivatives, some naturally occurring galactomannan hydrocolloids (guar gum, fenugreek gum), acetylated pectin from sugar beet, *etc.* [16]. The reported surface activity and emulsifying properties of these compounds is mainly attributed to the presence of a protein fraction, either as a contaminant, or covalently-/physically-bound in a protein:polysaccharide complex [16]. Polysaccharides can be classified in non-adsorbing and adsorbing compounds, respectively.

4.1. Non-adsorbing polysaccharides:

Xanthan gum

Xanthan gum is an anionic polysaccharide produced by the bacterium *Xanthomonas campestris*. Its structure is composed of a β-(1-4)-D-glucose main chain, and side chains each one out of two glucose residues. Side chains are constituted of a α-D-mannose, β-D-glucuronic acid, and β-D-mannose as terminal residues. Pyruvic acid and acetate groups can also be found on terminal mannose residues and non-terminal ones, respectively [91]. Casas *et al*. [92] have reported that depending on fermentation conditions, the contents of acetate and pyruvate groups varies, as well as the average molecular weight

of the gum (from 1.5 x 10^6 to 5 x 10^6 g/mol), influencing the viscosity of its solutions. In water, the stiff polymer chain may exist as a single, double or triple helix that interacts with another chain to form a complex, loosely bound network [93, 94]. This particular structure gives the gum its unusual thickening properties, with a shear-thinning behavior. Viscosity returns to normal immediately on release of shear stress [91]. Xanthan gum is recognized as an excellent stabilizer because of its high low-shear viscosity and strong shear-thinning character [95]. A yield stress is observed in the rheological behavior of emulsions because xanthan gum molecules need to modify their orientation when shear is applied [96]. The gum is thus used to prevent flocculation and creaming in emulsions. Several authors have calculated the minimum yield stress value (τ_0) that an emulsion should have at a given droplet radius. A general way of calculating is reported in Equation 10 [15, 97, 98].

$$\tau_0 \geq Y\Delta\rho gR \qquad \text{Eq. 10}$$

with Y a dimensionless number describing the yield stress effects to gravity ones (6 x 10^{-2} to 7 x 10^{-2}), $\Delta\rho$ the density difference between the two phases, g the gravity acceleration, and R the mean radius of the droplets. Knowing the mean radius allows determination of the necessary minimum yield stress value for stabilizing emulsions. When mixed with guar gum or magnesium aluminium, some synergistic rheological effects on the viscosity occur (increased viscosity or gelation) [99], as well as when mixed with locust bean gum [15].

In the pharmaceutical field, xanthan gum is used as a suspending and stabilizing agent in oral and topical formulations [100], for the production of sustained-release matrix tablets [101-106] or for its mucoadhesive properties [107].

Alginates

Alginates are hydrophilic colloidal carbohydrates extracted with dilute alkali from various species of brown seaweeds (Phaeophyceae), especially *Laminaria hyperborean*, *Macrocystis pyrifera*, and *Ascophyllum nodosum*. The chemical composition of alginates is directly dependent on the biological source, growth, and environmental conditions. The structure of alginate is mainly composed by

alternating blocks of α-(1-4)-L-guluronic acid (G), β-(1-4)-D-mannuronic acid (M), and mixed GM blocks [107]. The p*K*a values of G and M monomers have been reported to be 3.38 and 3.65, respectively, in 0.1 M NaCl [108]. Several authors showed that the stiffness of the three blocks decreased in the order GG > MM > GM [109, 110]. Sodium alginate is a water-soluble polymer that can give highly viscous solutions. It has unique colloidal properties which include thickening, stabilizing, suspending, film forming, gel producing, and emulsion stabilizing [111, 112]. Divalent ions (such as Ca^{2+}) form ionic bridges with glucuronic acid units belonging to different chains [113]. This kind of ionic association, so-called "the egg-box model", leads to the formation of physical gels [114]. Hambleton *et al*. have reported the very promising results obtained with alginate emulsion-based edible films to protect microencapsulated aroma compounds [115]. In the marketed pharmaceutical field, alginates are mainly used as thickeners and gelifiers, in capsules or tablets.

Carrageenans

Carrageenans are key natural gelling polysaccharides extracted from the cell wall and intracellular matrix of numerous species of seaweeds (*Eucheuma*, *Chondrus*, and *Gigartina*). They are a family of sulfated linear polysaccharides [116]. There are three major types of carrageenans: kappa (κ), iota (ι), and lambda (λ)-carrageenans. Their primary structure is composed of alternating disaccharide repeating sequence of β-D-galactose linked at position 3, and α-D-galactose linked at position 4. They differ in the number/position of sulphate groups and the content of 3,6-anhydrogalactosyl ring per disaccharide [117]. Carrageenans are able to form gels on cooling. The gelation process starts by the transition of disordered coils to coaxial double helices [118]. Helix-helix aggregation promoted by cations (such as K^+ or Ca^{2+}) gives rise to thermal hysteresis between sol-gel and gel-sol transitions [119]. Kappa and iota are the main carrageenans able to form gels due to their anhydride bridges allowing conversion of coils in double helix structures. Conversely, λ-carrageenan has no anhydride bridge and is therefore non-gelling [120]. It is possible to insert an anhydride bridge by alkali modification [121] and obtain a theta carrageenan. However, the latter cannot form a gel either, due to sulfation at O(2) of 3-linked residues preventing the formation of the double-helix structure. Doyle *et al*. have recently confirmed the very low viscosity of theta carrageenan solutions [122].

Carrageenans can be used to influence the rheology and skin permeation of micro-emulsion formulation. Valenta and Schultz [123] showed that the presence of carrageenans in microemulsions increased porcine skin permeation of sodium fluorescein because it allowed obtaining the required consistency for a better application on large skin areas. Like alginates, κ- and ι-carrageenans can be used to encapsulate aroma compounds [124, 125]. They are often studied in aqueous solutions in combination with another biopolymer such as β-lactoglobulin [126], pea proteins [127], or locust bean gum [128]. They are also combined with other biopolymers for emulsion stabilization (with β-lactoglobulin for example) [22, 129, 130]. Stable emulsions can be obtained with only 0.1-0.5 w/v % carrageenan concentrations [131]. Carrageenans are used in many nonparenteral dosage forms such as suspensions, emulsions, gels, lotions, eye drops, suppositories, tablets, and capsules [131].

Hyaluronan

Hyaluronan is an anionic linear biopolymer composed of alternating disaccharide units of D-glucuronic acid and *N*-acetyl-D-glucosamine with β(1-3) and β(1-4) linkages [132]. It is ubiquitous in the human body (extracellular matrix, synovial fluid, umbilical cord) with excellent physicochemical and biological properties: for instance it is biodegradable, biocompatible, non-toxic, and non-immunogenic [133]. Its molecular weight ranges from 1×10^3 to 1×10^7 g/mol [134]. In solution, hyaluronan has a stiffened random coil structure with little tendency to form cross-linked gels [134] and displays a shear-thinning behavior [135]. It has been reported that many proteins can bind to hyaluronan (hyaladherins) [136], influencing its conformation [137]. Hyaluronan is used in osteoarthritis, ocular surgery, plastic surgery, tissue engineering, *etc*. [134]. It is also increasingly studied for targeted specific and long-acting delivery of various biopharmaceutics such as protein, peptide, and nucleotide therapeutics [134]. Hyaluronic acid is often used in emulsions as the first step of hydrogel particles or microspheres synthesis. These hydrogel particles can then be used as drug delivery systems [138-140]. Recently, hyaluronic acid has been used as a gel that contained vasoactive intestinal peptide-loaded liposomes [141]. Interactions between hyaluronic acid chains and liposomes increased the viscosity of the gel and enhanced its elasticity. This resulted in a delayed release of the vasoactive intestinal peptide for the treatment of uveitis.

Chitosan

Chitosan is a naturally occurring polysaccharide, commonly obtained from the alkali or enzymatic deacetylation of chitin. This latter is found in the cuticles of crustacean, insects, molluscs, and cell walls of microorganisms. Chitosan structure is composed of glucosamine and *N*-acetylglucosamine copolymers. It is positively charged in acidic aqueous solution due to the protonation of its amino residues, which have a p*K*a value of 6.2 - 7.0 [142]. Various molecular weights can be found: (50 - 2,000) x 10^3 g/mol [143]. Chitosan is widely investigated for many different applications, including drug delivery systems, due to its biodegradability, biocompatibility, bioadhesivity, antimicrobial activity, and film forming properties [144-146]. Its cationic nature enables chitosan to strongly interact with the oppositely charged lipids of biomembranes. It is an amphiphilic polyelectrolyte that combines both electrosteric and viscosifying stabilization mechanisms in emulsions [147]. Chitosan is a very good viscosity-enhancing agent in an acidic environment, owing to its high molecular weight and linear unbranched structure. It has a shear-thinning behavior [148]. Skaugrud reported that the viscosity of chitosan solutions increased with its concentration and degree of deacetylation, and decreased with the temperature [149]. Payet and Terentjev showed that an aqueous chitosan solution was able to emulsify paraffin oil [150]. They evidenced chitosan adsorption at the air-water and oil-water interfaces with limited interfacial tension decrease, and formation of a dense network of polyelectrolytic brushes in the continuous phase. They observed that chitosan chains reduced the oil droplet diffusion by forming a rigid elastic network in the aqueous phase thus improving emulsion stability [150]. Its low surface properties compared to its viscosifying ones made us classify chitosan in the non-adsorbing polysaccharide category. Chitosan can be applied in controlled drug delivery systems [151, 152]. Vasconcellos *et al*. for example, successfully produced papain-loaded chitosan microparticles for controlled release applications [153]. Chitosan was also proposed as a component of muco-adhesive dosage forms and in gene delivery systems [154]. It allowed, on its own or in combination with a surfactant, the stabilization of simple and multiple emulsions [155-159]. However, chitosan is not in any marketed drugs because its safety as a pharmaceutical excipient has not been

assessed yet [143]. Nevertheless, chitosan is currently used in dietary preparations for obesity, and has been recognized as safe in the US for the use in foods [143].

4.2. Adsorbing polysaccharides:

Gum arabic

Gum arabic is the most well known of all polysaccharide emulsifiers in food industry. It is widely used in soft drinks for its emulsifying properties [16, 160-162]. It is exudated from the *Acacia senegal* tree [163]. Gum arabic is a hetero-polysaccharide containing both protein and polysaccharide subunits. It is composed of three fractions depending on the relative protein-to-polysaccharide content: the arabinogalactan (AG) (80-90 wt % of the total gum), the glycoprotein (GP) (2-4 wt % of the total gum), and the arabinogalactan-protein (AGP) (10-20 wt % of the total gum) fractions [164]. The molar mass of the entire gum can vary from 3.0×10^5 to 5.8×10^5 g/mol depending on its origin and tree age [165]. Aqueous solutions of gum arabic have a rather low viscosity (100 mPa.s for a 30 % w/v solution at 20 °C [166]) compared to those of other polysaccharides having similar molecular masses. Its rheological behavior is considered as Newtonian up to 20 to 30 wt % gum concentrations [167]. The AGP fraction is considered to be responsible for the emulsifying properties of gum arabic [168-171]. The association of polysaccharidic blocks along the peptidic chain gives a "wattle blossom"-type structure and confers to the macromolecule an amphiphilic character allowing its adsorption at the air-water and oil-water interfaces [16, 165]. Indeed, the protein component of the gum would embed in the air or oil phase while the carbohydrate component would extend into the hydrophilic phase [161, 170]. In emulsion systems, the adsorption of the gum at the oil-water interface allows steric hindrance preventing the droplets to come in closer contact. Moreover, the gum being negatively charged above pH 2 [172], it also allows electrostatic stabilization of emulsions. Although its surface activity is considered as rather low when compared to typical protein emulsifiers [162], we recently showed that after sufficient adsorption time, gum arabic lowered the interfacial tension to the same extent as β-lactoglobulin [49]. In order to generate stable sub-micron-sized droplets, it is necessary to use a rather high gum-to-oil weight ratio, *i.e.* approximately 1:1 [162].

Gum arabic is used in various delivery systems. Recently, Avadi *et al*. obtained promising results in the development of insulin-loaded nanoparticles based on ionic gelation of chitosan and gum arabic for oral delivery [173]. In another study, gum arabic was used to encapsulate and control the release of endoglucanase [174]. Lu *et al*. also used the gum as an osmotic, suspending, and expanding agent in an osmotic tablet system [175].

It is reported that concentrations of gum arabic are of 10-20 wt % when used as an emulsifying agent, 10-30 wt % as a pastille base, 5-10 wt % as a suspending agent, and 1-5 wt % as a tablet binder [166].

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)

HPMC, also named Hypromellose, is part of an interesting group of surface active cellulose derivatives which have a strong tendency to accumulate at the oil-water interface [176]. It is a partly O-methylated and O-(2-hydroxypropylated) cellulose. HPMC finds various applications in pharmaceutical and food industries where it is used for controlled drug release, control of texture and rheological properties of dispersions, emulsification, *etc*. The use of HPMC as an emulsifier for oil-in-water emulsions was first described by Baniels and Barta [177]. The surface activity of this macromolecule is due to its hydrophobic (methyl) and hydrophilic (hydroxypropyl) groups distributed along the cellulose backbone, allowing its adsorption at fluid interfaces and the lowering of the interfacial tension [178-180]. When adsorbed, its conformation may be described according to the train-loop-tail model: hydrophobic segments along the polymer chain attach to the interface and form trains which are separated by hydrophilic loops and tails that extend into the aqueous phase [179]. Another pharmaceutical use of HPMC (0.45-1 w/w %) has been reported in vehicles for eye drops and artificial tear solutions [181]. In oral pharmaceutical products, it is primarily used as a tablet binder [182], film-coating [183, 184], or matrix for extended-release tablets [185, 186]. In addition, HPMC is an alternative to gelatin in the manufacturing of hard capsules [181].

Galactomannans

Galactomannans are abundant plant polysaccharides that occur as energy reserves in certain leguminous seeds. They are rather rigid hydrophilic biopolymers with a polymannose backbone (β-(1-4)-D-mannose) and grafted α-(1-6)-D-galactose units. The mannose to galactose (M/G) ratio is dependent on the galactomannan source and environmental growth conditions. The M/G ratios of fenugreek gum, guar gum, tara gum, and locust bean gum are of about 1, 2, 3, and 4, respectively [187, 188]. They can form highly viscous solutions even at low concentrations (for instance, a viscosity of 4.86 Pa.s for a 1 w/v % guar gum dispersion) [189]. Galactomannans are thus generally used as thickening, water-holding, and stabilizing agents. The rheological behavior of these solutions is usually non-Newtonian. Their shear-thinning behavior has been described as following the Cross model (Equation 11) [190, 191].

$$\tau = \left[\eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + (\beta\dot{\gamma})^p} \right] \dot{\gamma} \qquad \text{Eq. 11}$$

with τ the shear stress, $\dot{\gamma}$ the shear rate, η_0 and η_∞ the zero and infinite shear viscosities, β and p the time and rate constants.

Several researchers [187, 192-194] have proposed some of these galactomannans for emulsion stabilization. Their interfacial tension lowering properties are assumed to be due to the presence of a small fraction of protein closely associated with the polysaccharide structure, as in gum arabic [16]. In the pharmaceutical field, galactomannans can be used in solid-dosage forms as binder and disintegrant. Coviello *et al*., for example, used guar and locust bean gums to form a tablet matrix, and studied the release of model molecules [195]. They showed that it was possible to modulate the release of the molecules from this galactomannan matrix.

Pectin

Pectin is a complex polysaccharide extracted from the plant cell wall, especially citrus peels, apple pomace, and sugar beet pulps. Its structure is mainly composed of esterified D-galacturonic acid

residues in an α-(1-4) chain, and depends on the pectin source and extraction process. This backbone is then regularly branched with rhamnogalacturonan segments. Pectin is mainly used for its gelling and dispersion stabilizing properties. In addition, it also has emulsifying properties, and as early as 1927, its use in vegetable oils emulsions and mayonnaise was suggested [196]. Pectin is able to produce fine and stable emulsions [197]. Since it contains protein residues, the model of its association to oil droplets may be similar to that of gum arabic [16, 197]. Pharmaceutical applications of pectin can also be found in formulations for the management of diarrhea, constipation, and obesity [198]. Pectin has also been studied in gel formulations for oral sustained release of Ambroxol [199], and in gel beads for controlled drug delivery within the gastrointestinal tract [200].

5. Protein-polysaccharide stabilized emulsions

The combination of the advantages of proteins and polysaccharides to stabilize emulsions is increasingly studied. Association of the fast adsorption of proteins and good stability of large polymers creates emulsions with improved stability and functionality. The development of surface active protein:polysaccharide complexes can be achieved either by covalent bonding or electrostatic interactions. In the latter case, it is important to choose the polymers so that the protein and the polysaccharide have opposite charges. Another way to stabilize emulsions is to combine protein and polysaccharide properties without developing any interactions between the two biopolymers.

Covalent complexes

An extreme type of protein-polysaccharide interaction occurs when a covalent linkage is formed between the two biopolymers in order to create a new amphiphilic biopolymer with improved surface properties. Protein-polysaccharide conjugates can be formed without using any chemicals, generally by linking protein ε-amino-groups to the reducing end carbonyl groups of polysaccharides through controlled Maillard reaction (slow dry heating) [201]. The newly formed conjugate exhibits substantially improved solubility and emulsifying properties compared to the protein (*i.e.* β-lactoglobulin + dextran [202, 203], whey protein isolate + maltodextrin [204], sodium caseinate + maltodextrin [205]) and polysaccharide alone. Furthermore, the adsorbed protein layer seems to be

protected against destabilization under unfavorable environmental conditions (*i.e.* heating, freezing, high electrolyte concentrations, *etc.*). O'Regan and Mulvihill, for example, have reported improved emulsion stability after a 7-day storage at 45 °C when emulsions were stabilized by a sodium caseinate-maltodextrin conjugate compared to sodium caseinate alone [205]. The large size of the bound polysaccharide generates long-range steric repulsion between emulsion droplets surfaces. A detailed presentation of the different experimental studies on protein-polysaccharide conjugates published over the 2004-2007 period has been given by Dickinson [13].

Non-covalent complexes

A more common situation is when protein-polysaccharide complexation arises from non-covalent association, mainly driven by attractive electrostatic interactions. Numerous studies have shown improved emulsion stability, attributable to the presence of associative interfacial interactions between protein and polysaccharide. The main studies based on this stabilization mechanism are gathered in Table I. Two alternative procedures for emulsion formulation can be used. The first one consists in preparing a mixed solution of both biopolymers, and use the resulting protein:polysaccharide complex to emulsify the emulsion [206, 207]. The second one, named the layer-by-layer (LBL) electrostatic deposition technique, consists in formulating a primary protein stabilized emulsion and then in adding the polysaccharide. Complexation occurs directly onto the droplet surface through attractive electrostatic interactions. This leads to the formation of a second layer and allows surface charge reversal [208]. This last step can be repeated using oppositely charged biopolymers to increase the number of layers coating on oil droplets. It seems important to start by a protein layer because of its rapid adsorption and interfacial tension lowering [209]. Under certain physicochemical conditions, this multilayer coating displays a better stability to environmental stresses such as pH, ionic strength, heating, chilling, freezing, and dehydration, than conventional oil-in-water emulsions with a single interfacial layer [22, 33, 210]. The detailed principles of this LBL method can be found in the review of Guzey and McClements [21]. The LBL deposition of biopolymers at oil droplets surfaces seems to be easily adapted to production conditions in industrial formulations because of fastness, simplicity, and relative cheapness of this method [211]. However, in order to achieve stable and homogeneous

multilayered stabilized emulsions, it is necessary to fully control the system composition and preparation conditions (protein:polysaccharide ratio, pH, ionic strength, biopolymer concentration, *etc*.). For example, the presence of free biopolymer molecules in the aqueous phase during addition of the oppositely charged coating biopolymer may lead to the formation of complexes in the solution bulk. These complexes often provide bridging flocculation and strongly reduce emulsion stability [212]. On the contrary, they can also lead to depletion flocculation because of the too high amount of polysaccharide. Emulsion stability also depends on the protein interfacial coverage: if the interface is not saturated by protein molecules, the added polysaccharide is then able to anchor at the globule surface. This co-adsorption modulates the interfacial stability.

Without complexation

This last stabilization mechanism consists in using a surface active biopolymer (*i.e.* protein), and in adding a polysaccharide that will not interact with the adsorbed biopolymer but will only enhance the viscosity of the continuous aqueous phase. The protein is used to allow formation of small droplets during the emulsification process, and the polysaccharide to generate an extended thickening network, which induces high viscosity at low shear rate, thus slowing down droplets motion. The good obtained stability can also be explained by a limited thermodynamic compatibility between the two biopolymers, resulting in enhanced interfacial protein adsorption. Many examples of such protein/polysaccharide associations can be found in the literature among which sodium caseinate + xanthan gum [223, 224], whey protein isolate + xanthan gum [225], whey protein isolate + flaxseed gum [226], and sodium caseinate + locust bean gum [227].

Table I: Main published experimental studies on protein-polysaccharide electrostatic combination to stabilize emulsions.

	Protein$_1$	Protein$_2$ or Polysaccharide$_1$	Protein$_3$ or Polysaccharide$_2$	Experimental conditions[a] (pH; concentrations; pr:ps ratio; incorporation order)	References
Bilayer stabilization	Whey Protein Isolate	Flaxseed gum	-	pH 3.5; 0.6 w/v % pr, 0-0.33 w/v % ps; pr_1 then ps_1	[208]
				pH 3.5, 7; 0.6 w/v % pr, 0-0.33 w/v % ps; pr_1 then ps_1	[213]
		Chitosan	-	pH 5.5, 6; 0.1 % ps; 0:1, 2.5:1, 5:1, 7.5:1, 10:1 ratios; pr_1 and ps_1 premix	[206]
		Pectin	-	pH 2-8; 4:0.5 w/w % solution; pr_1 and ps_1 premix	[207]
		Xanthan gum	-	pH 7; 0.5-6 wt % pr, 0.5 wt % ps; pr_1 then ps_1	[214]
		Galactomannans	-	pH 7; 5 wt % pr; 4:0.5 (wt/wt) ratio; pr_1 then ps_1	[214]
		κ-carrageenan	-	pH 4.5-7.5; 0.5, 3 w/w % pr, 0-0.4 w/w % ps; pr_1 and ps_1 premix	[215]
		Gum arabic	-	pH 7; 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 (1-10 wt %) ratios; pr_1 and ps_1 premix and pr_1 then ps_1	[209]
		Gelatin	-	pH 3.4, 6.8; 1 wt % pr; 1:1; pr_1 then pr_2	[79]
	β-lactoglobulin	Pectin	-	pH 7 → 4; 0.225 wt % pr, 0.2 wt % ps; pr_1 then ps_1	[33]
				pH 3, 7; 0.225 wt % pr, 0.2 wt % ps; pr_1 then ps_1	[216]
				pH 3; 0.45 wt % pr, 0-0.22 wt % ps; pr_1 then ps_1	[217]
		Carrageenans	-	pH 3.5, 6; 0.5 wt % pr, 0-0.15 wt % ps; pr_1 then ps_1	[130]
		ι-carrageenan	-	pH 3.4, 4, 6; 3:7-3:2 (0.5 wt %) ratios; pr_1 then ps_1	[218]
		Alginate	-	pH 3-7; 0.45 wt %; 0-0.5 wt %; pr_1 then ps_1	[219]
		Gum arabic	-	pH 4.2; 0.5, 2.5 w/w %; 2:1, 1:2; pr_1 and ps_1 premix, pr_1 then ps_1, ps_1 then pr_1	[49]

	Sodium caseinate	Pectin	-	pH 7; 0.5 % pr; 0-0.2 % ps; pr_1 then ps_1	[220]
		Gellan gum	-	pH 5.4; 1 % pr; 0.03, 0.05 % ps; pr_1 and ps_1 premix	[221]
		Dextran sulfate	-	pH 6; 0.5 wt % pr, 0.1-1 wt % ps; pr_1 and ps_1 premix and pr_1 then ps_1	[222]
	Pea protein	Pectin	-	pH 2.4; 0.25 wt % pr, 0.2 wt % ps; pr_1 then ps_1	[31]
Trilayer stabilization	β-lactoglobulin	ι-carrageenan	Gelatin	pH 6; 0.5 w/w % pr_1, 0.1 w/w % ps_1, 0.2 w/w % pr_2; pr_1 then ps_1 then pr_2	[22]
		Pectin	Chitosan	pH 4; 0.1125 % pr_1, 0.1 % ps_1, 0.15 % ps_2; pr_1 then ps_1 then ps_2	[33]
		Chitosan	Pectin	pH 3-7; 0.05-0.1 wt % pr_1, 0-0.1 wt % ps_1, 0-0.25 wt % ps_2; pr_1 then ps_1 then ps_2	[32]
		Chitosan	Alginate	pH 3-7; 0.05-0.1 wt % pr_1, 0-0.1 wt % ps_1, 0-0.25 wt % ps_2; pr_1 then ps_1 then ps_2	[32]

[a] **pr**: protein; **ps**: polysaccharide; **pr and ps premix**: pr and ps were mixed in solution prior to emulsion formulation; **pr then ps**: ps was added after emulsion formulation with pr; **ps then pr**: pr was added after emulsion formulation with ps. **1** stands for the first pr or ps, **2** stands for the second one, and **3** for the third one.

6. Comparison between biopolymers and small surfactants

It is important to make some general comparisons between the stabilization mechanisms of small surfactants and biopolymers. Because of their smaller size and lower molecular weight, surfactants diffuse, adsorb, and stabilize an interface more rapidly than biopolymers. The small surfactant size allows a higher droplet curvature (reduced steric hindrance) and globules can generally be smaller than with biopolymers. Biopolymer stabilized emulsions have droplet sizes in the order of 1 µm or more, with either high or low polydispersities. Thus, formulation of micro- and nano-emulsions with biopolymers only seems difficult. However, their use enables an increase in emulsion stability by modifying the interfacial rheology or by using the layer-by-layer deposition for example, to protect globules against environmental stresses. Another interest of biopolymer is that thanks to their viscosifying properties, they simultaneously stabilize emulsions and control their texture.

7. Discussion: promising applications of biopolymers for the stabilization of pharmaceutical emulsions

Different biopolymer stabilization techniques have been described, demonstrating the possibility to formulate stable "clean labelled" simple and multiple emulsions. In the modern context of increasing naturalness values, environmental preoccupations, and sustainable development, biopolymers such as proteins and polysaccharides could be a good alternative to synthetic surfactants in some pharmaceutical formulations, especially for topical applications.

As previously described, various naturally occurring biopolymers can be used either alone or in combination for emulsion stabilization. The association of proteins and polysaccharides properties to stabilize emulsions is increasingly studied in order to enhance emulsion stability. Depending on the biopolymer association method (covalent, electrostatic, no interaction), the obtained properties are different and open various promising application perspectives. Covalent and electrostatic protein:polysaccharide associations protect emulsions against destabilization under unfavorable environmental conditions (*i.e.* heating, freezing, high electrolyte concentrations, lipid oxidation, *etc*.) [21, 22, 130, 205, 210]. The most promising stabilization technique is probably the layer-by-layer

deposition. This method offers many perspectives regarding the targeted delivery of oil soluble compounds. A potential benefit of multilayer emulsions as delivery systems is that they can be formulated entirely from natural excipients (oil, proteins, polysaccharides) using simple processing operations (homogenization, mixing). These biopolymer coatings can be designed to improve the stability of delivery systems to environmental stresses, to protect encapsulated compound from chemical degradation, and to release encapsulated components in response to specific environmental triggers. For example, Li and co-workers [32] have shown that the physical stability of oil droplets coated by multilayer biopolymers is largely determined by the electrical characteristics of the outer biopolymer layer. They found that if a delivery system must remain stable under acid conditions (*i.e.* in the stomach), but breakdown at neutral pH (*i.e.* in the intestine), then a cationic outer coating of chitosan could be chosen. On another hand, if a delivery system must remain stable under neutral conditions but breakdown at acid pH, then an anionic outer layer of alginate or pectin could be used. This shows that it is possible to achieve a site-specific delivery of an oil soluble compound contained in an emulsion. A review on the use of structured emulsion-based delivery systems to control the digestion and release of lipophilic components has recently been written by McClements and Li [228]. This knowledge can be used to select the most appropriate emulsion-based delivery system for specific pharmaceutical applications, such as encapsulation, controlled digestion, and targeted release.

Grigoriev *et al*. also used the LBL technique to encapsulate an emulsion. They performed a layer-by-layer deposition on a liquid core using synthetic polymers such as poly(sodium 4-styrenesulfonate and poly(diallyldimethylammonium chloride) to form loaded micro- and nano-containers [9]. The droplet emulsion sizes were in the order of 2 µm. This novel approach is rather general and could be extended to biopolymers and to the encapsulation of a broad range of pharmaceutical emulsions comprised of various hydrophobic substances and oil-soluble compounds.

It is important to note that the use of natural polymers also raises some challenging issues that will have to be addressed before their current use.

First, the variability of biopolymer composition depending on its source and origin is of importance and may be a problem for the reproducibility of the formulations. However, this issue has already been addressed for some polymers such as HPMC, pectin, gelatin, *etc.*, which are already available under pharmaceutical grades.

Second, most of these polymers are currently used in the food industry and their ingestion is safe. However, others, such as chitosan or hyaluronan, will need to be further studied and evaluated as to oral ingestion safety. The safety of chitosan for its use in food has already been recognized in the U.S. [143]. These safety and risk-benefit preoccupations will also have to be taken into account for other delivery routes (dermatologic, ocular, colonic, rectal, *etc.*) when these natural biopolymers will be part of formulations.

Third, as already mentioned, the obtained droplets sizes seem generally to be in the order of 1 µm or more with either broad or narrow distributions. This will necessarily also influence the delivery route as it would not be safe to use them for parenteral administration. For this reason, biopolymer stabilized emulsions seem to be better designed for oral or topical administration. Furthermore, the mucoadhesive properties of some biopolymers such as chitosan and hyaluronan are of interest for these routes of administration, including vaginal and rectal ones.

Finally, because of their organic origin, there are bacteriological and storage concerns. The addition of antimicrobial agents may be necessary. For example, benzoic acid, sodium benzoate, methyl-and propyl-parabens are currently used in the pharmaceutical field [166]. However, the use of these additives is incompatible with the respect of sustainable development concerns. Another solution consists in lyophilizing [229, 230] or spray-drying [231] emulsions to avoid their destabilization upon long-term storage. Starches, gum arabic, whey-protein isolate, gelatin, and their associations have shown suitable properties for multi-layered shell formation by spray-drying [231]. This process can thus enable the encapsulation of oil soluble pharmaceutical compounds. However, heating and evaporation of the solvent necessary for the sedimentation/crystallization of polymers layers may also cause chemical transformations in the core. That is why another currently studied method is the

formation of the solid layers around the oil droplets by chemical reactions. Low methoxy pectin microcapsules with hydrophobic core can thus be formed by interfacial reaction [232]. In this study, the authors promoted interfacial film formation by using either anionic sodium dodecyl sulphate (physical cross-linking interaction) or cationic benzalkonium chloride (electrostatic interaction). The obtained microcapsules were smaller than 3 µm. Again, this approach could be extended to biopolymers.

Due to the versatility and large number of available biopolymers, protein and/or polysaccharide stabilized emulsions appear to be a very promising approach for pharmaceutics in the same way as they already are in the food industry. However, further research work is still needed to meet the specific requirements of this new field of applications.

References

[1] Tadros TF, Vincent B. Emulsion Stability. In: Becher P. editor. Encyclopedia of emulsion technology vol 1. New York: Marcel Dekker; 1983. p. 129-285.

[2] Tadros TF. Emulsion science and Technology: A general Introduction. In: Tadros TF. editor. Emulsion Science and Technology. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009. p. 1-56.

[3] Grossiord JL, Sellier M. W/O/W multiple emulsions: a review of the release mechanisms by break-up of the oily membrane. STP Pharma Sciences 2001;11(5):331-339.

[4] Friberg SE, Venable RL. Microemulsions. In: Becher P. editor. Encyclopedia of emulsion technology vol 1. New York: Marcel Dekker; 1983. p.287-336.

[5] Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. Advances in Colloid and Interface Science 2004;107:125-155.

[6] Solans C, Pons R, Kunieda H. Overview of basic aspects of microemulsions. In Solans C, Kunieda H. editors. Industrial applications of microemulsions vol 66. New York: Marcel Dekker; 1997. p.1-19.

[7] Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. Current Opinion in Colloid and Interface Science 2005;10:102-110.

[8] Becher P. Encyclopedia of emulsion technology vol 2. New York: Marcel Dekker; 1983.

[9] Grigoriev DO, Bukreeva T, Möhwald and Shchukin DG. New Method for fabrication of Loaded Micro- and Nanocontainers: Emulsion Encapsulation by polyelectrolyte Layer-by-Layer Deposition on the Liquid Core. Langmuir 2008;24:999-1004.

[10] Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. Handbook of Pharmaceutical Excipients 5th edition. London: Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association; 2006.

[11] Möbius D, Miller R. Proteins at Liquid Interfaces. Amsterdam: Elsevier; 1998.

[12] McClements DJ. Protein-stabilized emulsions. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2004;9:305-313.

[13] Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. Food Hydrocolloids 2009;23:1473-1482.

[14] Weiss J, Scherze I, Muschiolok G. Polysaccharide gel with multiple emulsion. Food Hydrocolloids 2005;19:605-615.

[15] Benna-Zayani M, Kbir-Ariguib N, Trabelsi-Ayadi M, Grossiord JL. Stabilization of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2008;316:46-54.

[16] Dickinson E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids 2003;17:25-39.

[17] Garti N, Reichman D. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. Food microstructure 1993;12:411-426.

[18] Dickinson E. Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes. In: Stephen AM, editor. Food polysaccharides and their applications. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 501-515.

[19] Dickinson E. Emulsification and emulsion stabilization with protein-polysaccharide complexes. In: Williams PA, & Phillips GO, editors. Gums and stabilizers for the food industry-14. Cambridge, UK: Royal Society; 2008. p. 221-232.

[20] Dickinson E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. Soft Matter 2008;4:932-942.

[21] Guzey D, McClements DJ. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. Advances in Colloid and Interface Science 2006;128:227-248.

[22] Gu YS, Decker EA, McClements DJ. Application of multi-component biopolymer layers to improve the freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions: β-lactoglobulin-ι-carrageenan-gelatin. Journal of Food Engineering 2007;80:1246-1254.

[23] Thanasukarn P, Pongsawatmanit R, McClements DJ. Utilization of layer-by-layer interfacial deposition technique to improve freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions. Food Res. Int. 2006;39(6):721-729.

[24] Schubert H, Engel R. Product and formulation engineering of emulsions. Chemical Engineering Research and Design 2004;82(A9):1137-1143.

[25] Walstra P. Physical principles of emulsion science. In: Blanshard J, Lillford PJ, editors. Food Structure and Behaviour. Academic Press: London; 1987. p. 87-106.

[26] McClements DJ. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. Food Hydrocolloids 2000;14:173-177.

[27] Damodaran S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. Journal of Food science 2005;70(3):54-66.

[28] Myers D. Surfaces, Interfaces and Colloids principles and applications. USA: Wiley-VCH; 1999.

[29] Groeneweg F, van Voorst Vader F, Agterof WGM. The dynamic stability of w/o emulsions prepared with vegetable oil. Chemical Engineering Science 1993;48(2):229-238.

[30] Suttiprasit P, Al-Malah K, McGuire J. On evaluating the emulsifying properties of protein using conductivity measurements. Food Hydrocolloids 1993;7(3):241-253.

[31] Gharsallaoui A, Saurel R, Chambin O, Cases E, Voilley A, Cayot P. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilized oil-in-water emulsions. Food Chemistry 2010;122:447-454.

[32] Li Y, Hu M, Xiao H, Du Y, Decker EA, McClements DJ. Controlloing the functional performance of emulsion-based delivery systems using multicomponent biopolymer coatings. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2010;76:38-47.

[33] Guzey D, McClements DJ. Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by beta-lactoglobulin-pectin and beta-lactoglobulin-pectin-chitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique. Food Biophysics 2006;1(1):30-40.

[34] Ogawa S, Decker EA, McClements DJ. Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin−Chitosan−Pectin Mutilayered Membranes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004;52(11):3595-3600.

[35] Brittain HG. Particle-size distribution, Part I: Representation of particle shape and size. Pharm. Technol. 2001;25(12)38-45.

[36] Tcholakova S, Denkov ND, Sidzhakova D, Ivanov IB, Campbell B. Effects of electrolyte concentration and pH on the coalescence stability of β-lactoglobulin emulsions: experiment and interpretation. Langmuir 2005;21:4842-4855.

[37] Mengual O, Meunier G, Cayré I, Puech K, Snabre P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurements for concentrated emulsion and suspension instability analysis. Talanta 1999;50:445-456.

[38] Lemarchand C, Couvreur P, Vauthier C, Costantini D, Gref R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. International Journal of Pharmaceutics 2003;254:77-82.

[39] Tadros TF. Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 1994;91:39-55.

[40] Hunter RJ. Transport properties of suspensions. In: Hunter RJ editor. Foundation of Colloid Science, vol 1. New York: Oxford University Press; 1986. p. 494-536.

[41] Laplante S, Turgeon SL, Paquin P. Effect of pH, ionic strength, and composition on emulsion stabilising properties of chitosan in a model system containing whey protein isolate. Food Hydrocolloids 2005;19:721-729.

[42] Jenkins P, Ralston J. The adsorption of a polysaccharide at the talc-aqueous solution interface. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 1998;139:27-40.

[43] Chatelier RC, Minton AP. Adsorption of globular proteins on locally planar surfaces: models for the effect of excluded surface area and aggregation of adsorbed protein on adsorption equilibria. Biophysical Journal 1996;71:2367-2374.

[44] Ye A. Surface protein composition and concentration of whey protein isolate-stabilized oil-in-water emulsions: Effect of heat treatment. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2010;78:24-29.

[45] Euston SR, Finnigan SR, Hirst RL. Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. Food Hydrocolloids 2000;14:155-161.

[46] Tcholakova S, Denkov ND, Ivanov IB, Campbell B. Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. Advances in Colloid and Interface Science 2006;123-126:259-293.

[47] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976;72:248-254.

[48] Benichou A, Aserin A, Lutz R, Garti N. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. Food Hydrocolloids 2007;21:379-391.

[49] Bouyer E, Mekhloufi G, Le Potier I, du Fou de Kerdaniel T, Grossiord J-L, Rosilio V, Agnely F. Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β-lactoglobulin and gum arabic. Journal of Colloid and Interface Science 2011;354:467-477.

[50] Bos MA, Vliet TV. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. Adv Colloid Interface Sci. 2001;91:437-471.

[51] Laza-Knoerr A, Huang N, Grossiord J-L, Couvreur P, Gref R. Interfacial rheology as a tool to study the potential of cyclodextrin polymers to stabilize oil–water interfaces. J. Incl Phenom Macrocycl Chem. DOI 10.1007/s10847-010-9805-5.

[52] Binks BP, Fletcher PDI, Paunov VN, Segal D. Equilibrium and Dynamic Adsorption of $C_{12}E_5$ at the Air-Water Surface Investigated Using Ellipsometry and Tensiometry. Langmuir 2000;16:8926-8931.

[53] Castellani O, Gaillard C, Vié V, Al-Assaf S, Axelos M, Phillips GO, Anton M. Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 3 – Adsorption and structural properties at the air-water surface. Food Hydrocolloids 2010;24:131-141.

[54] Bylaite E, Nylander T, Venskutonis R, Jönsson B. Emulsification of caraway essential oil in water by lecithin and β-lactoglobulin: emulsion stability and properties of the formed oil-aqueous interface. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2001;20:327-340.

[55] Binks BP, Clint JH, Dyab AKF, Fletcher PDI, Kirkland M, Whitby C. Ellipsometric study of monodisperse silica particles at an oil-water interface. Langmuir 2003;19:8888-8893.

[56] Russev SC, Arguirov TVl, Gurkov TD. β-Casein adsorption kinetics on air-water and oil-water interfaces studied by ellipsometry. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2000;19:89-100.

[57] Norde W. Colloids and interfaces in life Sciences. New York: Marcel Dekker; 2003.

[58] Razumovsky L, Damodaran S. Surface activity-Compressibility relationship of proteins. Langmuir 1999;15:1392-1399.

[59] Graham DE, Phillips MC. Proteins at liquid interfaces. Journal of Colloid and Interface Science 1979;70:403-414, 415-427.

[60] Dickinson E. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1999;15:161-176.

[61] Wilde P, Mackie A, Husband F, Gunning P, Morris V. Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. Adv. Colloid Interface Sci. 2004;108-109:63-71.

[62] Demitriades K, Coupland JN, McClements DJ. Physico-chemical properties of whey protein-stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. Journal of Food Science 1997;62:462-467.

[63] Mitidieri FE, Wagner JR. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. Food Res. Int.2002;35:547-557.

[64] Dickinson E, Davies E. Influence of ionic calcium on stability of sodium caseinate emulsions. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1999;12:203-212.

[65] Dickinson E. Colloid science of mixed ingredients. Soft Matter 2006;2:642-652.

[66] Bantchev GB, Schwartz DK. Surface shear rheology of β-casein layers at the air/solution Interface: Formation of a two-Dimensional physical gel. Langmuir 2003;19:2673-2682.

[67] Gau C-S, Yu H, Zografi G. Surface viscoelasticity of β-casein monolayers at the air/water interface by Electrocapillary Wave diffraction. Journal of Colloid and Interface Science 1994;162:214-221.

[68] Dalgleish DG. Adsorption of protein and the stability of emulsions. Trends in Food Science & Technology 1997;8:1-6.

[69] Agboola SO, Dalgleish DG. Calcium induced destabilization of oil-in-water emulsions stabilized by caseinate or by β-lactoglobulin. Journal of Food Science 1995;60:399-404.

[70] Dickinson E. Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. Journal of Dairy Science 1997; 80:2607-2619.

[71] Kim HJ, Decker EA, McClements DJ. Role of postadsorption conformation changes of beta-lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH. Langmuir 2002;18:7577-7583.

[72] Paulsson M, Dejmek P. Surface film pressure of β-lactoglobulin, α-lactalbumin and bovine serum albumin at the air/water interface studied by wilhelmy plate and drop volume. Journal of Colloid and Interface Science 1992;150(2):394-403.

[73] Wüstnek R, Moser B, Muschiolik G. Interfacial dilational behaviour of adsorbed β-lactoglobulin layers at the different fluid interfaces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1999;15:263-273.

[74] Peter T, Jr, In: Putnam FW editor. The Plasma Proteins. Academic Press, New York; 1975. p. 133.

[75] Ward AJI, Regan LH. Pendant drop studies of adsorbed films of BSA. I. Interfacial tensions at the Isooctane/water interface. Journal of Colloid and Interface Science 1980;78(2):389-394.

[76] Serrien G, Geeraerts G, Ghosh L, Joos P. Dynamic surface properties of adsorbed protein solutions: BSA, casein and buttermilk. Colloids and surfaces 1992;68:219-233.

[77] Burgess DJ, Ozlen Sahin N. Interfacial rheological and tension properties of protein films. Journal of Colloid and Interface Science 1997;189:74-82.

[78] http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm?menu_info_medicaments=rechercheMulti page visited on 12/07/10.

[79] Ledward DA. Gelation of gelatin. In: Mitchel JR & Ledward DA editors. Functional properties of food macromolecules. Elsevier: London; 1986.

[80] Taherian AR, Britten M, Sabik H, Fustier P. Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. Food Hydrocolloids 2010, doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.08.007.

[81] Lobo L. Coalescence during emulsification; 3. Effect of gelatin on rupture and coalescence. Journal of Colloid and Interface Science 2002;254:165-174.

[82] Surh J, Decker EA, McClements DJ. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. Food hydrocolloids 2006;20:596-606.

[83] Lourenço MJL, Sampaio JP. Microbial deterioration of gelatin emulsion photographs: differences of susceptibility between black and white and colour materials. International Biodeterioration and Biodegradation 2009;63:496-502.

[84] Sheppard SE. The function of gelatin in photographic emulsions. Journal of the Franklin Institute 1929;208(4):559.

[85] http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm?menu_info_medicaments=rechercheMulti page visited on 12/07/10.

[86] Gueguen J, Chevalier M, Barbot J, Schaeffer F. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. Journal of the Science of Food and Agriculture 1988;44(2):167-182.

[87] Ducel V, Richard J, Popineau Y, Boury F. Adsorption kinetics and rheological interfacial properties of plant proteins at the oil-water interface. Biomacromolecules 2004;5(6):2088-2093.

[88] Ducel V, Richard J, Saulnier P, Popineau Y, Boury F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: Application to the microencapsulation of oil droplets. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2004;232(2-3):239-247.

[89] Gharsallaoui A, Yamauchi K, Chambin O, Cases E, Saurel R. Effect of high methoxyl pectin on pea protein in aqueous solution and at oil/water interface. Carbohydrate Polymers 2010;80:817-827.

[90] Paraskevopoulou A, Boskou D, Kiosseoglou V. Stabilization of olive oil-lemon juice emulsion with polysaccharides. Food Chemistry 2004;90:627-634.

[91] Alderman DA A review of cellulose ethers in hydrophilic matrices for oral controlled-release dosage forms. International J Pharm. Technol. Prod. Manuf. 1984;5:1-9.

[92] Casas JA, Santos VE, Garcia-Ochoa F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. Enzyme and Microbial Technology 2000;26:282-291.

[93] Jansson P-E, Kenne L, Lindberg B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research 1975;45:275-282.

[94] Melton LD, Mindt L, Rees DA, Sanderson GR. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: Evidence from partial hydrolysis studies. Carbohydrate Research 1976;46:245-257.

[95] Sun C, Gunasekaran S, Richards MP. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids 2007;21:555-564.

[96] Hennock M, Rahalkar RR, Richmond P. Effect of xanthan gum upon the rheology and stability of oil-water emulsions. Journal of Food science 1984;49(5):1271-1274.

[97] Chhabra RP. Bubbles drops and particles in Non-Newtonian Fluids, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

[98] Jossic L, Magnin A. Structuring of gelled suspensions flowing through a sudden three dimensional expansion. J. Non-Newtonian Fluid Mech. 2005;127:201-212.

[99] Kovacs P. Useful incompatibility of xanthan gum with galactomannans. Food Technol 1973;27(3):26-30.

[100] Singh KK. Xanthan gum. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association: London; 2006 pp. 821-823.

[101] Phaechamud T, Ritthidej GC. Sustained release from layered matrix system comprising chitosan and xanthan gum. Drug Dev Ind Pharm. 2007;33(6):595-605.

[102] Yeole PG, Galgatte UC, Babla IB, Nakhat PD. Design and evaluation of Xanthan gum-based sustained release Matrix tablets of Diclofenac sodium. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 2006;68(2):185-189.

[103] Peh KK, Wong CF. Application of similarity factor in the development of controlled release diltiazem tablet. Drug Dev Ind Pharm 2000;26:723-730.

[104] Billa N, Yuen KH, Khader MA, Omar A. Gamma scintigraphic study of the gastrointestinal transit and *in vivo* dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices. Int J Pharm 2000;201:109-120.

[105] El-Gazayerly ON. Release of pentoxifylline from xanthan gum matrix tablets. Drug dev Ind Pharm 2003;29(2):241-246.

[106] Ceulemans J, Vinckier I, Ludwig A. The use of xanthan gum in an ophthalmic liquid dosage form: rheological characterization of the interaction with mucin. Journal of Pharmaceutical Science 2002;91(4):1117-1127.

[107] Gacesa P. Alginates. Carbohydrate Polymers 1988;8(3):161-182.

[108] Haug A. Composition and properties of alginates. Thesis. Norwegian Institute of Technology, Trondheim; 1964.

[109] Mackie W, Noy R, Sellen DB. Solution properties of sodium alginates. Biopolymers 1980;19:1839-1860.

[110] Smidsrød O. Solution properties of alginates. Carbohydrate polymers 1970;3:359-372.

[111] Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. Effect of alginate and λ-carrageenan on tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate-lipid based films. Carbohydrate polymers 2008;74(3):419-426.

[112] Moe ST, Draget KI, Skjak-Braek G, Smidsrød O. Alginates. In: Stephen AM editor. Food polysaccharides and their applications. New York: US, Marcel Decker 1995; p. 245-286.

[113] Gomez-Diaz D, Navata JM. Rheology of food stabilizers blend. Journal of Food Engineering 2004;64(2):143-149.

[114] Morris ER, Rees DA, Thom D, Boyd J. Chiroptical and stoechiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. Carbohydrate Research 1978;66(1):145-154.

[115] Hambleton A, Debeaufort F, Bonnotte A, Voilley A. Influence of alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compound. Food Hydrocolloids 2009;23:2116-2124.

[116] Therkelsen GH. Carrageenan. In: Whistler RL, BeMiller JN editors. Industrial gums. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press; 1993 pp. 145-180.

[117] Glickman M. Food hydrocolloids. Boca Raton, FL:CRC Press;1982.

[118] McKinnon AA, Rees DA, Williamson FB. Coil to double helix transition for a polysaccharide. Chemical Communications 1969;701:702.

[119] Morris ER, Rees DA, Robinson G. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. Journal of Molecular Biology 1980;138:349-362.

[120] Stanley NF, Carrageenans. In: Harris P (Ed). Food gels. Barking, UK: Elsevier Science Publishers; 1990. pp. 79-119.

[121] Ciancia M, Noseda MD, Matulewicz MC, Cerezo AS. Alkali-modification of carrageenans: Mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. Carbohydrate Polymers 1993;20:95-98.

[122] Doyle JP, Giannouli P, Rudolph B, Morris ER. Preparation, authentication, rheology and conformation of theta carrageenan. Carbohydrate Polymers 2010;80:648-654.

[123] Valenta C, Schultz K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. Journal of Controlled Release 2004;95:257-265.

[124] Marcuzzo E, Sensidoni A, Debeaufort F, Voilley A. Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavor release. Carbohydrate polymers 2010;80:984-988.

[125] Hambleton A, Fabra M-J, Debeaufort F, Dury-Brun C, Voilley A. Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion-based films used for encapsulation of active food compounds. Journal of Food Engineering 2009;93:80-88.

[126] Ould Eleya MM, Turgeon SL. Rheology of κ-carrageenan and β-lactoglobulin mixed gels. Food hydrocolloids 2000;14:29-40.

[127] Musampa RM, Alves MM, Maia JM. Phase separation, rheology and microstructure of pea protein-kappa-carrageenan mixtures. Food Hydrocolloids 2007;21:92-99.

[128] Dunstan DE, Chen Y, Liao M-L, Salvatore R, Boger DV, Prica M. Structure and rheology of the κ-carrageenan/locust bean gum gels. Food Hydrocolloids 2001;15:475-484.

[129] Dickinson E, Pawlowsky K. Influence of κ-carrageenan on the properties of a protein-stabilized emulsion. Food hydrocolloids 1998;12:417-423.

[130] Gu YS, Decker EA, McClements DJ. Influence of pH and carrageenan type on properties of β-lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids 2005;19:83-91.

[131] Singh KK. Carrageenan. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association: London; 2006 pp. 124-127.

[132] Ambrosio L, Borzacchiello A, Netti PA, Nicolais L. Rheological study on hyaluronic acid and its derivative solutions. Journal of Macromolecular Science, Part A 1999;36:991-1000.

[133] Kuo JW. Practical Aspects of Hyaluronan-Based Medical Products, CRC Press, New York; 2006.

[134] Oh EJ, Park K, Kim KS, Kim J, Yang JA, Kong JH, Lee MY. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. Journal of Controlled Release 2010;141:2-12.

[135] Pisárčik M, Bakoš D, Čeppan M. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 1995;97:197-202.

[136] Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. The Journal of Biological Chemistry 2002;277:4585-4588.

[137] Day AJ, Sheehan JK. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organization. Current Opinion in Structural Biology 2001;11:617-622.

[138] Dulong V, Lack S, Le Cerf D, Picton L, Vannier JP, Muller G. Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization. Carbohydrate Polymers 2004;57:1-6.

[139] Iglin P, Avci G, Silan C, Ekici S, Aktas N, Ayyala RS, JohnVT, Sahiner N. Colloidal drug carries from (sub)micron hyaluronic acid hydrogel particles with tunable properties for biomedical applications. Carbohydrate Polymers 2010;82:997-1003.

[140] Yun YH, Goetz DJ, Yellen P, Chen W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. Biomaterials 2004;25:147-157.

[141] Lajavardi L, Camelo S, Agnely F, Luo W, Goldenberg B, Naud M-C, Behar-Cohen F, de Kozac Y, Bochot A. New formulation of vasoactive intestinal peptide using liposomes in hyaluronic acid gel for uveitis. Journal of Controlled Release 2009;139:22-30.

[142] Claesson PM, Ninham BW. pH-dependent interaction between adsorbed chitosan layers. Langmuir 1992;8:1406-1412.

[143] Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2010;56:290-299.

[144] No HK, Meyers SP, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Application of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. Journal of Food Science 2007;72:87-100.

[145] Shahidi F, Abuzaytoun R. Chitin, chitosan and co-products: chemistry, production, applications and health effects. Advances in Food and Nutrition Research 2005;49:93-135.

[146] Varum KM, Smidsrød O. Chitosans. In: Stephen AM, Phillips GO, Williams PA editors. Food polysaccharides and their applications. CRC Press 2006; p. 497-520.

[147] Rodriguez MS, Albertengo LA, Agullo E. Emulsification capacity of chitosan. Carbohydrate Polymers 2002;48:271-276.

[148] Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. J Pharm Pharmacol 2001;53:1047-1067.

[149] Skaugrud O. Chitosan – new biopolymer for cosmetics and drugs. Drug Cosmet Ind 1991;148:24-29.

[150] Payet L, Terentjev EM. Emulsification and Stabilization Mechanisms of O/W Emulsions in the Presence of Chitosan. Langmuir 2008;24:12247-12252.

[151] Jones DS, Mawhinney HJ. Chitosan. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association: London; 2006 pp. 159-162.

[152] Sezer AD, Akbuğa. Controlled release of piroxicam from chitosan beads. International Journal of Pharmaceutics 1995;121:113-116.

[153] Vasconcellos FC, Goulart GAS, Beppu MM. Production and characterization of chitosan mocroparticles containing papain for controlled release applications. Powder Technology 2011;205:65-70.

[154] Hejazi R, Amiji M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. Journal of Controlled Release 2003;89:151-165.

[155] Moschakis T, Murray BS, Biliaderis CG. Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. Food hydrocolloids 2010;24:8-17.

[156] Chuah AM, Kuroiwa T, Kobayashi I, Nakajima M. Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. Food Hydrocolloids 2009;23:600-610.

[157] Schulz PC, Rodriguez MS, Del Blanco LF, Pistonesi M, Agullo E. Emulsification properties of chitosan. Colloid and Polymer Science 1998;276:1159-1165.

[158] Schulz PC, Rodriguez MS, Del Blanco LF, Pistonesi M, Agullo E. Emulsification properties of chitosan. Colloid Polym Sci 1998;276:1159-1165.

[159] Hino T, Yamamoto A, Shimabayashi S, Tanaka M, Tsujii D. Drug release from w/o/w emulsions prepared with different chitosan salts and concomitant creaming up. Journal of Controlled Release 2000;69:413-419.

[160] Garti N. Hydrocolloids as emulsifying agents for oil-in-water emulsions. J. Disp Sci and Tech. 1999;20(1-2):327-355.

[161] Chanamai R, McClements DJ. Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers: Influence of pH, $CaCl_2$ and Temperature. Journal of Food Science 2002;67(1):120-125.

[162] McNamee BF, O'Riordan ED, O'Sullivan M. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. J. Agric. Food Chem. 1998;46:4551-4555.

[163] Randall RC, Phillips GO, Williams PA. Fractionation and characterization of gum from Acacia Senegal. Food hydrocolloids 1989;3:65-75.

[164] Anderson DMW, Bridgeman MME, Farquhar JGK, McNab CGA. The chemical characterization of the test article used in toxicological studies of gum arabic (Acacia Senegal (L) Willd). Int. Tree Crops 1983;2:245-254.

[165] Idris OHM, Williams PA, Phillips GO. Characterization of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. Food Hydrocolloids 1998;12:379-388.

[166] Kibbe AH. Acacia. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association: London; 2006 pp. 1-3.

[167] Sanchez C, Renard D, Robert P, Schmitt C, Lefebvre J. Structure and rheological properties of Acacia gum dispersions. Food Hydrocolloids 2002;16:257-267.

[168] Randall RC, Phillips GO, Williams PA. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. Food Hydrocolloids 1988;2:131-140.

[169] Erni P, Windhab EJ, Gunde R, Graber M, Pfister B, Parker A, Fischer P. Interfacial rheology of surface-active biopolymers: Acacia senegal gum versus hydrophobically modified starch. Biomacromolecules 2007;8(11):3458-3466.

[170] Picton L, Bataille I, Muller G. Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation. Carbohydrate Polymers 2000;42(1):23-31.

[171] Fauconnier ML, Blecker C, Groyne J, Razafindralambo H, Vanzeveren E, Marlier M, Paquot M. Characterization of two Acacia gums and their fractions using a langmuir film balance. J. Agric. Food Chem. 2000;48(7):2709-2712.

[172] KravtchenkoTP. Application of Acacia Gum as a Natural Source of Soluble Dietary Fibre. Food Ingredients Europe, Conference Proceedings, Maarssen (The Netherlands): Miller Freeman;1997:56-60.

[173] Avadi MR, Sadeghi AMM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, Rafiee-Tehrani M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2010;6:58-63.

[174] Ramakrishnan A, Pandit N, Badgujar M, Bhaskar C, Rao M. Encapsulation of endoglucanase using a biopolymer gum arabic for its controlled release. Bioresource Technology 2007;98:368-372.

[175] Lu E-X, Jiang Z-Q, Zhang Q-Z, Jiang X-G. A water-insoluble drug monolithic osmotic tablet system utilizing gum arabic as an osmotic, suspending and expanding agent. Journal of Controlled Release 2003;92:375-382.

[176] Nahringbauer I. Dynamic surface tension of aqueous polymer solution, I: ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL cst- 103). Journal of Colloid and Interface Science 1995;176:318-328.

[177] Daniels R, Barta A. Preparation, characterization and stability assessment of oil-in-water emulsions with hydroxypropylmethylcellulose as emulsifier, Proc. Pharm. Tech. Conf. Elsinore 1993;51-60.

[178] Ochoa-Machiste E, Buckton G. Dynamic surface tension studies of Hydroxypropylmethylcellulose film – coating solutions. International Journal of Pharmaceutics 1996;145:197-201.

[179] Wollenweber C, Makievski AV, Miller R, Daniels R. Adsorption of hydroxypropylmethylcellulose at liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2000;172:91-101.

[180] Camino NA, Pérez OE, Carrera Sanchez C, Rodriguez Patino JM, Pilosof AMR. Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air-water and the oil-water interfaces. Food Hydrocolloids 2009;23:2359-2368.

[181] Harwood RJ. Hypromellose. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association: London; 2006 pp. 346-349.

[182] Chowhan ZT. Role of binders in moisture-induced hardness increase in compressed tablets and its effect on in vitro disintegration and dissolution. J Pharm Sci 1980;69:1-4.

[183] Rowe RC. The molecular weight and molecular weight distribution of hydroxypropyl methylcellulose used in the film coating of tablets. J Pharm Pharmacol 1980;32:116-119.

[184] Banker G, Peck G, Jan S, Pirakitikulr P. Evaluation of hydroxyl-propyl cellulose and hydroxypropyl methylcellulose as aqueous based film coatings. Drug dev Ind Pharm 1981;7:693-716.

[185] Hogan JE. Hydroxypropylmethylcellulose sustained release technology. Drug Dev Ind Pharm 1989;15:975-999.

[186] Dahl TC, Calderwood T, Bormeth A, Trimble K. Influence of physicochemical properties of hydroxypropyl methylcellulose on naproxen release from sustained release matrix tablets. J Control Release 1990;14:1-10.

[187] Wu Y, Cui W, Eskin NAM, Goff HD. An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. Food Research Internationnal 2009;42:1141-1146.

[188] Dea ICM, Morrison A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry 1975;31:241-312.

[189] Kibbe AH. Guar Gum. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association: London; 2006 pp. 315-317.

[190] Cross MM. Rheology of non Newtonian fluids: a new flow equation for pseudoelastic systems. Journal of Colloid Science 1965;20:417-437.

[191] Sittikijyothin W, Torres D, Gonçalves MP. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. Carbohydrate Polymers 2005;59:339-350.

[192] Garti N. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 1999;152:125-146.

[193] Garti N, Reichman D. Surface properties and emulsification activity of galactomannans. Food Hydrocolloids 1994;8:155-173.

[194] Mikkonen KS, Tenkanen M, Cooke P, Xu C, Rita H, Willför S, Holmbom B, Hicks K, Yadav MP. Mannans as stabilizers of oil-in-water beverage emulsions. LWT - Food Science and Technology 2009;42:849-855.

[195] Coviello T, Alhaique F, Dorigo A, Matricardi P, Grassi M. Two galactomannans and scleroglucan as matrices for drug delivery : Preparation and release studies. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2007;66:200-209.

[196] Rooker WA. New uses of fruit pectin. The Fruit Products Journal and American Vinegar Industry 1927;7(1):11.

[197] Leroux J, Langendorff V, Schick G, Vaishnav V, Mazoyer J. Emulsion stabilizing properties of pectin. Food hydrocolloids 2003;17:455-462.

[198] Cook W. Pectin. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 5th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association: London; 2006 pp. 507-508.

[199] Kubo W, Miyazaki S, Dairaku M, Togashi M, Mikami R, Attwood D. Oral sustained delivery of ambroxol from in-situ gelling pectin formulations. Int J Pharm 2004;271(1-2):233-240.

[200] Murata Y, Miyashita M, Kofuji K, Miyamoto E, Kawashima S. Drug release properties of gel bead prepared with pectin and hydrolysate. Journal of Controlled release 2004;95(1):61-66.

[201] Kato A, Sasaki Y, Furuta R, Kobayashi K. Functional protein/polysaccharide conjugate prepared by controlled dry heating of ovalbumin/dextran mixtures. Agricultural and Biological Chemistry 1990;54:107-112.

[202] Wooster TJ, Ann Augustin M. β-lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. Journal of Colloid and Interface Science 2006;303:564-572.

[203] Dickinson E, Galaska VB. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β-lactoglobulin with polysaccharides. Food Hydrocolloids 1991;5(3):281-296.

[204] Akhtar M, Dickinson E. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: an alternative to gum arabic. Food hydrocolloids 2007;21:607-616.

[205] O'Regan J, Mulvihill DM. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: Encapsulation and stability. Food research International 2010;43:224-231.

[206] Laplante S, Turgeon SL, Paquin P. Emulsion-stabilizing properties of chitosan in the presence of whey protein isolate: Effect of the mixture ratio, ionic strength and pH. Carbohydrate Polymers 2006;65:479-487.

[207] Lutz R, Aserin A, Wicker L, Garti N. Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2009;72(1):121-127.

[208] Khalloufi S, Corredig M, Goff HD, Alexander M. Flaxseed gums and their adsorption on whey protein-stabilized oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids 2009;23:611-618.

[209] Klein M, Aserin A, Svitov I, Garti N. Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum Arabic and whey protein isolate. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2010;77:75-81.

[210] Aoki T, Decker EA, McClements DJ. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by layer-by-layer electrostatic deposition technique. Food Hydrocolloids 2005;19:209-220.

[211] Grigoriev DO, Miller R. Mono- and multilayer covered drops as carriers. Current Opinion in Colloid and Interface Science 2009;14:48-59.

[212] Surh J, Gu YS, Decker EA, McClements DJ. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes. J. Agric. Food Chem. 2005;53:4236-4244.

[213] Khalloufi S, Corredig M, Alexander M. Interactions between flaxseed gums and WPI-stabilized emulsion droplets assessed in situ using diffusing wave spectroscopy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2009;68:145-153.

[214] Benichou A, Aserin A, Garti N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2007;294:20-32.

[215] Singh H, Tamehana M, Hemar Y, Munro PA. Interfacial compositions, microstructure and stability of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and κ-carrageenan: 2. Whey protein isolate (WPI). Food Hydrocolloids 2003;17:549-561.

[216] Guzey D, Kim HJ, McClements DJ. Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β-lactoglobulin-pectine membranes. Food Hydrocolloids 2004;18:967-975.

[217] Moreau L, Kim HJ, Decker EA, McClements DJ. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β-lactoglobulin-pectin membranes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003;51:6612-6617.

[218] Ru Q, Cho Y, Huang Q. Biopolymer-stabilized emulsions on the basis of interactions between β-lactoglobulin and ι-carrageenan. Front. Chem. Eng. China 2009;3(4):399-406.

[219] Pongsawatmanit R, Harnsilawat T, McClements DJ. Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β-lactoglobulin. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 2006;287:59-67.

[220] Bonnet C, Corredig M, Alexander M. Stabilization of caseinate covered oil droplets during acidification with high methoxyl pectin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005;53:8600-8606.

[221] Sosa-Herrera MG, Berli CLA, Martinez-Padilla LP. Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures. Food Hydrocolloids 2008;22:934-942.

[222] Jourdain J, Leser ME, Schmitt C, Michel M, Dickinson E. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: relationship to complexation in solution. Food Hydrocolloids 2008;22:647-659.

[223] Hemar Y, Tamehana M, Munro PA, Singh H. Influence of xanthan gum on stability of sodium caseinate oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids 2001;15:513-519.

[224] Moschakis T, Murray BS, Dickinson E. Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilized by sodium caseinate and xanthan gum. Journal of Colloid and Interface Science 2005;284:714-728.

[225] Sun C, Gunasekaran S. Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. Food Hydrocolloids 2009;23:165-174.

[226] Khalloufi S, Alexander M, Goff HD, Corredig M. Physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions when mixed with flaxseed gum at neutral pH. Food Research International 2008;41:964-972.

[227] Perrechil FA, Cunha RL. Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: Influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. Journal of Food Engineering 2010;97:441-448.

[228] McClements DJ, Li Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. Advances in Colloid and Interface Science 2010;159(2):213-228.

[229] Corveleyn S, Remon JP. Formulation of a lyophilized dry emulsion tablet for the delivery of poorly soluble drugs. International Journal of Pharmaceutics 1998;166:65-74.

[230] Li F, Wang T, He HB, Tang X. The properties of bufadienolides-loaded nano-emulsion and submicro-emulsion during lyophilization. International Journal of Pharmaceutics 2008;349:291-299.

[231] Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : an overview. Food Res Int. 2007;40:1107-1121.

[232] Muhiddinov Z, Khalikov D, Speaker T, Fassihi R. Development and characterization of different low methoxy pectin microcapsules by an emulsion-interface reaction technique. J Microencapsulation 2004;21:729-741.

CHAPITRE 3 - Présentation des biopolymères utilisés

I. Introduction

Ce chapitre décrit spécifiquement les biopolymères qui ont été utilisés dans cette étude. Ces biopolymères ont été choisis parmi ceux les plus étudiés et utilisés dans le domaine agroalimentaire, notamment pour la stabilisation d'émulsions. La protéine qui a été sélectionnée est la β-lactoglobuline, en raison de sa disponibilité et de la bonne connaissance de sa structure et de ses propriétés physicochimiques. Deux polysaccharides ont ensuite été choisis de part leurs mécanismes de stabilisation différents : la gomme arabique qui est capable de s'adsorber aux interfaces et la gomme xanthane qui agit par augmentation de la viscosité de la phase aqueuse. Une présentation des propriétés de leurs mélanges en solution est également donnée, en raison des stabilisations combinées que nous souhaitons effectuer par la suite.

II. La β-lactoglobuline (β-lg)

1 - Généralités

La β-lactoglobuline est une petite protéine globulaire qui appartient à la superfamille des lipocalines, transporteurs de petits ligands hydrophobes (Fogolari *et al.*, 2000). Elle constitue la protéine majeure du lactosérum puisqu'elle représente environ 50 % de la masse totale des protéines contenues dans celui-ci (Oboroceanu *et al.*, 2010). Sa concentration dans le lait de vache est de l'ordre de 3,2 g/L (Cayot et Lorient, 1998). La β-lg est une protéine très stable en milieu aqueux dans une gamme de pH variant de 2 à 9 pour des températures n'excédant pas 50 °C. De manière générale, elle est présente dans le lait de nombreux ruminants et d'autres espèces. Elle est largement utilisée en industrie alimentaire en raison de ses propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes.

2 - Structures

La séquence primaire de la β-lg comporte 162 acides aminés, pour une masse molaire de 18 400 g/mol. Elle contient deux ponts disulfures (S-S) et un groupement thiol libre (-SH). Le premier pont disulfure (Cys66-Cys160) maintient la structure tertiaire tandis que le second (Cys106-Cys119) se situe à la surface extérieure de la molécule (Brownlow *et al.*, 1997). Il est à noter que le groupement thiol (en position 121) n'est pas toujours présent en fonction de l'espèce considérée, comme par exemple chez la truie. Plusieurs variants génétiques ont été mis en évidence (au moins 7) différant par la substitution de certains acides aminés. Cependant, les plus couramment présents dans le lait de vache sont les variants A (Gln59, Asp64, Val118) et B (Gln59, Gly64, Ala118), qui s'y trouvent en proportions égales (Meza-Nieto *et al.*, 2007). La structure tridimensionnelle de la molécule (Figure 4) comporte 51,8 % de feuillets β antiparallèles, 6,8 % d'hélices α, 6,9 % de coudes β et 32,5 % de structures désordonnées (Papiz *et al.*, 1986).

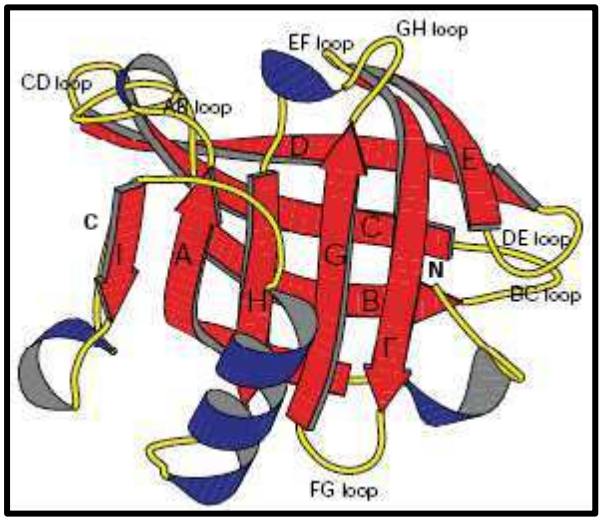


Figure 4 : *Représentation schématique de la structure moléculaire tertiaire d'un monomère de β-lactoglobuline (Brownlow et al., 1997).*

La β-lg possède un calice intérieur hydrophobe formé par l'enroulement de huit brins de feuillets β antiparallèles (nommés A à H dans la Figure 4) (Brownlow *et al.*, 1997). Cette forme confère à la β-lg la capacité de transporter des petites molécules hydrophobes comme le rétinol, les acides gras… (Pérez et Calvo, 1994). En se liant au rétinol, la β-lg augmente

l'absorption de la vitamine A chez le veau *via* des récepteurs spécifiques dans les intestins (Said *et al.*, 1989). Un neuvième brin β nommé I est impliqué dans la formation des dimères. La structure tertiaire de la β-lg est stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogènes (Edwards *et al.*, 2002).

Seyrek *et al*. (2003) ont montré une asymétrie dipolaire de la molécule dans les conditions de pH 7 et une force ionique (I) de 0,15 M et révélé les différentes zones « chargées » positivement et négativement de la protéine (Figure 5). L'importance de ces zones dépend des conditions du milieu (pH et force ionique), le point isoélectrique (p*I*) de la protéine étant d'environ 5,2.

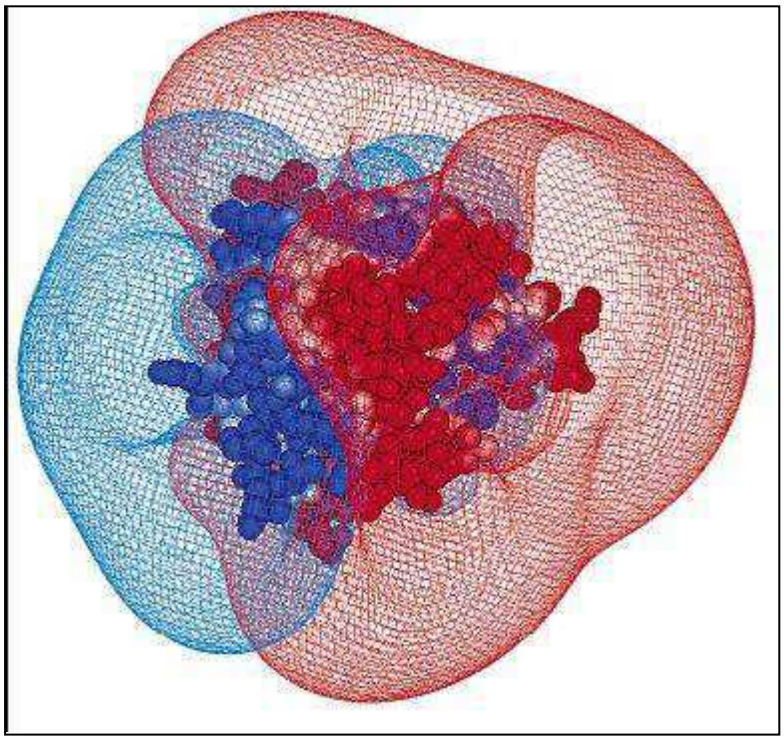


Figure 5 : *Représentation des potentiels de surface d'un monomère de β-lg [-0,1 kT/e (rouge) et 0,1 kT/e (bleu)] pH = 7 et I = 0,15 M. (Seyrek et al., 2003).*

Différentes structures quaternaires résultant de l'association de monomères entre eux par des forces électrostatiques peuvent être trouvées en fonction des paramètres environnementaux (pH, concentration, force ionique, température). Cette association permet à la protéine de préserver ses résidus hydrophobes du solvant polaire. Le rayon de giration du monomère a été rapporté comme étant de 1,75 nm (Sawyer et Kontopidis, 2000).

3 - Influence des paramètres environnementaux sur la structure quaternaire

A température ambiante, avec une faible force ionique et dans une gamme de pH inférieure à 4 ou supérieure à 7, la β-lg existe sous la forme d'un équilibre monomères/dimères (Verheul *et al.*, 1999). L'interface entre les monomères implique des interactions hydrophobes. Des analyses cristallographiques ont montré que le dimère de β-lg s'apparente à un ellipsoïde de longueur 69,3 Å et de largeur 34,6 Å composé de deux sphères de rayon 17,9 Å légèrement écrasées au niveau de leur surface de contact (Witz *et al.*, 1964). La β-lg est stable à pH acide du fait de ses deux ponts disulfure stabilisants (Papiz *et al.*, 1986). Pour des pH intermédiaires, lorsque l'on fait varier la force ionique et la température, les monomères de β-lg peuvent s'associer pour former des structures oligomériques (dimères, tétramères, octamères) (Schmitt, 2000). De façon plus précise, jusqu'à pH 3,5 et à partir de pH 7,5, avec une force ionique faible, les monomères sont d'autant plus majoritaires que la concentration en protéines et la température sont élevées. Aux pH extrêmes, l'augmentation importante de la charge nette de la protéine entraînerait la dissociation des dimères (Swaisgood, 1982).

Entre pH 4 et 6, la β-lg subit un premier changement conformationnel réversible (Timasheff *et al.*, 1966). L'augmentation de pH induit la contraction de la protéine. Plus précisément, pour des pH entre 3,7 et 5,1, de 0 à 4 °C et à une concentration supérieure à 15 g/L, le dimère de β-lg se tétramérise en octamère d'environ 147 000 g/mol (Townend et Timasheff, 1960).

Dans la zone de pH 6,5 - 7,8, un second changement conformationnel (réversible) se produit. Puis, pour des pH > 8, un troisième changement conformationnel conduit à une dénaturation alcaline irréversible : les molécules établissent des ponts disulfure intermoléculaires qui peuvent mener à l'agrégation des protéines (Verheul *et al.*, 1999).

La β-lg possède de très bonnes propriétés d'agrégation et de gélification thermique. Elle est dénaturée à des températures excédant 65 °C à pH 6,7. Il y a initialement dépliement partiel de la structure (vers 40 °C) formant un état intermédiaire qualifié d'état globulaire fondu (« molten globule state ») (Doi, 1993 ; Ikeguchi *et al.*, 1997), suivi de plusieurs réactions d'agrégation plus lentes. Les modifications conformationnelles successives conduisent à l'exposition de zones structurales habituellement inaccessibles (Arai *et al.*, 1998). Il peut y avoir établissement d'interactions hydrophobes et de ponts disulfure qui

rendent alors irréversible le processus d'agrégation thermique (Shimada et Cheftel, 1989 ; McSwiney *et al.*, 1994).

III. La gomme arabique (GA)

1 - Généralités

La gomme arabique (GA), également appelée gomme d'Acacia, est un polysaccharide complexe de type arabinogalactane. Elle est produite par l'exsudation des arbres du genre *Acacia* localisés dans les pays du Nord-Nord/Est de l'Afrique : *Acacia senegal* et *Acacia seyal*.

Elle est certainement la plus ancienne et la plus connue de toutes les gommes. Les Egyptiens l'auraient utilisée entre autres pour assurer la cohésion des bandages de momies (Yadav *et al.*, 2007). De nos jours, la GA est principalement utilisée comme émulsifiant dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques. Elle est considérée comme la meilleure gomme à utiliser dans des systèmes émulsionnés de type huile-dans-eau (Garti, 1999). C'est aussi un agent d'encapsulation efficace en raison de sa haute solubilité dans l'eau et de sa faible viscosité, même à forte concentration (Mc Namee *et al.*, 1998).

2 - Structure

La GA est un hétéropolysaccharide de structure complexe et ramifiée. Il s'agit d'un polyanion qui est généralement associé à des ions calcium, magnésium ou potassium pour former un sel d'acide polysaccharidique. La chaîne principale est essentiellement composée d'unités β-D-galactopyranosyl liées en 1-3. Ces mêmes unités (β-D-galactopyranosyl) ramifient la chaîne principale en 1-6. Les ramifications sont également constituées d'unités α-L-arabinofuranosyl, α-L-rhamnopyranosyl, β-D-glucuronopyranosyl et 4-O-méthyl-β-D-glucuronopyranosyl (Street et Anderson, 1983). La gomme contient approximativement 39 à 42 % de galactose, 24 à 27 % d'arabinose, 12 à 16 % de rhamnose, 14 à 16 % d'acide glucuronique (qui lui confère son caractère anionique), 1,5 à 2,6 % de protéines, 0,22 à 0,39 % d'azote et 12,5 à 16 % d'eau (Idris *et al.*, 1998 ; Ali *et al.*, 2009).

Trois fractions ont été identifiées, par chromatographie d'exclusion, dans la GA (Randall *et al.*, 1989) : la fraction arabinogalactane (AG), la fraction arabinogalactane-protéine (AGP) et la fraction glycoprotéique (GP). La fraction AG représente près de 80 % de la masse totale de la gomme, mais ne possède qu'une faible teneur en protéines : 0,35 %. Sa masse molaire peut varier de (2 à 3) x 10^5 g/mol et son rayon hydrodynamique de 5 à 10 nm (Schmitt, 2000). La fraction AGP représente moins de 10 % de la masse totale de la gomme et contient près de 12 % de protéines. Sa masse molaire est de l'ordre de (0,3 à 2) x 10^6 g/mol et son rayon hydrodynamique varie de 25 jusqu'à plus de 50 nm (Picton *et al.*, 2000). Cette fraction est constituée d'un assemblage de blocs polysaccharidiques autour de la chaîne peptidique qui donne une structure dite « wattle-blossom » et qui confère à la gomme un caractère amphiphile favorisant son adsorption à l'interface air-eau ou huile-eau (Figure 6) (Dickinson, 2003).

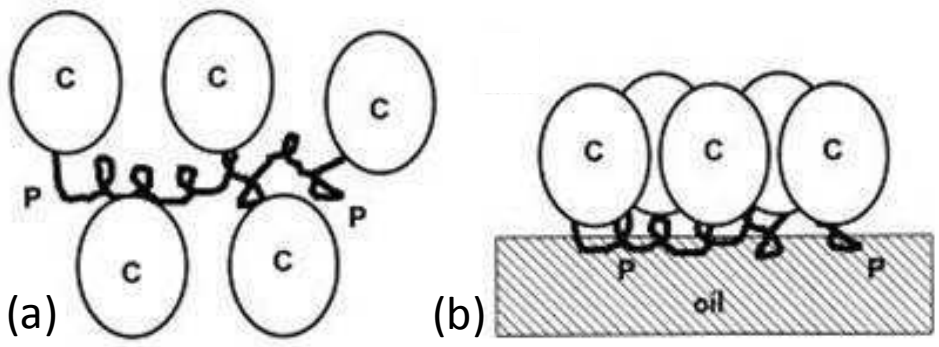


Figure 6 : *Représentation schématique du model « wattle blossom » (Dickinson, 2003). GA (a) en solution, (b) adsorbée à l'interface huile-eau. C : blocs polysaccharidiques, P : chaîne polypeptidique.*

La fraction GP représente près de 1 % de la masse totale de la gomme. La teneur en protéines est de près de 50 % et les résidus galactose sont liés à la sérine. Sa masse molaire est de l'ordre de 2,5 x 10^5 g/mol.

La masse molaire de toute la gomme peut varier de 4,6 x 10^5 à 5,8 x 10^5 g/mol et le rayon hydrodynamique moyen est compris entre 12 et 20 nm (valeur moyenne tenant compte des rayons hydrodynamiques des fractions AGP et AG de la gomme) (Islam *et al.*, 1997).

3 - Propriétés

Le p*Ka* de la gomme arabique est inférieur à 3,6 (Kravtchenko, 1997). Les acides uroniques présents dans la structure de la GA lui confèrent un potentiel zêta négatif dès pH 2. Le caractère anionique marqué de la GA induit des répulsions électrostatiques entre les chaînes chargées tendant à augmenter légèrement le rayon hydrodynamique de la gomme à des pH élevés (Schmitt, 2000). La viscosité des solutions aqueuses de gomme arabique est faible comparée à celle d'autres polysaccharides de masse molaire similaire, et ce même à concentration élevée. Son écoulement est considéré comme Newtonien jusqu'à une concentration en gomme de 20-30 %, voire plus (Sanchez *et al.*, 2002).

IV. La gomme xanthane (GX)

1 - Généralités

La gomme xanthane (GX) est obtenue par la fermentation aérobie de sucres par la bactérie *Xanthomonas campestris* (Sutherland, 1990). La bactérie produit la gomme grâce à un organe spécifique à la surface de la cellule (procédé enzymatique complexe), et est ensuite sécrétée dans le milieu environnant. La GX peut ensuite être précipitée avec de l'alcool isopropylique afin de la récupérer. Puis, une succession d'étapes est nécessaire : séchage, broyage, purification, différents traitements…, afin d'obtenir la GX sous la forme d'une poudre utilisable. Un contrôle très strict des conditions de fermentation (aération, agitation, quantité d'oxygène absorbée, pH, température) permet de garantir un résultat optimal et une reproductibilité (Simon, 2001). La structure de la GX obtenue par fermentation industrielle ne peut être différenciée de celle d'origine naturelle.

2 - Structure

C'est un hétéropolysaccharide de masse molaire très élevée : entre 1,5 x 10^6 et 5 x 10^6 g/mol selon la fermentation. La chaîne principale est formée d'unités D-glucose liées en 1-4, tout comme la cellulose, et sur laquelle sont branchées des chaînes latérales. Il y a un branchement latéral triosidique tous les 2 glucoses, composé d'un α-D-mannose, d'un acide β-

D-glucuronique et d'un β-D-mannose terminal (Figure 7). L'α-D-mannose est généralement acétylé sur le carbone 6, et environ 30 % des β-D-mannoses portent un groupement pyruvate chélatée entre les carbones 4 et 6 (Doublier, 1993 ; Kang et Pettitt, 1992). La présence d'acide glucuronique et d'acide pyruvique confère à la gomme xanthane un caractère anionique marqué. Les contre-ions les plus couramment rencontrés sont Na^+, K^+ et Ca^{2+} (Simon, 2001).

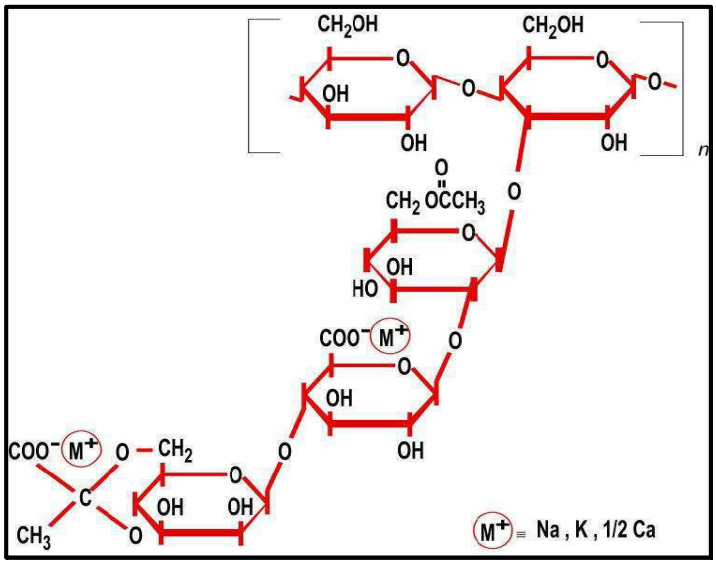


Figure 7 : *Structure chimique de l'unité de base de la gomme xanthane (Desprairies, 2005).*

Moorhouse *et al.* (1977) ont montré par diffraction des rayons X que la conformation du xanthane cristallin est en hélice quintuple 5_1, et que le pas est de 4,7 nm (Figure 8). En solution aqueuse, les macromolécules de GX adoptent une conformation semblable à celle trouvée dans l'état cristallin : hélicoïdale ordonnée. Cette structure peut subir une transition ordre-désordre qui résulte en une chaîne flexible et désordonnée (Figure 9) (Dentini *et al.*, 1984 ; Paoletti *et al.*, 1983 ; Morris *et al.*, 1977). Cette transition est provoquée par une élévation de la température au-delà de la température de transition (T_m ~ 55 °C pour 1 % m/m de GX) ou par de faibles forces ioniques (< 10^{-3} M NaCl) (Morris, 1990 ; Sutherland, 1990). Cette transition vers l'état désordonné entraîne une diminution de la masse molaire et de la viscosité des solutions (Lecourtier *et al.*, 1986 ; Rochefort et Middleman, 1987). T_m dépend de nombreux facteurs tels que la masse molaire, le contenu en pyruvate et acétate, la force ionique, *etc*. Elle augmente linéairement avec le logarithme de la force ionique totale (Kitamura *et al.*, 1991). La stabilité thermique peut donc être améliorée par de faibles quantités d'électrolytes qui réduisent les répulsions électrostatiques entre les anions carboxyliques. Il est maintenant reconnu qu'après les traitements subis pendant sa purification

(dont la pasteurisation et le séchage) la GX se présente sous la forme d'une hélice double (Muller *et al.*, 1986 ; Sutherland, 1990).

La teneur en pyruvate et acétate peut varier beaucoup d'une GX à l'autre selon la souche de bactérie ou la nature de la source d'azote (Kang et Pettitt, 1992). Le pyruvate a un effet déstabilisant sur la conformation ordonnée de la GX en solution (Kitamura *et al.*, 1991). Le groupement acétate contribue à des associations intramoléculaires qui stabilisent la conformation ordonnée (Dentini *et al.*, 1984).

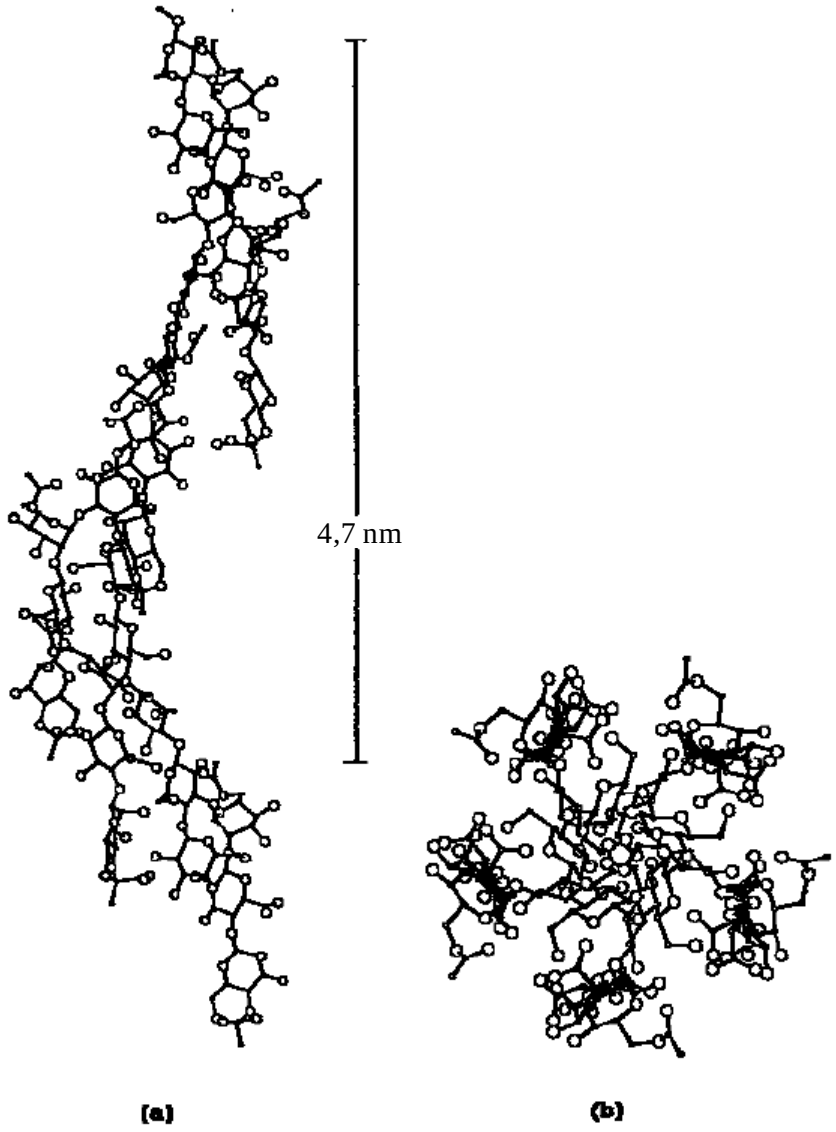


Figure 8 : *Structure hélicoïdale de la gomme xanthane (a) vue perpendiculaire, (b) vue axiale, pas = 4,7 nm (Moorhouse et al., 1977).*

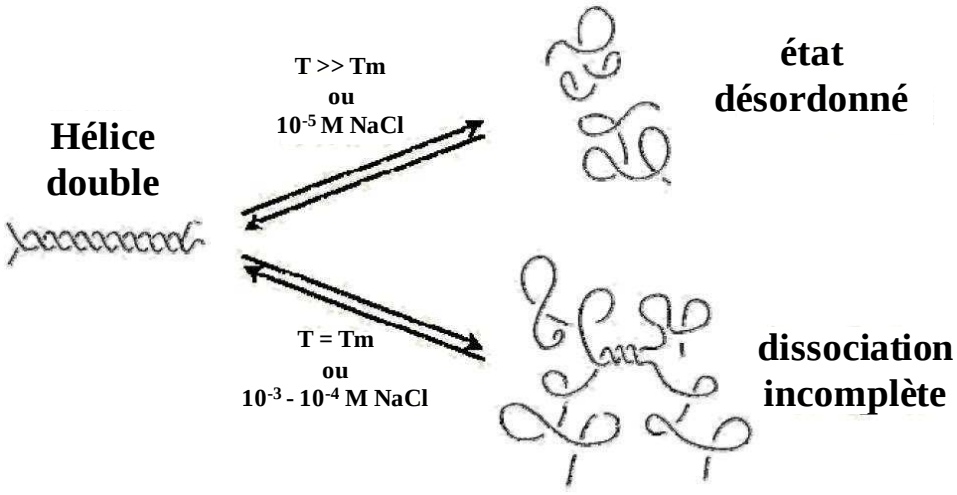


Figure 9 : *Transition de l'état ordonné à l'état désordonné de la conformation de la gomme xanthane (adapté de Morris, 1995).*

3 - Propriétés

En solution aqueuse, la gomme a des propriétés épaississantes dès les basses concentrations (0,1 %) et est efficace à 0,5 % comme agent stabilisant, contre au moins 1 % pour d'autres polysaccharides (Simon, 2001 ; Baeza *et al.*, 2005). Les propriétés rhéologiques de la GX en solution montrent un seuil d'écoulement et une viscosité élevée des solutions à de faibles taux de cisaillement. Pour des taux de cisaillement élevés, la viscosité diminue donnant lieu à un comportement rhéofluidifiant. Ce caractère rhéologique est expliqué au départ par un enchevêtrement des bâtonnets rigides de GX formant un réseau par des interactions ioniques et hydrogène imposant ainsi une viscosité élevée au repos. Les bâtonnets qui emprisonnent l'eau ne peuvent pivoter et donnent un aspect de pseudogel au liquide (Simon, 2001). Lorsque la contrainte de cisaillement minimale nécessaire pour obtenir un début d'écoulement est atteinte, cela correspond au seuil d'écoulement de la solution. Les molécules s'orientent alors dans le sens du cisaillement, diminuant ainsi la viscosité de la solution. A l'arrêt de l'agitation, il y a retour à l'état initial (Doublier, 1993). A titre d'exemples, des seuils de 700 et 2500 et 7000 mPa ont été obtenus pour des concentrations en GX de 3, 5 et 10 g/L respectivement (Simon, 2001).

Ce polymère trouve ainsi des applications industrielles nombreuses et variées, notamment en agroalimentaire, en cosmétologie (concentrations de 0,7 à 1 %) pour stabiliser des formules de shampooings ou de dentifrices et en pharmacie comme épaississant-émulsifiant (concentrations de 0,1 à 0,5 %) (Simon, 2001).

V. Les mélanges de protéines et polysaccharides en milieux aqueux

En solution, les protéines et les polysaccharides peuvent interagir ensemble, donnant lieu à de nouvelles propriétés fonctionnelles (Dickinson, 1993 ; Tolstoguzov, 1997). Thermodynamiquement, ces deux biopolymères peuvent être compatibles ou incompatibles en solution, phénomènes se traduisant macroscopiquement soit par une miscibilité (assez rare), soit par une séparation de phases, à plus ou moins long terme. La séparation de phases peut être ségrégative ou associative (Tolstoguzov, 2003) suivant les conditions du milieu (pH, température, force ionique) et la nature des biopolymères (groupes chargés, hydrophobes, concentration) (Dickinson, 1993).

Dans le cas de la séparation de phases ségrégative, les biopolymères se repoussent et se retrouvent dans des phases séparées pour des raisons d'affinité préférentielle de chacun avec le solvant (Tolstoguzov, 1986). Les interactions répulsives transitoires entre les biopolymères ne sont pas spécifiques : effet de volume exclu et/ou de répulsions électrostatiques. La séparation de phases associative, quant à elle, se produit lorsque des interactions attractives (électrostatiques, hydrophobes, liaisons hydrogène) s'établissent entre les deux types de biopolymères, ou bien lorsque les conditions de solvatation sont mauvaises (séparation de phases n'impliquant pas nécessairement d'interactions entre les biopolymères) (Doublier, 2000). Un cas particulier de la séparation de phases associative est la coacervation complexe. C'est un phénomène qui est essentiellement régi par l'établissement d'interactions électrostatiques attractives entre les biopolymères. Ce type d'interaction n'est possible que lorsque les biopolymères ont des charges opposées. Cela peut se produire dans un intervalle de pH compris entre le p*Ka* des groupements anioniques du polysaccharide et le p*I* de la protéine. Il est cependant possible que de faibles interactions attractives s'établissent entre les deux biopolymères pour des pH supérieurs au p*I* de la protéine si celle-ci n'est que légèrement chargée négativement ou par la présence de zones de charge positive bien que la charge globale de la protéine soit négative (Mattison *et al.*, 1998). Des interactions électrostatiques attractives peuvent également avoir lieu entre un polysaccharide cationique et une protéine chargée négativement (pH > p*I*).

De nombreux systèmes ont été étudiés tels que les protéines du lactosérum avec le chitosan (Laplante *et al.*, 2006), la pectine (Lutz *et al.*, 2009) ou bien la gomme xanthane (Benichou *et al.*, 2007), ou encore la β-lactoglobuline avec la pectine (Guzey *et al.*, 2004) ou

les carraghénanes (Gu *et al.*, 2005), *etc*. Dans cette étude nous avons choisi de ne développer que les associations β-lg : GA et β-lg : GX, car ce sont les combinaisons que nous étudierons dans la partie expérimentale.

1 - L'association β-lactoglobuline : gomme arabique

Suivant les conditions environnementales, la β-lg et la GA peuvent être co-solubles ou complexées. Le pH, la force ionique, la concentration, la température et le ratio β-lg : GA vont influer sur le comportement de ces deux biopolymères en solution. Dans une gamme de pH entre 2 (p*Ka* de la GA) et 5,2 (p*I* de la β-lg), la β-lg est chargée positivement et la GA négativement. Il peut alors se former des complexes électrostatiques entre les deux biopolymères. Schmitt (2000) a montré que la complexation entre la β-lg et la GA ne se faisait pas dans des proportions stœchiométriques et qu'il était possible de former des coacervats. La Figure 10 montre une micrographie mettant en évidence des coacervats, apparaissant comme des gouttes microscopiques (d'environ 3 µm) pouvant fusionner entre elles. L'étude de la cinétique de formation de ces coacervats par diffusion statique de la lumière aux petits angles a permis de mettre en évidence un mécanisme de nucléation et croissance lors de la coacervation complexe entre la β-lg et la GA (Mekhloufi, 2005). De plus, le ratio β-lg : GA influence la complexation. Le nombre de molécules de β-lg devant neutraliser la GA est d'autant plus important lorsque le pH se rapproche du p*I*. Des conditions optimales d'interactions ont été observées à pH 4,2 pour un ratio massique protéine : polysaccharide de 2 : 1 (Schmitt, 2000). Dans ces mêmes conditions, Schmitt *et al*. (2005) ont montré que les coacervats étaient capables de s'adsorber à l'interface air-eau et de diminuer la tension interfaciale.

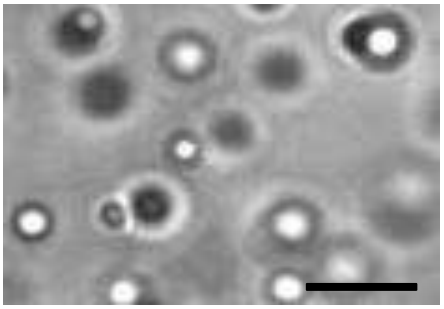


Figure 10 : *Micrographie, prise par microscopie à contraste de phase, de coacervats de β-lg et de GA à la concentration totale en biopolymères de 0,1 %, au ratio massique β-lg : GA de 2 : 1 et au pH 3,75. La barre d'échelle correspond à 10 µm (Mekhloufi, 2005).*

2 - L'association β-lactoglobuline : gomme xanthane

La gomme xanthane est chargée négativement dès pH 1. Entre ce pH et le p*I* de la β-lg, il alors est possible de former des complexes électrostatiques. Laneuville *et al.* (2000) ont montré par microscopie optique que la taille et la composition des complexes sont fortement influencées par le ratio β-lg : GX. A de faibles ratios protéine : polysaccharide (5 : 1 et 10 : 1), les complexes formés sont petits : 40 % d'entre eux ont une aire inférieure à 20 μm^2. Tandis que pour des ratios plus élevés (15 : 1 et 20 : 1), près de la moitié étaient supérieurs à 300 μm^2. A notre connaissance, la β-lg et la GX ne forment pas de coacervats.

Au niveau interfacial, Baeza *et al*. (2005) ont étudié l'influence de la présence de la GX sur l'adsorption de la β-lg à l'interface air-eau et à pH 7. Ils ont montré que la présence de GX par un mécanisme de compatibilité thermodynamique limitée avec la β-lg entraînait une diminution plus importante de la tension superficielle en comparaison avec la β-lg seule. Les molécules de protéines se concentreraient plus à l'interface en présence de GX par un phénomène de déplétion.

VI. Conclusion

La β-lactoglobuline, la gomme arabique et la gomme xanthane sont trois biopolymères d'origine naturelle qui ont fait l'objet de nombreuses études dans le domaine de la stabilisation d'émulsions. La β-lg est utilisée pour sa capacité, en tant que protéine, à s'adsorber aux interfaces et à diminuer leur tension interfaciale. La gomme arabique est un polysaccharide qui a montré des propriétés tensioactives intéressantes et la gomme xanthane est connue pour ses propriétés épaississantes et viscosifiantes. L'association des protéines et des polysaccharides pour la stabilisation d'émulsions a montré des résultats prometteurs pour améliorer la stabilité des émulsions par rapport aux biopolymères seuls. C'est pourquoi, nous avons choisi dans ce travail de thèse de les combiner afin d'obtenir une synergie.

PARTIE EXPERIMENTALE

La partie expérimentale de ce manuscrit fait suite à la description de l'importante variété de biopolymères susceptibles d'être utilisés pour stabiliser des systèmes colloïdaux comme les émulsions. Nous nous sommes attachés dans le chapitre précédent, notamment, à détailler les connaissances actuelles existant sur les biopolymères utilisés dans cette partie expérimentale.

Dans ce travail expérimental, nous avons, dans un premier temps, caractérisé l'huile ainsi que les différents biopolymères utilisés pour la stabilisation d'émulsion : la β-lg, la GA et la GX (Chapitre 4).

Dans une deuxième étape (Chapitre 5), nous avons développé et caractérisé des émulsions H/E d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique formulées et stabilisées avec la β-lg, la GA et des mélanges β-lg : GA. Cette étape a été menée à un pH de 4,2, permettant l'établissement d'interactions électrostatiques attractives entre la β-lg et la GA et donc leur complexation. Les mécanismes de stabilisation des émulsions ont également été explorés par différentes techniques, notamment de tensiométrie et de rhéologie interfaciale.

Une troisième étape de ce travail a consisté à intégrer un autre polysaccharide, la GX dont le mécanisme de stabilisation est différent de celui de la GA (Chapitre 6). Nous n'avons, dans ce cas, pas souhaité établir d'interactions électrostatiques attractives entre la β-lg et la GX et nous sommes donc placés à pH 7 (pH où les deux biopolymères sont chargés négativement). Des émulsions formulées avec de la β-lg et/ou de la GA ont également été

réalisées afin de permettre une comparaison des mécanismes de stabilisation. Des observations au microscope optique à balayage laser nous ont apporté des informations complémentaires quant aux mécanismes de stabilisation des émulsions par ces différents biopolymères ainsi qu'à leur localisation au sein des émulsions.

Enfin, le dernier chapitre de cette partie expérimentale (Chapitre 7) est consacré à une discussion générale de l'ensemble des résultats.

CHAPITRE 4 - Caractérisation des composants des émulsions.

I. Introduction

Ce chapitre est consacré à la caractérisation analytique de l'huile d'amande douce et des biopolymères utilisés lors de la formulation des émulsions. Cette étude a principalement été réalisée au Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives (LPNSS), en collaboration avec le Dr. Isabelle Le Potier (Equipe 9, UMR CNRS 8612). Trois techniques de caractérisation ont été utilisées pour la β-lg : la chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium et la chromatographie d'exclusion stérique. L'objectif était respectivement de déterminer la pureté de la β-lg et sa masse molaire. Cette protéine ayant préalablement été utilisée par le Dr. Ghozlene Mekhloufi lors de sa thèse (Mekhloufi, 2005), ces analyses avaient également pour but de vérifier l'absence de dégradation du produit au cours du temps. Dans un second temps, la β-lg et la GA ont été conjointement analysées en solution aqueuse par électrophorèse capillaire d'affinité afin d'évaluer la constante d'association du complexe β-lg : GA à pH 4,2. Cette étude a été réalisée par Typhaine du Fou de Kerdaniel à l'occasion d'un stage de master mettant en collaboration le laboratoire de Physique Pharmaceutique (Equipe 3, UMR CNRS 8612) et celui des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives. Les résultats de ce travail ont pu être intégrés à une publication présentée dans le Chapitre 5 suivant. Les GA et GX n'ont pu être caractérisées de part un matériel inadapté à la mesure de masses molaires élevées. Enfin, le dosage de l'azote protéique de la GA par la méthode Kjeldahl a pu être réalisé au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio, ENSAIA-INPL).

II. Matériels et préparation des solutions de biopolymères

1 - Matériels

La β-lactoglobuline (β-lg) (lot n° JE 002-8-992) utilisée lors de ce travail a été fournie par Davisco Foods International Inc. (Etats-Unis). La poudre contenait (en g/100g de poudre humide) : 89,8 % de protéines, 8,8 % d'humidité et 1,4 % de cendres. La composition minérale (en g/100g de poudre) était : Ca^{2+} : 0,079, Mg^{2+} : 0,013, K^{+} : 0,097, Na^{+} : 0,576, Cl^{-} : 0,050 (Mekhloufi, 2005).

La gomme arabique (GA) INSTANTGUM AA nous a été gracieusement fournie par la société CNI (Colloïdes Naturels International, Rouen, France). D'après la fiche technique, la poudre contenait jusqu'à 10 % d'humidité et 4 % de cendres. Le contenu protéique était de 2,5 (m/m) % après détermination par la méthode Kjeldahl.

La gomme xanthane (GX) Satiaxane^{TM} CX 910 (lot 20060134), nous a été généreusement fournie par Degussa (Paris, France). La poudre contenait 7 (m/m) % de protéines, 11 (m/m) % d'humidité et 9 (m/m) % de cendres, d'après la fiche technique du fournisseur.

L'huile d'amande douce (conditionnée dans des flacons de 1 L) utilisée au cours de cette étude a été fournie par la Cooper (Melun, France) (lot 07120145\A). Par souci de simplification, nous l'appellerons « huile » dans le reste de ce document.

L'azoture de sodium (lot K305.2), utilisé comme conservateur, a été fournie par Roth. L'acide chlorhydrique 2 N (lot n° 0C566024) et la soude 0,25 N (lot n° 0C561259) utilisés pour l'ajustement du pH étaient de qualité analytique (Merck).

L'eau utilisée lors des expérimentations était purifiée grâce à un appareil Millipore Synergy 185 couplé avec RiOs5^{TM} d'une résistivité de 18,2 MΩ.cm.

2 - Préparation des solutions de biopolymères

Des solutions de β-lg, GA et GX ont été préparées à 20 ± 1 °C par dispersion de poudres de β-lg, de GA ou de GX dans de l'eau MilliQ à des concentrations massiques variables. Durant au moins 2 heures, une agitation magnétique a été maintenue de façon modérée afin d'éviter la formation de bulles d'air. Seules les solutions de GX ont été chauffées à 60 °C après la dispersion afin d'assurer une complète solubilisation de la gomme. Les solutions ainsi obtenues ont alors été placées au réfrigérateur à 4 ± 1 °C durant une nuit afin de permettre une bonne hydratation des biopolymères.

Le pH des dispersions de β-lg a ensuite été ajusté à 4,8 (pH de solubilité minimale de la β-lg) (Mekhloufi, 2005) avec du HCl 1 N et 0,1 N (pHmètre MeterLab PHM 220 LAB). Les dispersions de β-lg ont ensuite été centrifugées à 10 000 g pendant 30 min à 20 ± 1 °C, afin d'éliminer les particules insolubles ainsi que les agrégats de β-lg (Centrifugeuse Sigma 3K30 Bioblock Scientific). La quantité éliminée suite à cette étape s'élève à environ 10 % (m/m) (Mekhloufi, 2005). Nous avons tenu compte de cette perte de 10 % dans la quantité de poudre dispersée afin d'obtenir la concentration finale désirée. Le pH des dispersions de β-lg a été alors réajusté à 4,2 ou 7,0 suivant les cas, par addition de HCl 1 N et 0,1 N ou de NaOH 0,25 N. Le pH des dispersions de GA et de GX est de la même façon, respectivement ajusté à pH 4,2 et pH 7 sans procéder à une étape de centrifugation.

III. Techniques d'analyses mises en œuvre

1 - Indices d'acide et de peroxyde

La détermination des indices d'acide et de peroxyde a permis de caractériser notre huile d'amande douce. Les méthodes suivies sont celles de la Pharmacopée Européenne 6ème édition, monographies 2.5.1. et 2.5.5. respectivement pour les indices d'acide et de peroxyde.

L'indice d'acide I_A est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g d'huile. Il donne une évaluation de la quantité d'acides gras libres.

L'indice de peroxyde I_P est le nombre qui exprime en milliéquivalents d'oxygène actif la quantité de peroxyde contenue dans 1000 g d'huile. C'est un indicateur du degré d'oxydation des huiles.

Ces déterminations ont notamment pour finalité d'évaluer l'oxydation de l'huile contenue dans un flacon ouvert depuis 10 mois comparée à celle contenue dans un flacon neuf. Les dosages ont été répétés trois fois pour chaque indice.

2 - Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée (RP-HPLC).

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou High Performance Liquid Chromatography (HPLC) est une méthode de séparation analytique de constituants d'un mélange de composés.

Le principe de fonctionnement est représenté sur la Figure 11. Une phase mobile liquide est pompée dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie.

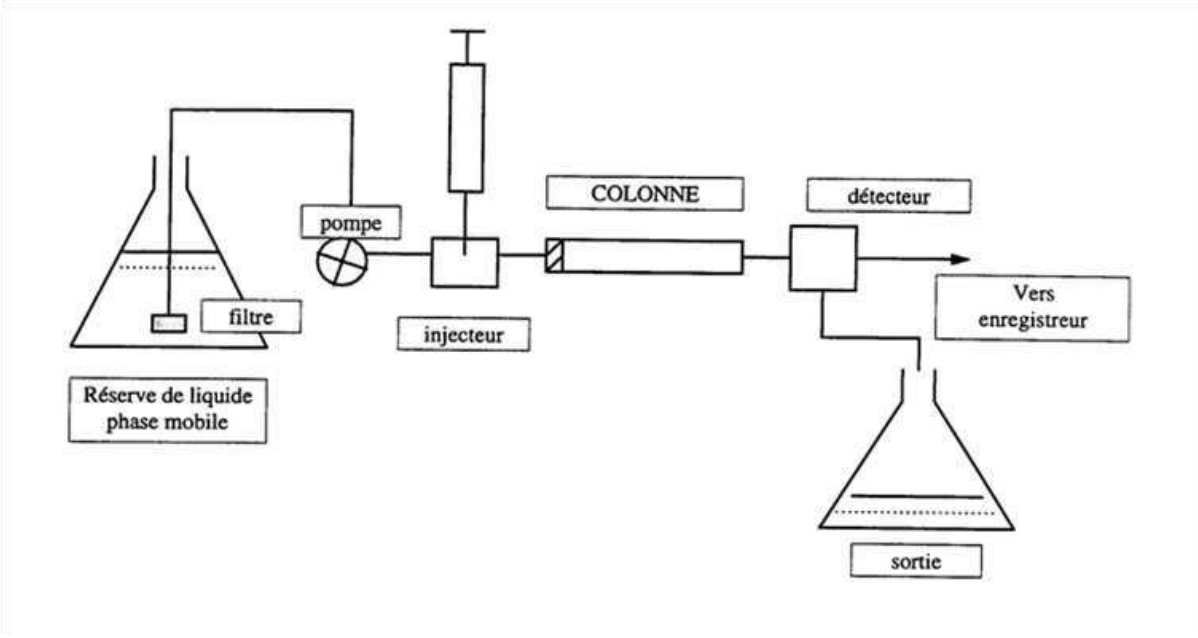


Figure 11 : *Principe de fonctionnement de l'HPLC*

L'échantillon à analyser est injecté dans la phase mobile à l'entrée de la colonne et est ainsi entraîné au sein de cette dernière. Suivant les intéractions entre l'analyte et les phases

stationnaire et mobile, les constituants de l'échantillon sont élués de la colonne à des temps de rétention différents et donc séparés. Un détecteur couplé à un enregistreur permet l'obtention de chromatogrammes comportant des pics qui correspondent aux différents constituants de l'échantillon (Rosset *et al.*, 1991).

Différents modes chromatographiques peuvent être mis en œuvre pour réaliser la séparation des analytes. Plus des trois quart des séparations par HPLC sont réalisées par chromatographie de partage. Dans ce mode chromatographique, des supports à phase greffée, préparés par la réaction d'un organosilane avec les groupements –OH présents sur la surface d'un gel de silice, sont généralement utilisés. Différents groupements fonctionnels organiques (amines, éthers, hydrocarbures…) sont susceptibles d'être greffés permettant d'obtenir une gamme de polarité pour la phase stationnaire. En chromatographie de partage en mode normal, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est un solvant relativement non polaire. En chromatographie en mode inversé, c'est la phase stationnaire qui est non polaire (groupements n-octyle, n-octadécyle…), et la phase mobile est un solvant relativement polaire. En chromatographie en mode normal, le constituant le moins polaire est élué en premier et l'augmentation de la polarité de la phase mobile réduit son temps d'élution. En mode inversé, le constituant le plus polaire est élué en premier et l'augmentation de la polarité de la phase mobile allonge son temps d'élution. Dans notre étude, nous avons sélectionné la chromatographie de phases inversée pour analyser la β-lg, ce mode étant, en effet particulièrement bien adapté à l'analyse de protéines.

Lors de cette étude, le matériel utilisé était constitué d'une pompe à gradient (WATERS 600 Controller), d'un système d'injection (WATERS 717 plus Autosampler), d'une colonne de silice greffée octyle (C8 Discovery® BIO WIDE Pore, 25 cm x 4,6 mm, particules de taille 5 µm). Enfin, le détecteur UV (WATERS 486 Tunable Absorbance Detector) était réglé sur la longueur d'onde de 214 nm en utilisant le système d'acquisition de données EZCHROM (scientific software Inc.).

L'analyse a été réalisée avec un gradient d'élution (Tableau I) obtenu par mélange de deux phases mobiles (A et B) d'acétonitrile (ACN), d'eau MilliQ et d'acide trifluoroacétique (TFA).

Phases mobiles: - A : H_2O/ACN 93/7 v/v contenant 0,1 (v/v) % TFA

- B : H_2O/ACN 7/93 v/v contenant 0,1 (v/v) % TFA

Tableau I : *Gradient d'élution mis en place pour l'analyse en RP-HPLC de la β-lg.*

Temps (min)	Débit (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1	80	20
5	1	80	20
65	1	5	95
66	1	80	20
76	1	80	20
77	1	80	20

Les étalons suivants ont été préparés à 1mg/mL dans de l'eau MilliQ et injectés une fois (V_{inj} = 25 µL) :

- β-lg variant B, L8005-25MG (lot : 097K7011) provenant de chez SIGMA.
- β-lg variants A et B, L-0130 (lot : 124H7045) provenant de chez SIGMA.
- α-lactalbumine (α-la), L5385-25MG (lot : 028K7015) provenant de chez SIGMA.
- Albumine de Sérum Bovin (BSA), A2153-10G (lot : 018K0663) provenant de chez SIGMA.

Nos échantillons de β-lg préparés aux concentrations de 0,1 et 0,5 % et filtrés sur un filtre à seringue (Millipore) de 0,22 µm ont été injectés une fois.

3 - Chromatographie d'Exclusion Stérique.

La chromatographie d'exclusion stérique (Size Exclusion Chromatography en anglais, SEC) ou encore Gel Filtration Chromatography, en anglais (GFC), est une technique de chromatographie en phase liquide permettant la détermination de masses molaires des analytes. Contrairement à l'HPLC, la séparation des constituants n'est pas basée sur l'affinité chimique avec le support, mais sur la taille des molécules de l'échantillon. La Figure 12 montre le principe de séparation au sein d'une colonne de SEC, remplie d'une phase stationnaire inerte composée de particules poreuses.

Ainsi que le montre la Figure 12, les molécules dont le volume hydrodynamique en solution est petit sont capables de pénétrer dans les pores tandis que les plus grosses en sont exclues. Les molécules possédant un volume hydrodynamique élevé (masse molaire élevée) ont un trajet plus direct et donc plus rapide. Les molécules de haute masse molaire sont ainsi éluées plus rapidement que celle de faible masse molaire.

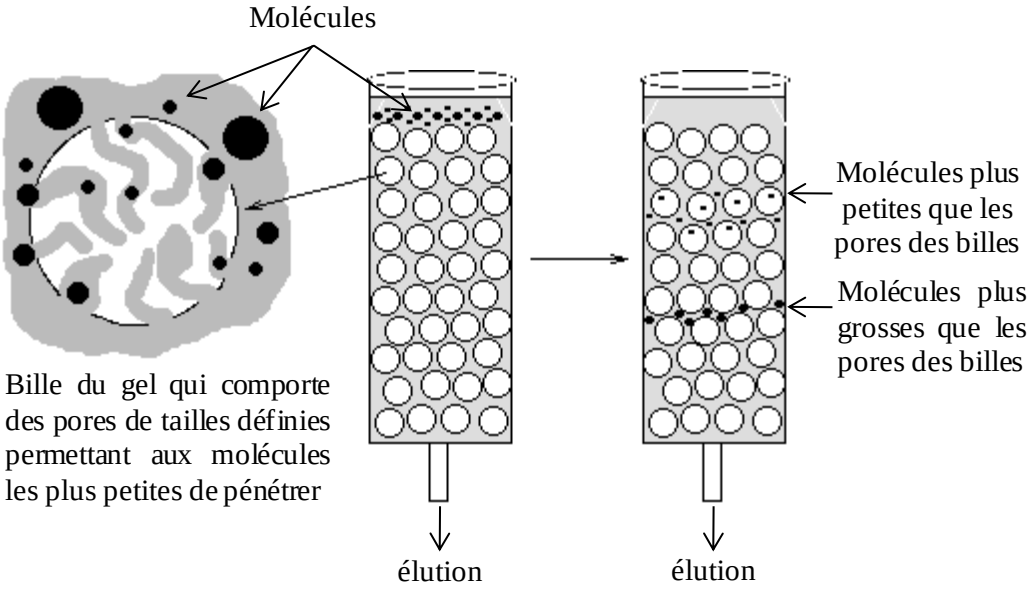


Figure 12 : *Schéma du principe de séparation en chromatographie d'exclusion stérique.*

Lors de cette étude, une colonne TSK Gel 3000SW (N° 3SW321GM0249) (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Allemagne) de dimension 7,5 mm ID x 30 cm L, a été utilisée. La taille des particules était de 10 µm et les pores de 250 Å. La phase mobile était constituée d'un tampon phosphate 0,1 M à pH 7 avec 0,1 M de chlorure de sodium. Afin d'équilibrer le système, le débit de la phase mobile, préalablement dégazée, a été fixé à 0,4 mL/min pendant 12 heures en utilisant une pompe isocratique (Thermo Separation Products Spectra SERIES P100). Pour les analyses, le débit était fixé à 1 mL/min conduisant à une pression de 16 bars. Le détecteur (Thermo Separation Products Spectra SERIES UV100) était réglé sur une longueur d'onde de 280 nm afin de détecter les différents composants élués.

Les étalons suivants ont été préparés à 1 mg/mL dans de l'eau MilliQ et analysés (V_{inj} = 20 µL) dans l'ordre suivant :

- Thyroglobuline, T9145-1VL (lot : 026K6014) provenant de chez SIGMA. M = 669 000 g/mol.

- β-amylase, A7130 provenant de chez SIGMA. M = 200 000 g/mol.

- Alcool deshydrogénase, A8656-1VL (lot : 026K6003) provenant de chez SIGMA. M = 150 000 g/mol.

- Albumine de Sérum Bovin (BSA), A2153-10G (lot : 018K0663) provenant de chez SIGMA. M = 66 000 g/mol.

- Ovalbumine, A5503 provenant de chez SIGMA. M = 46 000 g/mol.

- Anhydrase carbonique, C-7025 (lot : 062K9284) provenant de chez SIGMA. M = 29 000 g/mol.

- Cytochrome C, C7150-1VL (lot : 116K6016) provenant de chez SIGMA. M = 12 400 g/mol.

- Aprotinine, A3886-1VL (lot : 023K6053) provenant de chez SIGMA. M = 6 500 g/mol.

- β-lg variant B, L8005-25MG (lot : 097K7011) provenant de chez SIGMA. $M_{dimère}$ = 36 800 g/mol.

- β-lg variants A et B, L-0130 (lot : 124H7045) provenant de chez SIGMA. $M_{dimère}$ = 36 800 g/mol.

Deux injections ont ensuite été effectuées à partir des deux solutions, préalablement filtrées à travers un filtre de porosité de 0,22 µm, de notre β-lg préparées à une concentration de 0,1 % et aux pH 4,2 et 7,0.

4 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE - SDS).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est une technique qui permet de séparer des protéines en fonction de leur masse molaire. La matrice du gel est formée par la copolymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide en présence de persulfate d'ammonium et de TEMED (NNN'N'-tetraméthyléthylènediamine). La taille des pores formés dépend de la concentration en polyacrylamide. Une concentration élevée entraîne l'obtention de petits pores. Le SDS est un tensioactif anionique puissant qui se lie aux protéines et empêche ainsi leur repliement tout en leur conférant une charge globale négative. La migration des molécules au sein du gel s'effectue sous l'action d'un champ électrique. La masse molaire des protéines sera le seul facteur de séparation : celles de faible masse molaire

seront celles qui migreront le plus loin. Pour permettre l'analyse, les protéines sont compressées puis séparées dans des gels de compression et de séparation, respectivement. Cette technique dite discontinue permet d'augmenter la résolution des bandes. Le Bleu de Coomassie est ensuite couramment utilisé pour colorer les protéines séparées et donc pour les visualiser. Il s'adsorbe sur les acides aminés basiques (principalement l'arginine) et aromatiques.

Dans notre étude, un système de migration verticale Mini-PROTEAN 3 de chez Biorad a été utilisé. Le gel était constitué d'un gel de compression et de séparation à 4,5 % et 12 % d'acrylamide, respectivement. L'échantillon de β-lg à 1 (m/m) % pH 7 est dilué au ½ dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, dithiothreitol (DTT) 0,2 M, 4 % SDS, 0,2 % bleu de bromophénol, 20 % glycérol. Un volume de 5 µL par échantillon est déposé dans les puits du gel. Le tampon de migration utilisé est un tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,8 contenant de la glycine 192 mM et du SDS 0,1 %. La migration a été faite à 180 V constant. La révélation des protéines a été réalisée par une solution de Bleu de Coomassie R250. Les marqueurs de masses molaires sont constitués par un mélange (Perfect Protein 69 149-3, VWR MERCK, EUROLAB) dont les valeurs de masses molaires sont les suivantes : 150, 100, 70, 50, 35, 25 et 15 Kg/mol.

5 - Méthode Kjeldahl

Cette méthode permet le dosage standard de l'azote minéral et organique (protéines, phospho-amino-lipides…) se trouvant dans un produit biologique (AOAC, 1984). La détermination de la quantité d'azote se déroule en trois étapes principales.

La première, appelée minéralisation, nécessite de détruire les composés organiques de façon à obtenir l'ensemble de l'azote sous une même forme minérale. Cette étape s'effectue à chaud en présence d'acide sulfurique concentré et de catalyseurs (K_2SO_4 et $CuSO_4$). Le carbone et l'hydrogène s'éliminent respectivement sous la forme de CO_2 et H_2O, tandis que l'azote reste en solution sous la forme NH_4^+.

La seconde étape comporte une distillation permettant de convertir les sels d'ammonium en ammoniac. Une base forte, la lessive de soude, est ajoutée en excès afin que tout l'azote se trouve sous la forme NH_3.

Enfin, la troisième étape est un dosage acide-base. L'ammoniac est piégé dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré puis titré par une solution étalonnée d'acide fort (HCl ou H_2SO_4).

Un échantillon de GA a été envoyé au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio, ENSAIA-INPL) de Nancy afin de réaliser ce dosage. Trois dosages successifs ont été réalisés. Le calcul de la teneur en protéine à partir de la teneur en azote a été réalisé en multipliant la teneur en azote par un facteur de conversion de 6,66 pour la GA (Schmitt, 2000 ; Mekhloufi, 2005). Il est à noter que dans cette conversion, il n'a pas été tenu compte de la présence d'azote non protéique préalablement contenu dans la poudre.

6 - Electrophorèse Capillaire d'Affinité (ECA)

L'électrophorèse capillaire d'affinité (ECA) permet de déterminer les paramètres d'interaction entre un ligand et un substrat en solution. La méthode repose sur l'électrophorèse capillaire de zone dont le principe est fondé sur la migration au sein d'un capillaire, d'espèces en solution d'un électrolyte support, soumises à l'action d'un champ électrique (Figure 13). En électrophorèse capillaire de zone, la séparation des espèces est basée sur les différences de mobilités électrophorétiques entraînant des variations des vitesses de migration des espèces au sein du capillaire. Le mécanisme de séparation est principalement basé sur la taille et la charge du soluté à un pH donné.

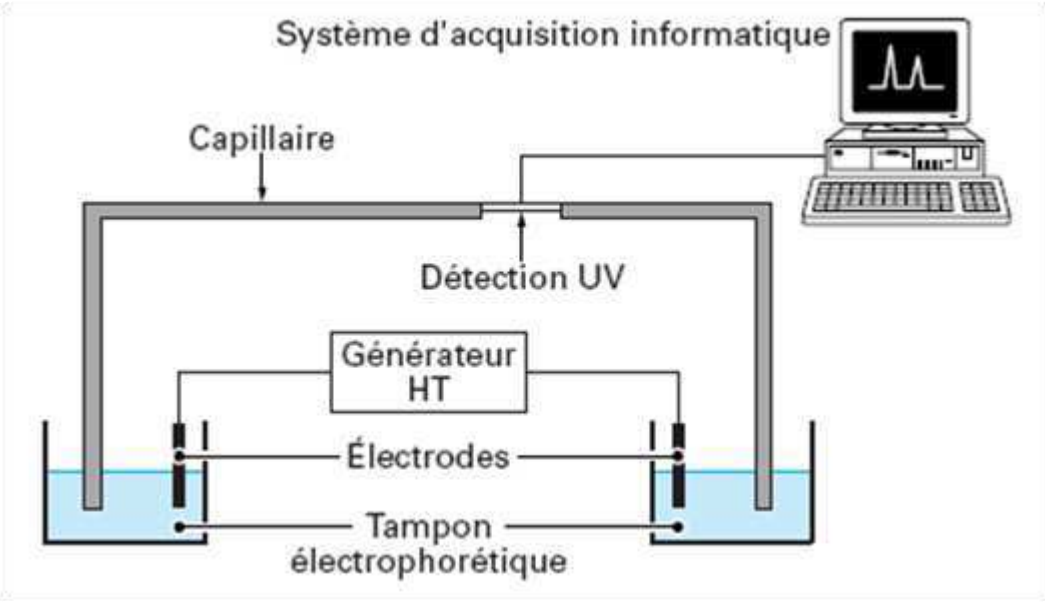


Figure 13 : *Principe de fonctionnement de l'électrophorèse capillaire (Le Potier et al., 2003).*

L'ECA consiste à conditionner le capillaire avec un électrolyte contenant un ligand. Un faible volume de substrat est ensuite injecté dans le capillaire. La mobilité électrophorétique du substrat (μ_{epS}) est modifiée lorsqu'il se complexe avec le ligand. Cette variation dépend des constantes globales de formation, de la mobilité des complexes formés et de la concentration en ligand libre dans la zone du substrat. La mobilité du substrat est déterminée à l'aide du temps de migration.

L'ECA ne peut être appliquée qu'à certaines conditions :

- L'équilibre entre les formes complexées et non complexées doit être atteint pendant la durée de l'analyse.
- La quantité de ligand doit être suffisamment élevée afin que la variation de la concentration en ligand libre soit négligeable.
- Les sites d'interaction doivent être homogènes et régulièrement distribués sur le substrat.
- Les interactions du substrat et du ligand avec les parois du capillaire ne doivent pas influencer les interactions du complexe.
- Le courant électrique et les constituants du tampon d'analyse (tampon, pH, force ionique) ne doivent pas modifier l'affinité du ligand pour le substrat (Dribek, 2006 ; Heegard *et al.*, 1998).

L'équation 3 décrit l'équilibre de complexation entre le substrat et le ligand

$$[S] + [L] \underset{K}{\leftrightarrow} [SL] \qquad \text{Equation 3}$$

avec [S] la concentration en substrat libre, [L] celle en ligand libre et [SL] celle du complexe substrat:ligand.

Il est possible de définir une constante de complexation K telle que :

$$K = \frac{[SL]}{[S][L]} \qquad \text{Equation 4}$$

Dans le cas d'une interaction monomoléculaire, on a

$$[S]_t = [S] + [SL] \qquad \text{Equation 5}$$

avec $[S]_t$ la concentration totale en substrat.

La variation de mobilité électrophorétique du substrat (μ_{epS}) est fonction de la constante de complexation K du substrat par le ligand et de la mobilité du complexe formé (Equation 6).

$$\nu \times \mu_{epS} = \frac{[S]}{[S]_t} \times \mu_{epS,0} + \frac{[SL]}{[S]_t} \times \mu_{epSL} \qquad \text{Equation 6}$$

où :

ν : Facteur correctif (de viscosité et de force ionique, expliqué ci-après)

μ_{epS} : Mobilité électrophorétique du substrat en présence de ligand

$\mu_{epS,0}$: Mobilité électrophorétique du substrat en l'abscence de ligand

μ_{epSL} : Mobilité électrophorétique du complexe substrat:ligand formé

En combinant les équations 4 et 6, on obtient l'équation suivante :

$$\nu \times \mu_{epS} = \frac{\mu_{epS,0} + \mu_{epSL} \times K \times [L]}{1 + K \times [L]} \qquad \text{Equation 7}$$

L'équation 7 représente l'isotherme d'association du complexe. Celle-ci peut être ajustée de façon non-linéaire, ou être transformée selon les méthodes x-réciproque, y-réciproque et double-réciproque en vue d'un ajustement linéaire par la droite d'équation $y = ax + b$. Les réarrangements de l'isotherme aboutissent aux expressions rassemblées dans le tableau II.

Tableau II : *Caractéristiques des représentations de l'isotherme et accès aux paramètres K et μ_{epSL} du système. Ajustement n.l. : paramètre obtenu par ajustement non-linéaire ; a et b : respectivement coefficient directeur et ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire obtenue dans le cas des méthodes de linéarisation (La Saux, 2004).*

Méthode	Coordonnées transformées y'=f(x')	K	μ_{epSL} - $\mu_{epS,0}$
Isotherme	$\nu \times \mu_{epS} = \frac{\mu_{epS,0} + \mu_{epSL} \times K \times [L]}{1 + K \times [L]} = f([L])$	Ajustement n.l	Ajustement n.l
x-réciproque	$\frac{\nu \times \mu_{epS} - \mu_{epS,0}}{[L]} = -K(\nu \times \mu_{epS} - \mu_{epS,0}) + K(\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}) = f(\nu \times \mu_{epS} - \mu_{epS,0})$	-a	b/a
y-réciproque	$\frac{[L]}{\nu \times \mu_{epS} - \mu_{epS,0}} = \frac{[L]}{\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}} + \frac{1}{K(\mu_{epSL} - \mu_{epS,0})} = f([L])$	a/b	1/a
double-réciproque	$\frac{1}{\nu \times \mu_{epS} - \mu_{epS,0}} = \frac{1}{K(\mu_{epSL} - \mu_{epS,0})} \times \frac{1}{[L]} + \frac{1}{\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}} = f([L^{-1}])$	b/a	1/b

Cette méthode implique que la variation de mobilité observée ne doit être due qu'à la complexation par le ligand. Il est donc nécessaire de corriger la variation de mobilité observée à l'aide du facteur correctif ν, qui reflète la variation de force ionique et de viscosité de l'électrolyte à mesure que la concentration en ligand augmente. Lorsque le ligand est neutre ou faiblement concentré comparé à l'électrolyte, il est possible de ne tenir compte que de la variation de viscosité (Tanaka, 2002).

Le facteur correctif se réduit alors à :

$$\nu = \frac{\eta_i}{\eta_0} \qquad \text{Equation 8}$$

où η_i et η_0 sont respectivement les viscosités de l'électrolyte en présence et en l'absence de ligand.

Dans notre étude, nous avons déterminé la constante d'interactions entre la β-lg et la GA. La gomme a été introduite dans l'électrolyte conditionnant le capillaire et a donc été considérée comme le ligand, tandis que la protéine, injectée, était le substrat. La Figure 14 montre le sens de migration des espèces au sein du capillaire à pH 4,2, lorsque la séparation se fait de l'anode vers la cathode. Pour les conditions d'analyses, on se reportera à la partie Matériels et Méthodes de l'article au Chapitre 5.

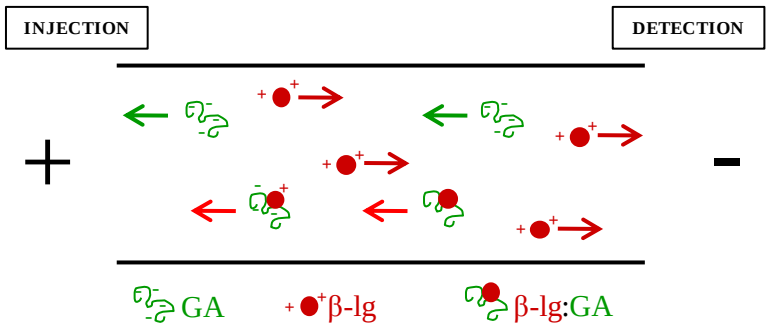


Figure 14 : *Schéma des mobilités apparentes de la β-lg, de la GA et du complexe β-lg:GA au cours de l'analyse par électrophorèse capillaire d'affinité à pH 4,2.*
Les flèches montrent le sens de migration des espèces au sein du capillaire.

IV. Résultats et Discussion

1 - Indices d'acide et de peroxyde

Les indices d'acide et de peroxyde obtenus pour un flacon d'huile d'amande douce nouvellement ouvert et un flacon ouvert depuis 10 mois (même lot) sont présentés dans le Tableau III.

Tableau III : *Indices d'acide (I_A) et de peroxyde (I_P) de l'huile d'amande douce.*

	Huile nouvellement ouverte	Huile ouverte depuis 10 mois	Données du fournisseur	Spécifications du fournisseur	
				Min.	Max.
I_P (mEq d'oxygène actif/Kg d'huile)	6	10	11	0	15
I_A (mg de KOH/g d'huile)	1	1	0,7	0	2

L'ouverture du flacon d'huile d'amande douce ne semble pas avoir modifié l'I_A. L'I_P, quant à lui, augmente lorsque l'huile a été ouverte depuis 6 mois. Il reflète l'oxydation qui s'est produite du fait que la surface de l'huile a été en contact avec l'air. Cependant, cette modification reste proche de la donnée du fournisseur et la valeur obtenue se trouve toujours dans l'intervalle de spécifications du fournisseur. L'huile utilisée pour la formulation des émulsions a donc été considérée comme globalement inchangée même après 10 mois d'ouverture. Suite à cette étude, chaque flacon d'huile a été conservé au maximum 10 mois après ouverture.

2 - Chromatographie Liquide Haute Performance à polarité de phases inversée (RP-HPLC).

La chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée de la β-lg montre que l'échantillon de β-lg n'est pas pur et qu'il contient notamment de l'α-lactalbumine (α-la) (Figure 15). Ceci s'explique par le fait que ces deux protéines ont des masses molaires

proches (14 000 et 18 400 g/mol, respectivement pour l'α-la et la β-lg) et qu'il est donc difficile de l'éliminer totalement lors de la séparation des protéines du lactosérum. L'analyse de l'échantillon montre la présence en proportions voisines des deux variants A et B de la protéine. A priori, notre échantillon ne semble pas contenir de BSA. Lorsque l'on compare ces résultats avec ceux que le Dr. Mekhloufi avait obtenus (Mekhloufi, 2005) sur ce même échantillon, les profils sont cohérents. La seule différence qui est à noter est la présence d'un petit pic de BSA. Ce pic est élué juste après l'α-la tandis que dans notre cas, le standard est élué environ 2 minutes avant. Ceci nous amène à penser que notre échantillon n'en contient plus par un processus de dégradation ou bien que la sensibilité de détection dans nos conditions expérimentales n'est pas suffisante pour détecter la BSA.

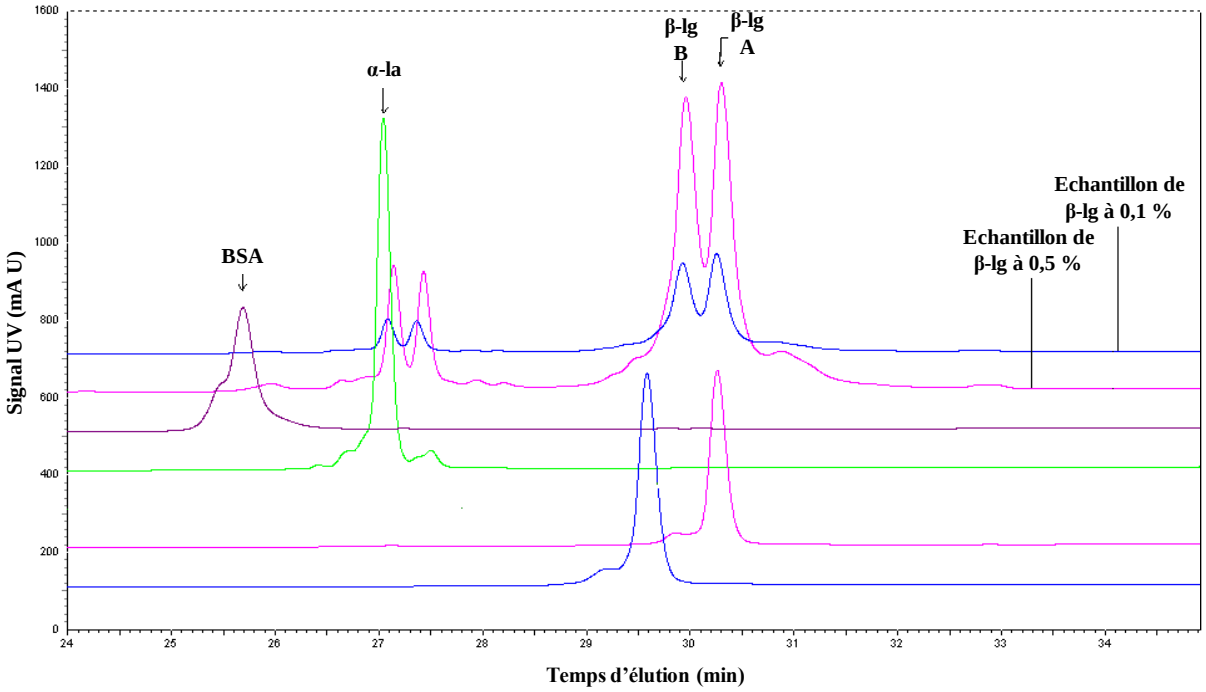


Figure 15 : *Chromatogrammes obtenus par RP-HPLC pour la poudre de β-lg à des concentrations de 0,1 et 0,5 (m/m) %, et pour les standards de BSA, d' α-la et les variants A et B de la β-lg à 1 mg/mL.*

3 - Chromatographie d'Exclusion Stérique.

La chromatographie d'exclusion stérique nous a permis de confirmer la valeur de la masse molaire de la β-lg dans notre échantillon. Le Tableau IV montre les différents temps de

rétention qui ont été obtenus pour les standards. La Figure 16 montre ensuite la droite qui a pu être tracée en représentant le logarithme de la masse molaire en fonctions du temps de rétention (Tr) pour chaque standard. L'exploitation de cette droite de régression linéaire nous a ensuite permis d'estimer la masse molaire de notre protéine.

Deux pics ont été obtenus pour notre échantillon à des temps de rétention de 8,90 et 9,82 min. Ils correspondent respectivement au dimère (36 900 g/mol) et au monomère (18 100 g/mol) de la protéine. L'aire relative du dimère était de 75 % et celle du monomère de 25 %. Il est intéressant de noter que les variants A et B ont des temps de rétention très proches. Ceci confirme que leurs masses molaires sont identiques malgré les quelques acides aminés qui diffèrent entre les deux variants (Meza-Nieto *et al.*, 2007).

Tableau IV : *Temps de rétention (Tr) obtenus pour les standards de différentes masses molaires par chromatographie d'exclusion stérique.*

Echantillons	**M (g/mol)**	**Tr moyen (min)**
Thyroglobuline	669 000	5,17
β-amylase	200 000	6,71
Alcool Deshydrogénase	150 000	7,30
BSA	66 000	7,86
Ovalbumine	46 000	8,58
β-lg B	36 800	8,84
β-lg A + B	36 800	8,87
Anhydrase carbonique	29 000	9,52
Cytochrome C	12 400	10,40
Aprotinine	6 500	11,00

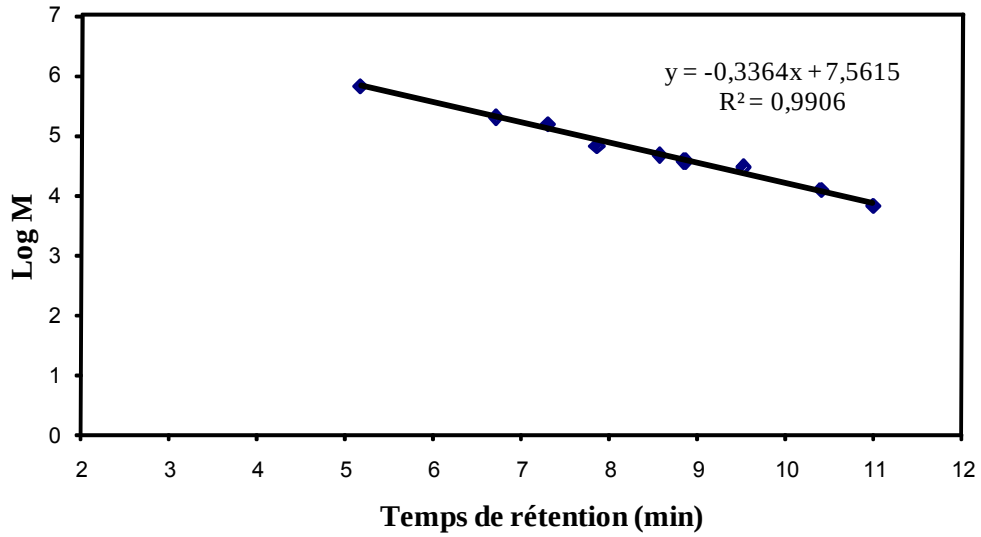


Figure 16 : *Variation du logarithme de la masse molaire des standards en fonction de leur temps de rétention.*

4 - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE – SDS).

Le profil électrophorétique de notre échantillon de β-lg (Figure 17) met principalement en évidence la β-lg sous sa forme monomérique (18 400 g/mol) du fait des conditions dénaturantes. Une bande est détectée pour une masse molaire plus faible et correspond probablement à l'α-la (~ 14 000 g/mol) déjà mise en évidence en RP-HPLC. La BSA (~ 67 000 g/mol) en revanche n'est toujours pas détectée contrairement à ce qu'avait pu observer le Dr. Mekhloufi dans sa thèse lors de l'analyse par RP-HPLC de la même poudre (Mekhloufi, 2005).

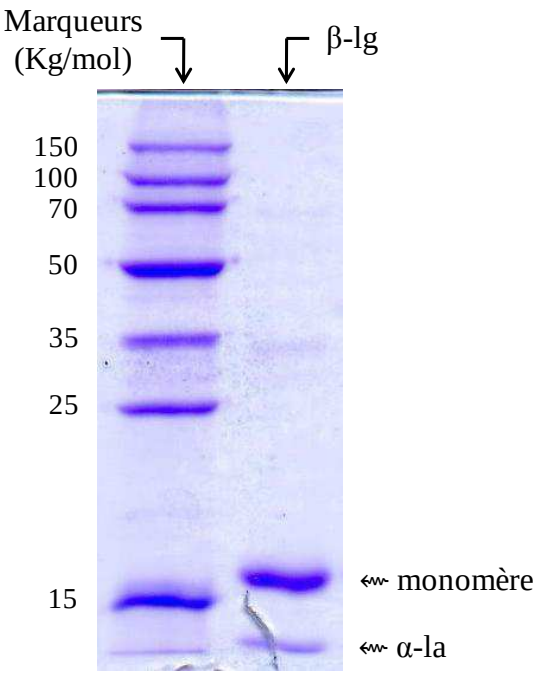


Figure 17 : *Profil électrophorétique en gel PAGE-SDS de notre échantillon de β-lg et des marqueurs de masses molaires.*

5 - Méthode Kjeldahl

Le Dr. Claire Gaiani et Mme Carole Jeandel du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio, ENSAIA-INPL) de Nancy, sont vivement remerciées pour les résultats qu'elles ont pus nous fournir (Tableau V).

Tableau V : *Résultats du dosage de l'azote obtenus par la méthode Kjeldahl et quantité de protéine correspondante.*

Biopolymères	Quantité d'azote (g/100 g)	Facteur de conversion	Quantité de protéines (%)
β-lg	14,08	6,38	89,8*
GA	0,37	6,66	2,5

* Résultat du Dr. Mekhloufi (2005).

La valeur obtenue pour la GA est nettement inférieure à celle de la β-lg, mais elle reste logique compte tenu qu'elle correspondrait à la fraction protéique de la gomme capable de s'adsorber aux interfaces.

6 - Electrophorèse Capillaire d'Affinité (ECA)

Nous remercions Typhaine du Fou de Kerdaniel pour son travail de master réalisé en collaboration avec le Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives (Equipe 9, UMR CNRS 8612). Le détail des résultats obtenus se trouve dans la partie Résultats et Discussion de l'article du Chapitre 5. La constante d'association obtenue entre la β-lg et la GA à pH 4,2 est de $K = (1,2 \pm 0,2) \times 10^8\ M^{-1}$. Ce résultat est en accord avec celui de Schmitt *et al.* (2005) qui ont obtenu une valeur de $(1,4 \pm 0,7) \times 10^7\ M^{-1}$ par calorimétrie de titration isotherme sur ce même système. Ces valeurs montrent bien la très forte association de ces deux biopolymères au pH 4,2 étudié.

V. Conclusion

Ce chapitre a été dédié à la caractérisation analytique de l'huile et des biopolymères. Nous avons montré que l'huile variait peu après ouverture d'un flacon et ce pendant une période de 10 mois. Il a été montré que la β-lg est présente dans notre échantillon sous la forme de deux variants A et B qui peuvent se trouver sous la forme de monomère ou de dimères suivant les conditions environnementales. Une impureté, l'α-la, a été identifiée en RP-HPLC et PAGE-SDS. Le dosage de l'azote a permis d'accéder au contenu protéique de notre poudre de GA. Enfin, la GA est capable de se complexer avec une grande affinité à la β-lg comme l'a montré l'analyse par ECA. La GX a été utilisée sans caractérisation autre que celle du fournisseur par manque de temps. Pour la suite de ce travail, il n'a pas été fait de purification supplémentaire sur les biopolymères hormis la centrifugation pour la β-lg. L'objectif était de se rapprocher de l'utilisation industrielle des biopolymères qui évite au maximum les traitements longs et coûteux.

CHAPITRE 5 - Formulation d'émulsions avec la β-lactoglobuline et la gomme arabique : mécanisme de stabilisation et comportement interfacial des biopolymères.

I. Introduction - résumé

Ce chapitre s'intéresse tout d'abord aux potentialités de la β-lg et de la GA pour la stabilisation d'émulsions car ce sont deux biopolymères d'ores et déjà très étudiés dans le domaine agroalimentaire. Nous avons dans un premier temps formulé des émulsions avec ces biopolymères puis dans un second temps étudié le mécanisme par lequel ils permettent la stabilisation d'émulsions. Cette seconde étape s'est fortement appuyée sur des mesures de tension et de rhéologie interfaciales.

Nous nous sommes ici intéressés à la formulation d'émulsions huile-dans-eau stabilisées avec la β-lg, la GA et les mélanges β-lg : GA. L'association des deux biopolymères (à un pH de 4,2 permettant leur complexation) avait pour but d'améliorer la stabilité des émulsions comparées à celles stabilisées par l'un ou l'autre des biopolymères. L'influence de différents paramètres a été évaluée, notamment celle de la concentration massique totale en biopolymères (0,5 ou 2,5 %), du ratio massique protéine : polysaccharide (2 : 1 ou 1 : 2) et du protocole de formulation (ordre d'incorporation des différents biopolymères). Trois protocoles d'émulsification ont ainsi été mis en œuvre. Le premier consistait à formuler l'émulsion à l'aide d'une solution mixte de β-lg : GA. Le second comportait la formulation d'une émulsion primaire stabilisée par de la GA à laquelle était ensuite ajoutée une solution de β-lg pour obtenir l'émulsion finale. Enfin, dans le troisième protocole, une émulsion stabilisée par de la β-lg était tout d'abord formulée et une solution de GA était ajoutée par la suite.

Dans ce travail, il a été montré que la β-lg permet de formuler des émulsions dès la concentration de 0,5 %. La GA, quant à elle, nécessite des concentrations d'au moins 2,5 % pour l'obtention d'une émulsion plus stable dans le temps. L'association β-lg : GA n'a permis de formuler des émulsions que dans le cas du dernier protocole : lorsque la gomme a été ajoutée à une émulsion préalablement stabilisée par la β-lg.

Des mesures de tension et de rhéologie interfaciales ont également été effectuées afin de mieux comprendre les mécanismes régissant la stabilisation des émulsions avec ces biopolymères. Les films interfaciaux de β-lg et de GA ont montré un comportement élastique. La β-lg, la GA et les complexes β-lg : GA sont tous capables de diminuer la tension interfaciale de façon significative. Dans l'ordre de l'activité surfacique après 24 heures, on a : β-lg : GA > β-lg ≥ GA. La GA met plus de temps à diffuser vers l'interface mais atteint *in fine* l'activité surfacique de la β-lg. Le mécanisme de stabilisation dans le cas de l'émulsion formulée avec le troisième protocole a pu être élucidé. La β-lg s'adsorbe tout d'abord à l'interface et lorsque la GA est ajoutée, elle vient interagir de façon électrostatique avec la première couche de β-lg adsorbée formant ainsi une seconde couche protectrice autour du globule. Cette association interfaciale sous forme de double couche était recherchée afin d'améliorer la stabilité des émulsions comparée à celle formulée uniquement avec la β-lg par exemple. Ce n'est pourtant pas ce qui a pu être observé, probablement pour des raisons de floculation par déplétion ou pontage, du fait de la présence de la GA. Des expériences supplémentaires sont donc à réaliser afin de déterminer les conditions expérimentales optimales permettant d'améliorer la stabilité des émulsions de β-lg par l'ajout de GA.

Il est à noter que certains de ces résultats ont également donnés lieu à une publication nationale dans *Les Cahiers de Formulation* n°15, qui est présentée en annexe.

Ce chapitre comprend tout d'abord une description des différentes techniques de caractérisation utilisées. Dans un second temps, l'influence d'un conservateur sur l'abaissement de la tension interfaciale par les biopolymères a été évaluée. Un article scientifique publié en 2010 dans *Journal of Colloid and Interface Science* est ensuite présenté. Enfin, une dernière partie de ce chapitre présente une étude complémentaire sur la diffusion de la β-lg à l'interface huile-eau.

II. Techniques d'analyses mises en œuvre

L'ensemble des techniques utilisées lors de l'étude du mécanisme de stabilisation d'émulsions par la β-lg, la GA et les mélanges β-lg : GA est détaillé et leur principe décrit dans cette section.

1- Mesure du potentiel zêta (ζ)

Cette technique de mesure est basée sur le fait que, habituellement, les gouttelettes contenues dans une émulsion sont chargées, en particulier si les molécules adsorbées à l'interface le sont. Cette méthode peut aider à prévoir si l'émulsion est sujette à la floculation car sa stabilité est fortement dépendante de la charge électrique existante à l'interface entre les deux phases. De façon générale, la charge effective d'une particule ou d'une gouttelette suspendue dans l'eau diffère de sa charge réelle du fait des contre-ions présents en solution. Les contre-ions les plus proches de la particule y sont fortement retenus par attraction électrostatique. Ils constituent la couche de Stern, qui se déplace de façon solidaire avec la particule, abaisse sa charge réelle et forme autour d'elle une sorte d'écran protecteur. La concentration en contre-ions diminue rapidement quand on s'éloigne de la particule pour atteindre la concentration d'équilibre en solution. Il existe donc une deuxième couche appelée couche diffuse qui n'adhère pas à la particule, mais qui forme un nuage autour d'elle et s'estompe à une certaine distance de celle-ci (Figure 18) (Tardat-Henry et Beaudry, 1992). Le potentiel électrostatique V décroît de manière exponentielle lorsque l'on s'éloigne de la surface de la particule, jusqu'à parfois atteindre une valeur nulle au cœur de la solution.

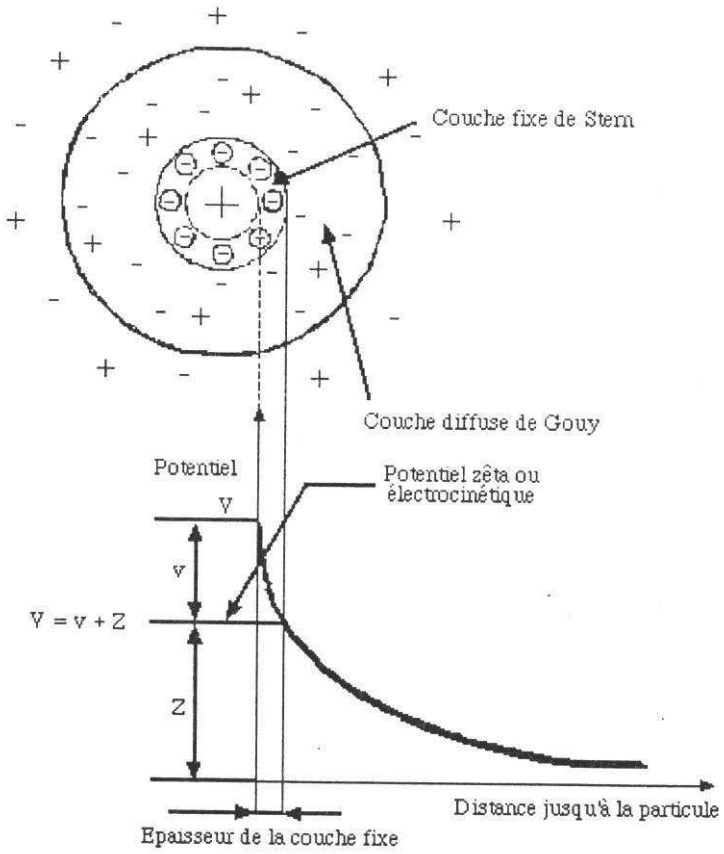


Figure 18 : *Représentation schématique de la double couche et du potentiel ζ pour une particule chargée positivement (Tardat-Henry et Beaudry, 1992).*

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Angleterre). Ces mesures se font sur le principe de la technique « laser Doppler anemometry ». Celle-ci consiste à provoquer la migration des particules d'un échantillon contenu dans la cellule de mesure en appliquant une tension alternative entre deux électrodes. Lors du déplacement des particules dans un champ électrique, les contre-ions spécifiquement adsorbés dans la couche de Stern sont entraînés avec celle-ci. La lumière diffusée par les particules est combinée avec un faisceau de référence permettant ainsi la formation d'un signal d'intensité fluctuant et proportionnel à la vitesse des particules. La mobilité électrophorétique μ_{ep} ($\mu m.cm.s^{-1}.V^{-1}$) est calculée en appliquant la théorie de von Smoluchowski modifiée par Henry (Hunter, 1986) selon l'équation 9, où v est la vitesse des particules ($\mu m.s^{-1}$) et E le champ électrique appliqué ($V.cm^{-1}$). Le potentiel zeta (ζ) peut ensuite être calculé par l'application de l'équation 10 de Henry (Hunter, 1986) :

$$\mu_{ep} = \frac{v}{E}$$ Equation 9

$$\mu_{ep} = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta}$$ Equation 10

où ε la constante diélectrique du liquide, η sa viscosité et f(ka) la fonction de Henry prenant la valeur de 1,5 dans le cas de l'approximation de Smoluchowski.

Le potentiel ζ ou potentiel électrocinétique correspond au potentiel au niveau de la surface de cisaillement c'est-à-dire au niveau de la couche de Stern. Une valeur élevée, en valeur absolue, du potentiel ζ empêche la floculation. A l'inverse, une valeur proche de zéro permet aux particules de se rapprocher les unes des autres et de floculer.

Dans cette étude, un Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Angleterre) équipé d'un laser de longueur d'onde λ = 633 nm et d'un angle de détection de 90 ° a été utilisé en collaboration avec le Dr. Sylviane Lesieur (Equipe 2 : Physico-chimie des systèmes polyphasés, UMR CNRS 8612). Pour plus de détails sur les systèmes étudiés, voir la publication à la section IV de ce chapitre.

2 - Analyse de la taille des particules

La taille des gouttelettes des émulsions a été étudiée grâce à deux techniques différentes : la diffraction laser et la diffusion dynamique de la lumière.

2-1 - Diffraction laser

Cette technique consiste à exposer des particules à un faisceau de lumière monochromatique. La lumière est diffractée par les particules avec des intensités variables sous différents angles et des détecteurs récupèrent ce signal sous la forme d'un profil de

diffraction (anneaux concentriques) à analyser (Figure 19). L'intensité de la diffraction est décroissante en fonction de l'angle. L'angle de diffraction est inversement proportionnel à la taille de la particule. Les données brutes sont ensuite transformées, à l'aide d'un modèle optique approprié, en distribution granulométrique. Traditionnellement, deux modèles différents peuvent être utilisés : l'approximation de Fraunhofer et la théorie de Mie. L'approximation de Fraunhofer était principalement appliquée dans les premiers granulomètres laser en raison de la simplicité des calculs. En effet, pour ce modèle, il n'est pas nécessaire de connaître les propriétés optiques de l'échantillon à analyser, seul l'indice de réfraction du dispersant est introduit pour le calcul. La théorie de Mie, quant à elle, nécessite de connaître aussi bien les indices de réfractions réel et imaginaire des particules, que l'indice de réfraction du milieu de dispersion. De plus, la théorie de Mie permet d'analyser une plus large gamme de tailles (< 50 µm) par rapport à l'approximation de Fraunhofer. Ces deux modèles se basent néanmoins sur une approximation commune qui est que les particules à analyser sont supposées sphériques. Il est important de noter que pour cette technique de diffraction de la lumière, il est essentiel que l'échantillon soit dilué de façon à ne pas avoir de la diffusion multiple lors de l'analyse.

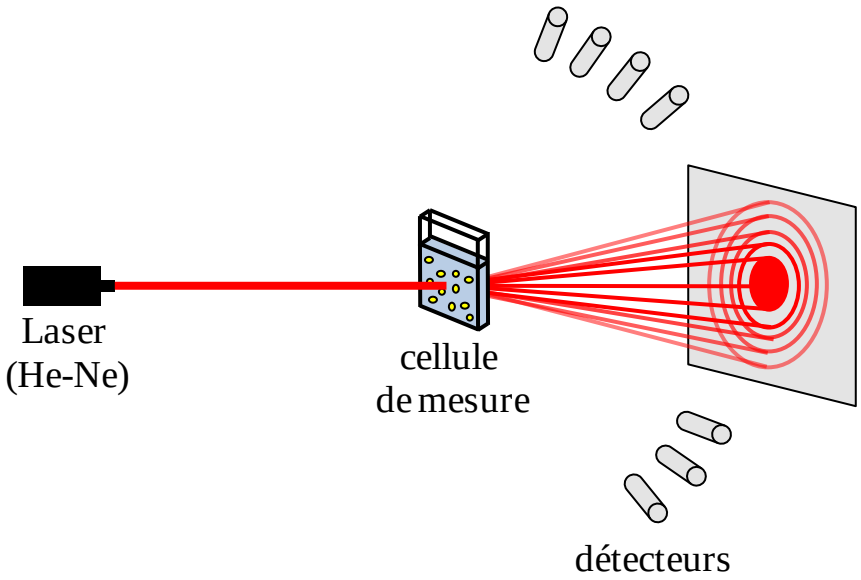


Figure 19 : *Principe d'analyse de la taille de particules d'un échantillon par diffraction de la lumière laser.*

Dans cette étude, nous avons utilisé un granulomètre laser Mastersizer S (Malvern Instruments, Angleterre) version banc long. Le laser était de type He-Ne d'une puissance de 5 mW et d'une longueur d'onde de 632,8 nm. La cellule de mesure était de 0,5 mm d'épaisseur sur laquelle une lentille optique (300RF) de distance focale 45 mm a été montée. La plage granulométrique couverte était de 0,05 à 900 µm. Les données brutes provenant de l'unité optique ont été traitées par le logiciel *Sizer Sv2.17* (Malvern Instruments, Angleterre) selon la théorie de Mie. Pour plus de détails, voir la publication à la section IV de ce chapitre.

2-2 - Diffusion dynamique de la lumière

Le principe de la diffusion dynamique de la lumière repose sur l'interprétation des variations d'intensité de la lumière diffusée lors de son interaction avec les particules, elles-mêmes soumises au mouvement Brownien. L'interprétation de ces variations se fait par le biais d'une fonction de corrélation, et sachant que le coefficient de diffusion des particules (D) peut être relié à leur taille grâce à l'équation de Stockes-Einstein (Equation 11).

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \qquad \text{Equation 11}$$

avec R_h, le rayon hydrodynamique, k_B la constante de Boltzmann, T la température absolue et η la viscosité.

Les grosses particules bougeant doucement leur intensité fluctuera lentement, et inversement. Il est alors possible d'obtenir une distribution de taille en intensité. Le diamètre obtenu est le diamètre hydrodynamique.

Dans le cadre de cette thèse, la mesure a été effectuée à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Angleterre) en collaboration avec le Dr. Sylvianne Lesieur (Equipe 2, UMR CNRS 8612) et a permis d'obtenir le diamètre hydrodynamique des globules. Les mesures ont été réalisées sur 1,2 mL d'échantillon, à 25 °C, et dans des cuves de 1 cm^2 de section. L'intensité de lumière diffusée a été détectée à un angle fixé à 90 °.

3 - Mesure de la tension interfaciale

La tension interfaciale est l'énergie libre par unité de surface entre deux liquides (Cabane et Hénon, 2003). Elle est nommée tension superficielle lorsque l'un des deux liquides est gazeux. La mesure de cette tension interfaciale s'effectue à l'aide d'un tensiomètre. De ce fait, deux techniques principales ont été utilisées lors de notre étude : les méthodes de la lame de Wilhelmy et de la goutte pendante.

Dans le cas de la méthode de la lame, le liquide est amené au contact d'une lame de platine (Pt), elle-même reliée à une balance de précision (Figure 20). La force (F) nécessaire à l'arrachement de la lame est mesurée afin de déterminer la tension interfaciale (γ) (selon l'équation 12).

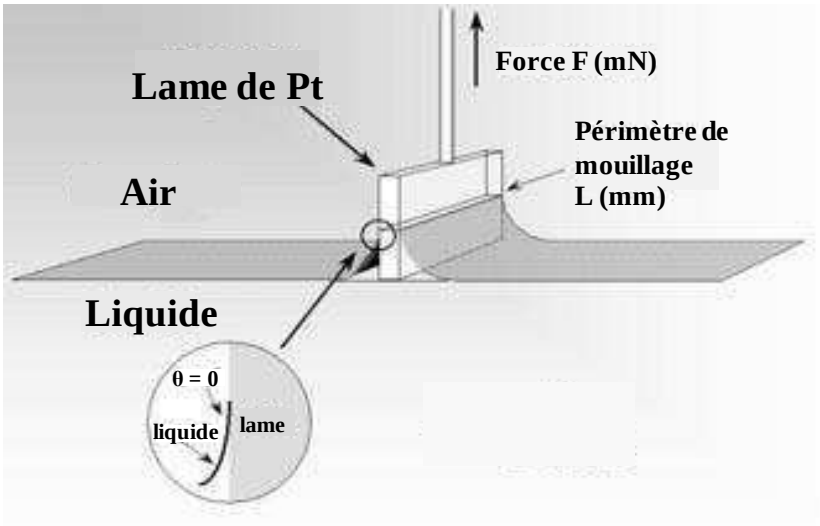


Figure 20 : *Représentation schématique de la méthode de la lame de Wilhelmy (adapté du site internet Krüss, 2010).*

$$\gamma = \frac{F}{L\cos\theta} \qquad \text{Equation 12}$$

avec L le périmètre de mouillage et θ l'angle de mouillage (Figure 20). Dans les conditions de mouillage parfait, l'angle θ est considéré comme nul, son cosinus étant ainsi égal à 1.

Un tensiomètre à lame de Wilhelmy (Digital tensiometer K10ST Krüss, Hamburg, Allemagne) a été utilisé lors de ce travail en collaboration avec le Pr. Véronique Rosilio et le Dr. Catherine Ringard (Equipe 1 : Physico-chimie des surfaces, UMR CNRS 8612). Pour les mesures de tensions interfaciales, l'huile a été délicatement rajoutée à la surface de la phase aqueuse de façon à totalement immerger la lame (Figure 21). Le zéro a été effectué préalablement à la mesure en immergeant la lame de Wilhelmy dans l'huile. Pour plus de précision sur les conditions expérimentales, se référer à la partie IV de ce chapitre.

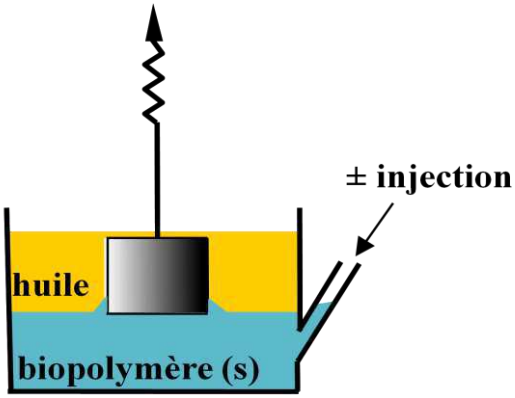


Figure 21 : *Représentation schématique de la mesure de la tension interfaciale avec la méthode de la lame de Wilhelmy.*

Dans le cas de la méthode de la goutte pendante, les tensions superficielles et interfaciales sont déterminées à partir de la géométrie d'une goutte partiellement expulsée de l'extrémité d'une aiguille. La forme de la goutte dépend des forces interfaciales (décrites par la loi de Laplace - Equation 2, Chapitre 1) et gravitationnelles. Les premières tendent à donner à la goutte une forme sphérique tandis que les secondes tendent à l'allonger, si bien que sa forme d'équilibre ressemble à celle d'une ampoule. Il est alors possible de déterminer la tension interfaciale (ou superficielle) en fonction de la forme de la goutte et en tenant compte de la différence de densité entre les deux milieux. Le profil géométrique de la goutte est mesuré par analyse d'images. Le nombre de pixel/mm peut être évalué à partir du diamètre de l'aiguille (Le Neindre, 1993). Cette méthode est également valable dans le cas d'une goutte montante si la différence de densité l'impose. L'aiguille est alors recourbée à 180°.

Lors de cette étude, un tensiomètre à goutte Drop Shape Analysis System DSA 100 (Krüss, Hamburg, Allemagne) a été utilisé en collaboration avec le Pr. Véronique Rosilio et le Dr. Catherine Ringard. Les analyses ont été effectuées sur des gouttes pendantes de solutions de biopolymère dans de l'huile (Figure 22). Pour plus de précision sur nos conditions expérimentales, se référer à la partie IV de ce chapitre.

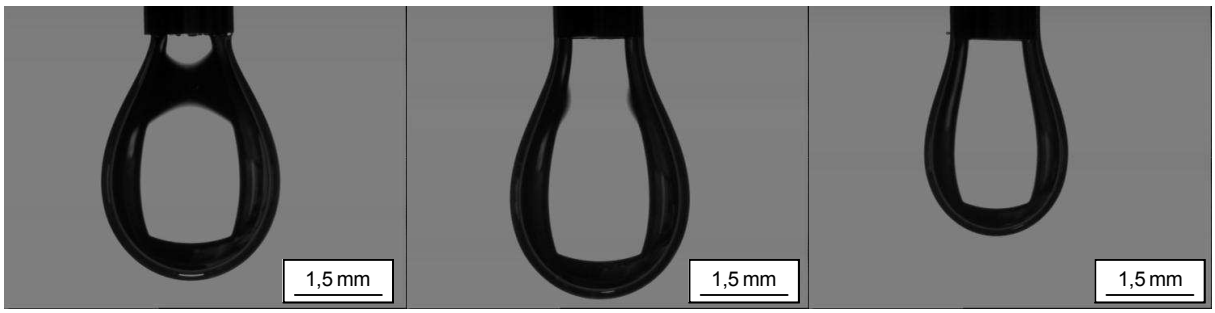


Figure 22 : *Photographies de gouttes pendantes obtenues au tensiomètre à goutte pour différents systèmes. De gauche à droite : huile-eau, huile-GA 2,5 % et huile-β-lg 2,5 %.*

4 - Rhéologie interfaciale

La rhéologie interfaciale est l'étude des relations contrainte/déformation ayant lieu, au sein des interfaces, donc dans des phases bi-dimensionnelles comme des monocouches de tensioactifs, ou de polymères au sein d'émulsions par exemple. La présence de tensioactifs confère à l'interface un comportement viscoélastique se manifestant par une dépendance de la tension interfaciale vis-à-vis de l'aire interfaciale. Ce comportement viscoélastique est capable d'influencer la stabilité des émulsions notamment en ce qui concerne le drainage de film lors de la coalescence (Langevin, 2000). Des modules visqueux et élastiques sont définies pour chaque déformation interfaciale. La méthode utilisée ici afin de déterminer la rhéologie interfaciale est celle de la goutte pendante (ou montante). La déformation de l'interface consiste alors à faire varier de façon sinusoïdale avec une fréquence ω, l'aire interfaciale (A) (dilatation/compression) et à mesurer les changements induits au niveau de la tension interfaciale (γ). Lorsque l'aire interfaciale augmente par exemple, il y a une brusque

diminution de la concentration interfaciale en tensioactif et donc une augmentation de la tension interfaciale. Cette réponse est généralement exprimée grâce au module interfacial dilatationnel viscoélastique (E) qui se définit comme suit (Lucassen et Van Den Tempel, 1972) :

$$E = \frac{d\gamma}{d\ln A} \qquad \text{Equation 13}$$

La tension interfaciale est déterminée de la même manière que décrite au paragraphe précédent c'est-à-dire par l'analyse du profil géométrique de la goutte.

Dans le cas de variations sinusoïdales, le module viscoélastique (E*) est un nombre complexe qui peut se décomposer de la façon suivante :

$$E^* = E' + iE'' \qquad \text{Equation 14}$$

avec

$$E' = |E|\cos\delta \qquad \text{Equation 15}$$

$$E'' = |E|\sin\delta \qquad \text{Equation 16}$$

E' et E'' sont respectivement les modules dilatationnels élastique et visqueux. E' représente l'énergie stockée et récupérable tandis que E'' l'énergie dissipée par le système. δ correspond, quant à lui, au déphasage entre la déformation et la tension interfaciale.

On a alors la relation :

$$\tan\delta = \frac{E''}{E'} \qquad \text{Equation 17}$$

Le tensiomètre dynamique à goutte mesure donc l'ensemble de ces caractéristiques rhéologiques interfaciales (γ, E, E', E" et δ). La Figure 23 présente le schéma du montage du tensiomètre dynamique à goutte utilisé dans cette thèse (Tracker, IT Concept, France. Le détail des conditions expérimentales se trouve dans la section IV de ce chapitre.

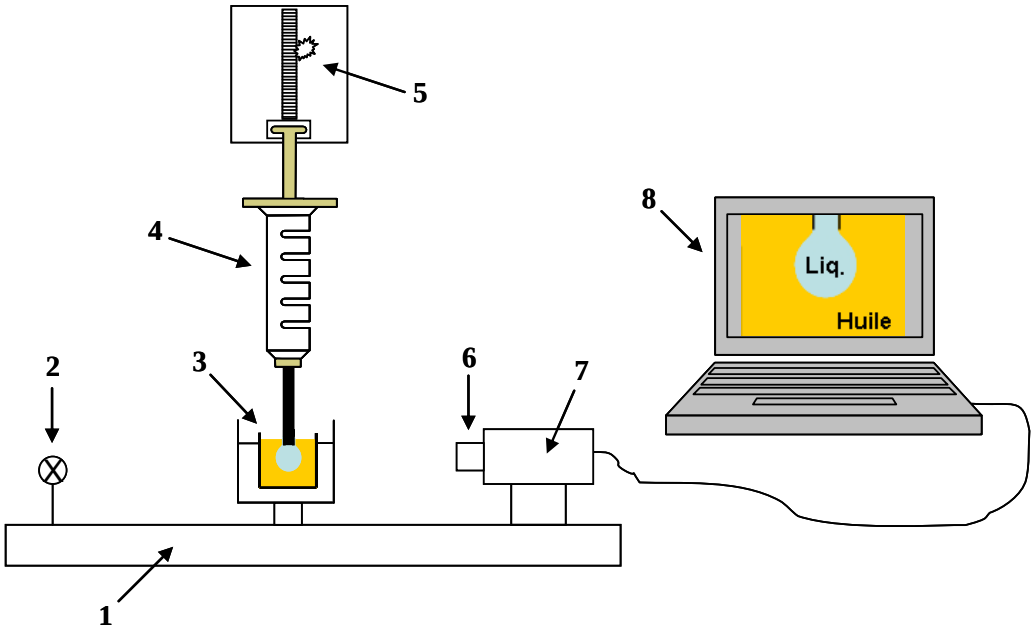


Figure 23 : *Schéma du montage d'un tensiomètre dynamique à goutte. 1-banc optique, 2-source lumineuse, 3-cuve thermostatée remplie d'huile et aiguille avec goutte pendante, 4-seringue remplie de la phase aqueuse, 5-moteur contrôlant le piston de la seringue, 6-lentille télécentrique calibrée, 7-caméra CCD, 8-moniteur vidéo et ordinateur (Adapté de Benjamins et al., 1996).*

III. Etude préliminaire : Evaluation de l'influence d'un conservateur sur le comportement interfacial des biopolymères.

Préalablement à l'étude du mécanisme de stabilisation d'émulsions huile-dans-eau par de la β-lg, de la GA et leur mélange, nous avons évalué l'influence de la présence du conservateur (azoture de sodium) sur le comportement interfacial des biopolymères afin de déterminer son rôle dans la stabilisation des émulsions.

Afin d'assurer la conservation des émulsions contre une éventuelle dégradation microbienne, 0,05 (m/m) % d'azoture de sodium (NaN_3) ont été ajoutés aux solutions de β-lg

et de GA avant la formulation des émulsions. Il était donc nécessaire d'évaluer son influence sur l'adsorption interfaciale des ces deux biopolymères. Le tensiomètre à goutte Drop Shape Analysis System DSA 100 (Krüss, Hamburg, Allemagne) a été utilisé en collaboration avec le Pr. Véronique Rosilio et le Dr. Catherine Ringard, tel que présenté dans la section précédente de ce chapitre. Les analyses ont été effectuées sur des gouttes pendantes de solutions de β-lg et de GA, contenant ou non de l'azoture de sodium, dans de l'huile (Figure 22). Pour plus de précision sur nos conditions expérimentales, se référer à l'article de la partie IV de ce chapitre.

Des tensions interfaciales immédiates huile-solution de biopolymère ont été obtenues et sont présentées dans le Tableau VI. D'après les résultats obtenus, il apparaît que la présence d'azoture de sodium dans les solutions de biopolymère et de leurs mélanges ne modifie pas les valeurs de tension interfaciale immédiate de chacun des systèmes, sachant que l'incertitude sur la mesure est de 0,2 mN/m. L'azoture de sodium n'influence pas et ne perturbe donc pas l'adsorption interfaciale de la β-lg, de la GA et des mélanges β-lg : GA. Sa contribution dans les mécanismes de stabilisation des émulsions sera donc considérée comme nulle par la suite. Il est à noter que l'influence des biopolymères sur la tension interfaciale est discutée dans l'article qui suit.

Tableau VI : *Tensions interfaciales (γ) mesurées immédiatement après la formation d'une goutte pendante de solution de biopolymère dans de l'huile. (–) : sans ajout de NaN_3, (+) : avec ajout de NaN_3.*

Concentrations (m/m) %	0,5								2,5							
NaN_3	-				+				-				+			
Solution de biopolymère Ratio (m/m)	β-lg	GA	β-lg:GA		β-lg	GA	β-lg:GA		β-lg	GA	β-lg: GA		β-lg	GA	β-lg: GA	
			2:1	1:2			2:1	1:2			2:1	1:2			2:1	1:2
γ (mN/m)	11,0	21,9	11,7	12,8	10,9	21,6	11,6	12,7	10,7	20,7	11,3	12,3	10,9	20,9	11,6	12,1

IV. Mécanisme de stabilisation d'émulsions huile-dans-eau par la β-lactoglobuline et la gomme arabique.

PUBLICATION 2:

Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β-lactoglobulin and gum arabic

Article publié dans *Journal of Colloid and Interface Science* en 2011.

Author's personal copy

Journal of Colloid and Interface Science 354 (2011) 467–477

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

www.elsevier.com/locate/jcis

Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β-lactoglobulin and gum arabic

Eléonore Bouyer, Ghozlene Mekhloufi *, Isabelle Le Potier, Typhaine du Fou de Kerdaniel, Jean-Louis Grossiord, Véronique Rosilio [1], Florence Agnely [1]

Univ Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France
CNRS, UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 July 2010
Accepted 9 November 2010
Available online 8 December 2010

Keywords:
β-Lactoglobulin
Capillary electrophoresis
Emulsion
Gum arabic
Interfacial tension
Interfacial dilational rheology
Multilayer stabilization
Protein:polysaccharide complexes

ABSTRACT

Natural biopolymer stabilized oil-in-water emulsions were formulated using β-lactoglobulin (β-lg), gum arabic (GA), and β-lg:GA solutions as an alternative to synthetic surfactants. Emulsions using these biopolymers and their complexes were formulated varying the biopolymer total concentration, the protein-to-polysaccharide ratio, and the emulsification protocol.

This work showed that whereas β-lg enabled the formulation of emulsions at concentration as low as 0.5 (w/w)‰, GA allowed to obtain emulsions at concentrations equal to or higher than 2.5 (w/w)‰. In order to improve emulsion stability, β-lg and GA were complexed through strong attractive electrostatic interactions. GA solution had to be added to previously prepared β-lg emulsions in order to obtain stable emulsions. Interfacial tension and interfacial rheological measurements allowed a better understanding of the possible stabilizing mechanism. β-lg and GA both induced a very effective decrease in interfacial tension and showed interfacial elastic behaviour. In the mixed system, β-lg adsorbed at the interface and GA electrostatically bound to it, leading to the formation of a bi-layer stabilized emulsion. However, emulsion stability was not improved compared to β-lg stabilized emulsion, probably due to depletion or bridging flocculation.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Emulsions are widely used in the formulation of food, pharmaceutical, and cosmetic products. They are not thermodynamically stable (except microemulsions) and can phase separate. Addition of emulsifiers allows the formulation of stable emulsions thanks to the formation of structured interfacial films. The present study aimed at formulating oil-in-water emulsions for dermatologic use. Our objective was to replace synthetic surfactants that are potentially irritating for skin [1] by "natural" emulsifiers and stabilizers in order to answer the increasing demand of natural and biodegradable products [2,3]. This approach has already been applied in the food industry that currently uses proteins and polysaccharides as texturizing and stabilizing agents [4–7]. Proteins are less effective than synthetic emulsifiers in decreasing interfacial tension, but they lead to thermodynamically and kinetically more stable emulsions [8,9]. Indeed, they form a viscoelastic adsorbed layer onto the oil droplets and are able to generate repulsive steric and electrostatic interactions between these droplets [10]. Generally, proteins act as the main stabilizers and polysaccharides contribute to emulsion stability by their thickening and steric stabilizing behaviours [11]. Polysaccharides that do not adsorb at the globule interface would enhance the viscosity of the aqueous phase and thus slow down destabilizing mechanisms [12] such as creaming, flocculation, and coalescence. On the other hand, adsorbing ones would anchor at the interface by their hydrophobic residues, decrease the interfacial tension and form a steric barrier preventing coalescence [13].

Many studies have shown the interest of combining advantages of proteins and polysaccharides *via* the formation of protein:polysaccharide complexes to emulsify and stabilize emulsions [14–17]. These complexes can be formed through covalent bonding or electrostatic interactions. In the latter case, the efficiency of a polysaccharide to form an interfacial complex with a protein depends on the distribution of ionized groups onto the protein surface and the stability of the protein structure, but also on the flexibility, charge distribution, and density of the polysaccharide [14,18]. In this approach it is possible to formulate emulsions stabilized by multilayered interfacial membranes composed of alternatively oppositely charged biopolymers. Under appropriate formulation

Abbreviations: β-lg, β-lactoglobulin; GA, gum arabic; AG, arabinogalactan; GP, glycoprotein; AGP, arabinogalactan-protein; PEO, poly(ethylene oxide); ACE, affinity capillary electrophoresis; DSA, drop shape analysis; WPM, Wilhelmy plate method.

* Corresponding author at: CNRS, UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France. Fax: +33 1 46 83 58 82.
E-mail address: ghozlene.mekhloufi@u-psud.fr (G. Mekhloufi).

[1] Equal contribution.

0021-9797/$ - see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jcis.2010.11.019

Author's personal copy

conditions, this multiple layer deposition has been shown to confer better stability to environmental stresses than conventional oil-in-water emulsions stabilized by a single interfacial biopolymer layer [17,19–22].

In this work, two biopolymers have been chosen to stabilize oil-in-water emulsions: β-lactoglobulin (β-lg), the major whey protein, and gum arabic (GA), an exudate from *Acacia* trees.

β-lg is a compact globular protein (monomer molar mass = 18.3×10^3 g/mol) containing 162 amino acid residues with one thiol group and two disulphide bonds. It exists in several genetic variants of which A (Gln59, Asp64, Val118) and B (Gln59, Gly64, Ala118) are the most abundant ones [23]. The isoelectric point (p*I*) of β-lg is about 5.2. The protein displays a global positive charge below this value and a negative charge above it. Once adsorbed at the interface, there is a structural reorganization of the protein in order to partially unfold and expose hydrophobic residues toward the lipophilic phase [8,9].

GA is a hybrid polyelectrolyte containing both protein and polysaccharide subunits. It consists mainly of a mixture of arabinogalactan (AG) (80–90% of the total gum in weight), glycoprotein (GP) (2–4% of the total gum in weight), and arabinogalactan-protein (AGP) (10–20% of the total gum in weight) fractions [24]. Molar mass of the whole gum can vary from 3.0×10^5 to 5.8×10^5 g/mol depending on its origin and age [25]. GA carries a net negative charge for pH value above 2.0 conferred by its glucuronic acid residues. The AGP fraction has been considered to be responsible for the emulsifying properties of GA [26–29]. Indeed, the protein component of the gum would embed in the oil phase while the carbohydrate component would extend into water [28,30].

The combination of these two biopolymers is of interest to potentially induce a synergistic effect on emulsion stability [31]. Over the last decade, proteins and polysaccharides and their complexes have emerged in the pharmaceutical field mainly for microencapsulation [32–34]. However, to our knowledge, there is currently no marketed pharmaceutical emulsion stabilized by a combination of protein and polysaccharide. The aim of this study was thus to investigate the potentialities of β-lg, GA, and their mixtures to formulate sweet almond oil-in-water emulsions for dermatologic use. β-lg:GA complexation in solution was first studied by capillary electrophoresis. Affinity capillary electrophoresis (ACE) as a probe for studying molecular interactions has gained increasing popularity in the last few years [35]. The influence of biopolymer concentration, pH, protein-to-polysaccharide ratio, and emulsification process on emulsion stability was then thoroughly studied. In a last step, we have characterized the interactions of both biopolymers with the oil–water interface in order to better understand the emulsion stabilization mechanisms.

2. Materials and methods

2.1. Materials

β-lg powder (lot JE 002-8-992) was supplied by Davisco Foods International, Inc. (USA). Its composition was 89.8 (w/w)% protein, 8.8 (w/w)% moisture, and 1.4 (w/w)% ash [36]. GA (INSTANTGUM AA) was a gift from CNI Company (Rouen, France). Its composition contained 10 (w/w)% moisture and 4 (w/w)% ash with a molecular weight of about 350,000 g/mol as reported by the supplier. The protein content was 2.5 (w/w)% as determined by the Kjeldahl analysis ($N \times 6.66$). Sweet almond oil (lot 07120145 \ A) was provided by Cooper (Melun, France) and sodium azide (lot K305.2) by Roth (Lauterbourg, France). Sodium hydroxide, hydrochloric acid, and citric acid were analytical grades from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Poly(ethylene oxide) (PEO) with a molecular weight of 200,000 g/mol was obtained from Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA). Thiourea was obtained from Sigma–Aldrich (Saint Louis, USA). Water used in all experiments was purified using a Millipore Synergy 185 apparatus coupled to a RiOs5™ with resistivity of 18.2 MΩ cm.

2.2. Preparation of biopolymers solutions

β-lg and GA solutions were prepared at total final concentrations of 0.5 and 2.5 (w/w)%. The powder was dissolved in MilliQ water under gentle stirring at 20 ± 1 °C for at least 2 h. Solutions were then allowed to hydrate overnight at 4 ± 1 °C. The pH of β-lg solutions was adjusted to 4.8 (lowest β-lg solubility pH [36]) using 0.1 or 1 N HCl solutions. β-lg solutions were then centrifuged at 10,000 g for 30 min at 20 ± 1 °C to remove insoluble particles and β-lg aggregates. This step induces a 10% loss of β-lg [36] that was taken into account when preparing the solutions. Sodium azide (0.05 (w/w)%) was added to β-lg and GA solutions as an antimicrobial agent. The final pH of both solutions was then adjusted to 4.2 using 0.1 or 1 N HCl solutions in order to allow attractive electrostatic interactions and thus the formation of complexes between β-lg and GA [36,37].

For interfacial measurements, β-lg solutions with concentrations ranging from 2.3×10^{-5} to 3 (w/w)% were prepared by dilution of a 3 (w/w)% β-lg stock solution, in order to measure protein adsorption over a 24-h period.

2.3. Oil-in-water emulsion preparation

Emulsions were prepared by homogenizing 30 (w/w)% sweet almond oil with 0.5 and 2.5 (w/w)% aqueous emulsifier solutions (β-lg, GA or β-lg:GA). When emulsions were stabilized by only one biopolymer, oil and emulsifier solutions were mixed by a rotor–stator homogenizer (Polytron PT-MR 3100, Kinematica AG, Bioblock Scientific) for 2 min at 15,000 rpm. Emulsions were then passed through a two-stage high-pressure valve homogenizer (APV Invensys) for 5 min and with two successive pressure steps, 500 and 50 bars.

To obtain emulsions simultaneously stabilized by β-lg and GA, three different protocols were set up to prepare the 0.5 (w/w)% biopolymer stabilized emulsions (Fig. 1).

The first protocol consisted in formulating an emulsion from a last minute mixed biopolymer solution. In the second protocol, emulsions were formulated using a GA solution that was subsequently diluted by adding a β-lg solution. Finally in protocol 3, emulsions were prepared with a β-lg solution, and then diluted by a GA solution. Note that this latter procedure can be used for

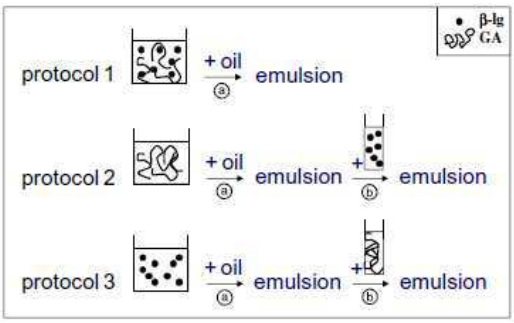


Fig. 1. Schematic depiction of the three protocols for emulsion preparation with β-lg and GA at 2:1 and 1:2 β-lg:GA ratios. (a) Rotor–stator and high pressure homogenizers. (b) Hand reversal shaking.

Author's personal copy

oil encapsulation *via* interfacial coacervation [33]. Emulsification procedure was the same as the one described above (rotor–stator and high pressure homogenizers) and emulsion dilution was performed by simple hand reversal shaking to minimize system destructuring. Besides the effect of the biopolymer incorporation order, the influence of protein:polysaccharide ratios (2:1 and 1:2) was evaluated. We then focused on this third protocol for the 2.5% biopolymer concentration at both ratios.

2.4. Solution characterization

2.4.1. Zeta potential measurements

The zeta potential (ζ-potential) was determined by measuring the electrophoretic mobility using a detection angle laser of 90° (λ = 633 nm) with a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, England). The direction and velocity of particle movement in the applied electric field was determined. Measurements were performed on undiluted 0.5% and 2.5% biopolymer solutions, and their mixtures, in triplicates.

2.4.2. Affinity capillary electrophoresis (ACE)

Affinity Capillary Electrophoresis (ACE) experiments were performed using a P/ACE system 5500 equipped with a UV-detector (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). To minimize adsorption of β-lg to the capillary wall, a PEO-modified capillary was employed for the analyses. The PEO coating of a fused-silica capillary (Phymep, France) with a length of 27 cm (effective length 20 cm) and an internal diameter of 50 µm was performed using a procedure described in detail by Dribek et al. [38] and which was adapted from Iki and Yeung [39].

Samples were introduced into the capillary by hydrodynamic injection for 7 s under a pressure of 3.5 kPa. Separation voltage was set at 20 kV. The capillary was thermostated at 25 °C. The detection was carried out at the cathode with the wavelength set at 214 nm. Between runs, the capillary was rinsed with the following sequence: 0.1 M NaOH for 2 min, MilliQ water for 1 min and the running buffer for 3 min.

ACE analyses were based on the measurement of the β-lg apparent mobility variations upon addition of increasing concentrations of GA to the running buffer (40 mM pH 4.2 citrate buffer, 0–43.6 × 10^{-8} mol/L GA). The latter was prepared by dissolution of GA in 40 mM pH 4.2 citrate buffer. This stock solution was stored over night at 4 °C. For each GA concentration, β-lg solution (27.2 × 10^{-5} mol/L in water) was analysed at least three times.

The calculation of binding constants between β-lg and GA by ACE was obtained following the equation development described previously [38]. The migration time of thiourea, used as a neutral marker, was above 180 min indicating that the electroosmotic flow was negligible under these experimental conditions. Consequently, the electrophoretic mobility of β-lg was considered as equal to the apparent mobility of the protein. In order to determine the viscosity correction factor [38], the viscosity of GA in buffer was measured by a capillary viscosimeter Schott Geräte, CT42 type (Hofheim A.T.S., Germany) with a capillary constant of 0.01022 mm^2/s^2. The binding constants were estimated by direct non-linear regression using Origin®software (version 8.1) and linearization methods (x-reciprocal, y-reciprocal and double-reciprocal) [38] using Microsoft Excel® software (2003 version).

2.4.3. Interfacial behaviour

The biopolymers solutions were analysed by three complementary techniques: static drop shape analysis, Wilhelmy plate method, and interfacial dilational rheology. The first one measures immediate interfacial tension, the second one long-time interfacial tension, and the third one monitors the interfacial elastic and viscous moduli during biopolymers adsorption. All glassware in contact with the biopolymer solutions was properly cleaned with a hot TFD4 solution (Franklab) and rinsed with MilliQ water. All measurements were performed at 25 ± 1 °C.

2.4.3.1. Immediate interfacial tension measurements by drop shape analysis (DSA). Interfacial tension measurements were performed by the drop method, using the Drop Shape Analysis System DSA 100 (Krüss, Germany). Pendant aqueous solution drops were formed into sweet almond oil. Inner diameter of the needles was 1.827 mm except for GA dispersions (3.000 mm). Interfacial tension was determined immediately after drop formation. The reported results are mean values of three measurements. The experimental uncertainty was estimated to be 0.2 mN/m.

2.4.3.2. Long-time interfacial tension measurements by Wilhelmy plate method (WPM). Interfacial tension was also measured *versus* time using an automatic thermostated digital tensiometer (Krüss K10T, Hamburg, Germany) as previously described [40,41]. The Wilhelmy plate caught at the air–water interface was progressively and carefully covered with oil, and the interfacial tension was continuously recorded over 24 h at 25 °C. The reported surface tension values are mean values of at least two measurements. The experimental uncertainty was estimated to be 0.2 mN/m. When requested, 200 µL of biopolymer solutions were injected into the subphase by means of a micropipette through a side-arm of the measurement cell in order to mimic the biopolymer interfacial behaviour when emulsion were formulated according to protocols 2 and 3. The injected solutions were prepared at concentrations allowing the required final total biopolymers concentrations to be reached in the measurement cell. It was checked that the injected volume, with respect to the volume and surface of the measurement cell, was the largest that could be injected to avoid any effect on the water level and buoyancy force.

2.4.3.3. Interfacial dilational rheology. Interfacial dilational viscoelastic parameters (E' and E'') of adsorbed β-lg and GA films at the oil–water interface were determined as a function of time using a thermostated automatic pendant drop tensiometer (TRACKER, IT Concept, France). In this experiment, the volume of a pendant drop was submitted to sinusoidal variations (f = 0.1 Hz), thus resulting in expanding or compressing the surface of the drop. The biopolymer solutions were placed in a 250 µL glass syringe equipped with a Teflon coated stainless steel needle. The inner diameter of the needle was 0.84 mm. The tip of this needle was then immerged in an oil-filled rectangular glass cuvette. Solutions were allowed to stand in the needle for 30 min to reach the desired temperature (25 °C). Then a 10 µL drop was delivered and allowed to stand at the tip of the needle for 12 h to achieve biopolymer adsorption at the oil–water interface. The drop volume deformation amplitudes were 0.5% and 1% for β-lg solutions concentrations of 2.5% and 0.5%, respectively. Five per cent of deformation amplitude was applied for both GA solution concentrations. Preliminary measurements showed that these conditions corresponded to the linear regime of deformation.

The interfacial tension was determined by analyzing the profile of the drop according to the Laplace equation, by means of a CCD camera connected to a computer. This experiment gave us information on the viscoelastic properties of the interface as a function of time. Indeed, a complex shear modulus can be defined as follows:

$$E^* = E' + iE'' \quad (1)$$

where E' is the elastic modulus describing the elastic properties of the interface, and E'' the viscous modulus correlated to its viscous

Author's personal copy

resistance. The phase angle (δ) is related to E' and E'' moduli thanks to the following equation:

$$\tan\delta = \frac{E''}{E'} \quad (2)$$

Thus δ values below 45° reveal a predominantly elastic behaviour. The reported values are means of at least two measurements. The experimental uncertainty was estimated to be 1 mN/m.

2.5. Emulsion characterization

Emulsions were characterized when stable for at least 24 h. All measurements were performed on the first day of stability if no macroscopic phase separation was noticed.

2.5.1. Droplet size measurements

Emulsion droplet size was measured by laser diffraction. The mean volume diameter d_{43} of the emulsions droplets was determined using laser granulometer Mastersizer S (Malvern Instruments, England). The laser wave length was 632.8 nm. To avoid multiple scattering, the samples were diluted in MilliQ water. Measurements were performed at a 13% obscuration. Results are the mean of triplicates.

2.5.2. Zeta potential determinations

ζ-potential measurements were performed thanks to the Zetasizer Nano ZS 90. Emulsions were diluted to 1/50 with MilliQ water prior to analysis. These measurements were conducted in triplicate and allowed us to obtain the mean ζ-potential of oil droplets.

3. Results and discussion

3.1. Biopolymer solutions characterization

3.1.1. Zeta potential measurements

Zeta potential values obtained for the solutions of β-lg, GA, and the β-lg:GA mixtures at both ratios (2:1 and 1:2) and pH 4.2 are gathered in Table 1. These values are in agreement with the p*I* of β-lg and the p*K*a of GA. In mixed aqueous dispersions (β-lg:GA), the ζ-potential value was negative and close to that of pure GA solutions. This shows the predominance of the gum, due to its larger size or to the way the biopolymers are complexed with one another: the protein might be hidden inside the gum. This result has already been observed for the β-lg:GA complex electrophoretic mobility at 0.1% total concentration [36]. The magnitude of the ζ-potential decreased as the biopolymer concentration increased (*i.e.* −16 to −7 mV for the 2:1 β-lg:GA ratio). This decrease can be attributed to electrostatic screening effects due to the increased ionic strength when increasing biopolymer concentration. It is well known that the ionic strength influences biopolymer complex formation. A high ionic strength leads to screening of charges and to weaker electrostatic interactions between the two biopolymers [30]. It is worth noticing that no other electrolytes were added in our experiments.

3.1.2. Affinity capillary electrophoresis (ACE)

The characteristics β-lg:GA binding were tested by keeping the β-lg concentration constant while increasing the GA concentration in the running buffer during the ACE analyses. The electrophoretic mobility of β-lg was measured as a function of GA concentrations under a pH (4.2) allowing electrostatic interactions between the two biopolymers. At this pH, negatively charged GA and positively charged β-lg migrate in the opposite direction. Thus binding of β-lg to GA is expected to decrease the β-lg net positive charge while the formation of the complex is supposed to increase the mass. Both these effects should decrease the charge-to-mass ratio, lowering the electrophoretic mobility of the β-lg. Two peaks corresponding to variants A and B were observed on the electropherograms (data not shown), in agreement with β-lg powder expected composition [42]. We observed that the increase of GA concentration introduced in the buffer induced an increase of the migration time of both β-lg variants that could be attributed to the formation of β-lg:GA complex. To ensure that electrophoretic mobility shifts were linked to β-lg:GA interactions only, we checked whether the factors known to influence the electrophoretic mobility (such as viscosity, conductivity, and ionic strength) were affected by the presence of GA in the buffer. As no substantial change in generated current was observed during ACE experiments, no correction based on the conductivity variation was applied. Viscosity variation, arising from the presence of increasing concentrations of GA in buffer, was evaluated by capillary viscosimetry measurements. The results showed that the presence of GA in the buffer induced a slight viscosity increase, from (0.958 to 0.973) × 10^{-3} mPa s over the range of 0–43.6 × 10^{-8} mol/L. A viscosity correction factor was consequently applied for the electrophoretic mobility evaluation to determine the binding constants [43].

The binding curve of the variant A of β-lg in the presence of GA was constructed by plotting the electrophoretic mobility as a function of the GA concentration in the running buffer (Fig. 2). An equivalent profile was obtained for variant B (result not shown). Using a non-linear curve fitting method, the apparent binding constant was found equal to $(1.2 \pm 0.2) \times 10^8\ M^{-1}$ ($R^2 = 0.994$). When compared to this value, linear data obtained from x-reciprocal, y-reciprocal, and double-reciprocal linearization methods did not differ over 17%. Schmitt et al. [44] reported an affinity constant Keq = $(1.37 \pm 0.7) \times 10^7\ M^{-1}$ of the same order of magnitude upon complexation of β-lg and GA at pH 4.2 as determined by the Isothermal Titration Calorimetry technique. These results indicate that β-lg and GA are very likely to spontaneously associate at pH 4.2.

3.2. Emulsions characterization

3.2.1. β-lg stabilized emulsions

Emulsions prepared with 0.5 (w/w)% β-lg were macroscopically stable for 20 days, whereas those prepared with 2.5 (w/w)% protein remained stable over 122 days (Table 2). Their ζ-potential was positive in agreement with the β-lg global positive charge at pH 4.2. As for biopolymer solutions, the magnitude of the ζ-potential decreased with β-lg concentration as a consequence of the ionic strength increase. The magnitude of the ζ-potential is of impor-

Table 1
Zeta potential results obtained for biopolymers solutions.

Biopolymer	β-lg		GA		β-lg:GA			
Concentration (w/w%)	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5		2.5	
Ratio					2:1	1:2	2:1	1:2
ζ (mV)	19	10	−25	−20	−16	−23	−7	−16

Author's personal copy

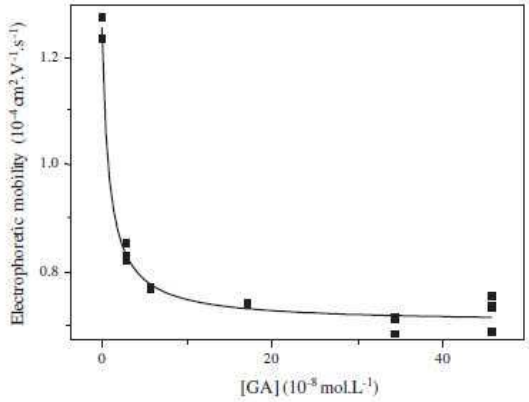


Fig. 2. Plot of the corrected electrophoretic mobility of β-lg variant A as a function of GA concentration added to the running buffer. Curve: non-linear fitting. ACE conditions: 27 cm (total length) × 50 μm (internal diameter) fused-silica capillary modified with PEO; 40 mM pH 4.2 citrate buffer with variable concentrations of GA; 20 kV; 25 °C; UV detection at 214 nm; injection of β-lg (27.2×10^{-5} mol/L in water) 7 s at 3.5 kPa.

tance in emulsion stabilization: a high ζ-potential in absolute value will prevent droplets aggregation. High ionic strength can induce droplet flocculation if the electrolyte concentration is high enough to electrostatically screen droplets charge [45]. In our experiments, increasing protein concentration led to longer emulsion stability probably due to a correlated decrease of d_{43} (Table 2).

3.2.2. GA stabilized emulsions

Emulsions containing 0.5 (w/w)% GA creamed within 24 h, whereas those prepared with 2.5 (w/w)% GA were stable for 48 h (Table 2). A further increase in GA concentration (5 (w/w)%) led to a 7-day stability (results not shown). Increasing GA concentration would enhance the number of adsorbed molecules at the oil–water interface forming a steric protective film around oil droplets [46]. Emulsion ζ-potential was negative because of the negative charge of GA at the studied pH.

The comparison of 2.5 (w/w)% β-lg and GA stabilized emulsions shows that d_{43} was larger for the GA stabilized emulsion. At this stage, two hypotheses can be proposed to explain this result: GA was less surface active than β-lg or probably needed a longer time than the protein to adsorb at the interface (higher molecular weight), thus leading to larger droplets during the emulsification process.

3.2.3. β-lg:GA stabilized emulsions

β-lg and GA solutions at pH 4.2 were used to formulate the emulsions following the three protocols shown in Fig. 1.

Protocols 1 and 2 did not allow to obtain stable emulsions (with 0.5 (w/w)% biopolymers solutions) whatever the protein:polysaccharide ratio used. In the first protocol, the primary β-lg:GA solutions mixing might lead to the formation of poorly surface active complexes that would not be able to stabilize the emulsion. In the second protocol, the emulsion was primary formed with GA. We saw in Section 3.2.2 that at 0.5 (w/w)% GA it was not possible to formulate stable emulsions. However, GA chemical composition (AGP fraction) should enable its interfacial adsorption. The GA interfacial localization might have caused steric hindrance for β-lg adsorption when the protein was added, or too large droplets were formed with the gum, that could not be stabilized subsequently by the protein either. As in the first protocol, it is also possible that β-lg formed complexes with non-adsorbed GA molecules and consequently lost its surface activity. These different hypotheses are further discussed in the general discussion (Section 4).

Table 2
Main results obtained for emulsions that were not phase separated after 24 h. nd: not determined.

Stabilizing biopolymer	β-lg		GA	β-lg:GA – protocol 3			
Concentration (w/w%)	0.5	2.5	2.5	0.5		2.5	
Ratio				2:1	1:2	2:1	1:2
Macroscopic stability (days)	20	122	2	2	2	3	2
d_{43} (μm)	16	2	30	11	6	7	2
ζ (mV)	21	17	−16	−40	−53	nd	−26

Concerning the third protocol, phase separation occurred one day later for the 2:1 β-lg:GA ratio at 2.5 (w/w)% total concentration compared to the other ratio and concentration (Table 2). At the 1:2 ratio (for both concentrations), there were probably too few β-lg molecules during the formation of the primary emulsion for its stabilization. Apparently, GA addition would not compensate this lack in interfacial β-lg. The emulsions obtained with the 2:1 ratio were compared with those formulated with β-lg alone (Table 2). At 0.5 (w/w)% total biopolymer concentration, the measured d_{43} was in the same order (11 μm) as the one corresponding to the β-lg stabilized emulsion (16 μm). β-lg thus seems to govern the size of the droplets as it is the first biopolymer to be adsorbed. A ζ-potential of about −40 mV was measured, indicating that the net charge on the droplets switched from positive (+21 mV) to negative upon GA addition. This change in the net charge suggests that GA surrounded the droplets. The same comparison can be made when the total concentration of the biopolymers was 2.5 (w/w)%. The slight stability increase at this total concentration could be explained by a larger number of both biopolymers molecules adsorbed at the interface.

At this step of the study, three hypotheses could be proposed to explain the mechanism of GA interaction with the droplet interface-adsorbed protein (Fig. 3). In the first one, GA would freely remain in the aqueous phase and would not interact with the adsorbed β-lg. In the second one, GA would diffuse towards the droplet surface, compete with the already adsorbed β-lg molecules and replace some of them. In the third hypothesis, GA molecules would complex with adsorbed β-lg ones through electrostatic interactions, and form an additional layer around the droplet. In this last hypothesis, as β-lg and GA are oppositely charged, GA would neutralize and even reverse the charge of the oil droplet surface as it was reported for emulsions stabilized by polyelectrolyte multi-layers [20].

The first hypothesis can reasonably be dismissed because attractive electrostatic interactions occur between the two biopolymers at the studied pH as shown by the ACE technique. The other two hypotheses remain possible even if the poor stability of emulsions prepared using protocol 3 with the ratio 1:2, and that of emulsions prepared by protocol 1 tends to demonstrate that interfacial co-adsorption of GA and β-lg was not very effective. Interfacial tension measurements allowed us to determine the actual mechanism of emulsion stabilization by β-lg and GA.

3.3. Interfacial tension measurements

3.3.1. β-lactoglobulin

Drop Shape Analysis (DSA) showed an immediate and significant decrease in oil–water interfacial tension from 21.0 to 11.0 and 10.7 mN/m, upon 0.5 (w/w)% and 2.5 (w/w)% β-lg addition to water, respectively. This was in agreement with the expected surface properties of β-lg [8,9]. No significant difference was observed in the adsorption behaviour of 0.5 and 2.5% β-lg. This would indicate that at these two concentrations, β-lg was already in excess,

Author's personal copy

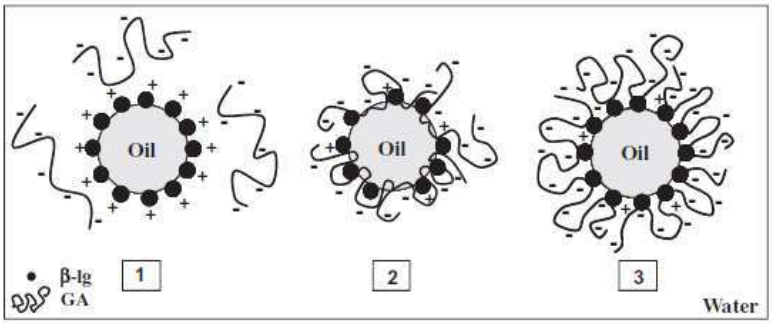


Fig. 3. Schematic depiction of three possible biopolymer organizations at the oil–water interface, when GA (line) is added to the continuous phase of a preformed β-lg (dot) stabilized emulsion (protocol 3).

above or close to the interfacial saturation. Moreover, long-time surface tension recordings using the Wilhelmy plate method (WPM) showed that no significant difference between the two concentrations was observed after 24 h (Fig. 4).

To confirm those results, we studied the adsorption kinetics for various β-lg concentrations solutions (ranging from 2.3×10^{-5} to 3 (w/w)%) using the WPM. Fig. 5 shows the equilibrium interfacial tensions of β-lg solutions *versus* their logarithmic concentrations. The discontinuity in the slope appears at about 7×10^{-4} (w/w)% and may be attributed to interfacial saturation with β-lg molecules [47]. This result confirmed that the two β-lg concentrations used to formulate the emulsions (0.5 and 2.5 (w/w)%) were well above the concentration saturating the interface.

3.3.2. Gum arabic

Whereas DSA did not show any immediate significant oil–water interfacial tension decrease upon GA addition, WPM allowed recording a significant lowering of the interfacial tension with time (*i.e.* from 15.6 to 2.9 mN/m for the 2.5 (w/w)% GA solution) (Fig. 6). This indicates that GA needed time to diffuse towards the interface, adsorb, and rearrange itself. Although the two studied concentrations led to very similar interfacial tensions after 24 h, their profiles were not superimposed. This would indicate that for 0.5 (w/w)% GA at least, the interfacial saturation was not yet reached. It is also worth noting that the lowest interfacial tension values recorded for GA alone were similar to those for β-lg alone. GA displayed apparently good surface properties, but needed longer times than β-lg to reach equilibrium.

3.3.3. β-lactoglobulin:gum arabic mixtures

For β-lg:GA mixtures with a 2.5 (w/w)% total biopolymer concentration, DSA showed an immediate decrease in the interfacial tension that led to a very similar value to that obtained with β-lg alone (10.7 mN/m). This result is consistent with the observation

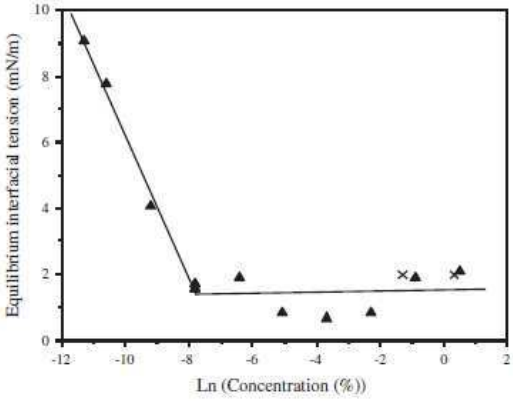


Fig. 5. Equilibrium interfacial tension (after 24 h) measured with the WPM *versus* Ln β-lg solutions concentrations. x: β-lg concentrations tested in emulsions.

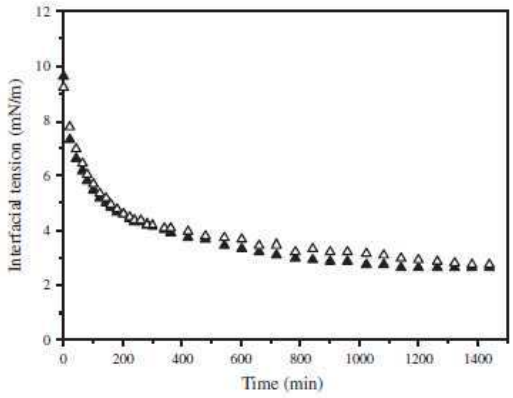


Fig. 4. Time evolution of the interfacial tension for oil-β-lg aqueous solutions obtained with the WPM: ▲ 0.5 (w/w)% and Δ 2.5 (w/w)% β-lg concentrations.

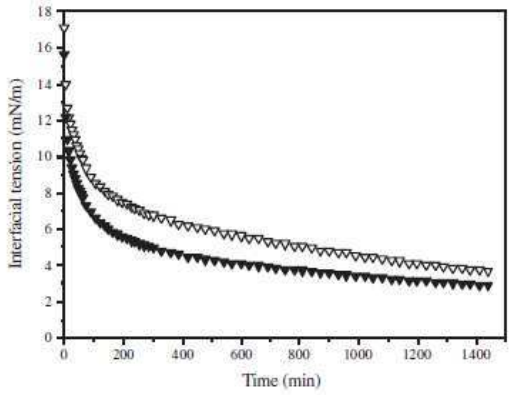


Fig. 6. Time evolution of the interfacial tension for oil-GA aqueous solutions, as measured by the WPM: ▽ 0.5 (w/w)% and ▼ is 2.5 (w/w)% GA concentrations.

Author's personal copy

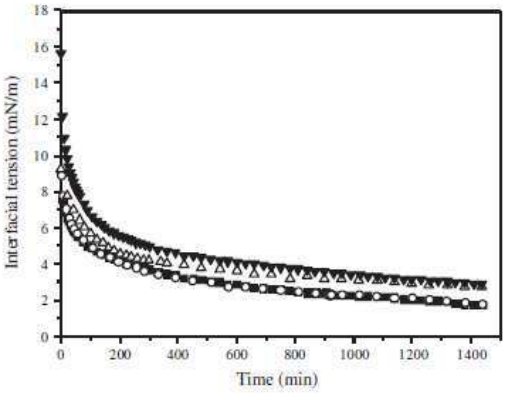


Fig. 7. Time evolution of the interfacial tension for oil-2.5 (w/w)% biopolymer aqueous solutions as measured by the WPM: Δ β-lg, ▼ GA, ○ β-lg:GA at the 2:1 ratio, and ■ β-lg:GA at the 1:2 ratio.

that GA needed time to adsorb at the interface and thus to decrease the interfacial tension. A slight difference could be observed when varying the protein:polysaccharide ratio. Indeed at the 1:2 β-lg:GA ratio, the interfacial tension lowering appeared slightly less extensive (from 21.0 to 12.3 mN/m at 2.5 (w/w)%) compared to the 2:1 ratio (from 21.0 to 11.3 mN/m at the same concentration), probably due to the lower effective β-lg concentration in the aqueous phase. Fig. 7 shows long-time interfacial tension measurements using the WPM for β-lg, GA, and β-lg:GA at 2.5 (w/w)% and for both ratios. A similar trend was observed at the 0.5 (w/w)% β-lg:GA concentration (results not shown). A significant lowering of the interfacial tension (*i.e.* from 9.0 to 1.7 mN/m for 2.5 (w/w)% β-lg:GA at the 1:2 ratio) was noticed, with superimposition of the adsorption isotherms for the 2:1 and 1:2 ratios.

Comparing time evolution of the interfacial tension for oil-β-lg, oil-GA, and oil-β-lg:GA dispersions at 2.5 (w/w)% and at the two biopolymers ratios, all adsorption isotherms showed similar profiles. The β-lg:GA mixtures led to slightly lower interfacial tension values, accounting for a synergy between the two emulsifiers. Dickinson [30] also reported that protein:polysaccharide electrostatic complexes exhibited improved interfacial properties compared to the single components. Ducel et al. [48] obtained the same conclusion for plant protein:GA complexe coacervates formed under appropriate conditions.

Fig. 8 displays the time evolution of the interfacial tension for oil-2.5% β-lg and oil-2.5% GA solutions followed by injection of the second biopolymer after 3 h. Similar profiles were observed for the 0.5 (w/w)% β-lg concentration (results not shown). The isotherms show that, for GA solutions, when β-lg was added to the subphase (at both studied concentrations) (Fig. 8A), a sharp decrease in interfacial tension was observed, indicating that the protein adsorbed rapidly at the interface, even if some GA molecules were already adsorbed. This experiment models the stabilizing mechanism that could occur when protocol 2 was used (primary emulsion formed with GA solution and then dilution with β-lg solution). Conversely, when GA was added to β-lg solutions (Fig. 8B), no significant change in the interfacial tension was recorded, indicating that GA did not adsorb at the oil-solution interface, either by filling empty spaces or competing with β-lg. This observation is correlated to the finding of Tcholakova et al. [49] showing that the first layer of β-lg does not easily desorb from the interface. This observation allowed to better understand the stabilizing mechanism of the β-lg:GA system in emulsions formulated with protocol 3. The second hypothesis can thus be also denied (Fig. 3).

From all these results, it may be inferred that during emulsion formation (protocol 3) β-lg first adsorbed at the oil–water interface. Then GA bound to the protein layer most probably through electrostatic interactions (hypothesis 3 in Fig. 3). It is important to note that these results were obtained at β-lg interfacial saturation. If the interface were not entirely covered by β-lg, the added GA would probably be able to influence the interfacial tension by co-adsorption at the oil–water interface.

3.4. Interfacial dilational rheology

The pendant drop technique allowed the determination of the time-dependent interfacial tension and interfacial viscoelastic parameters of adsorbed β-lg and GA films at the oil–water interface.

3.4.1. β-lactoglobulin

The evolutions of elastic (E') and viscous (E'') moduli, and phase angle (δ) for oil–water films obtained with 0.5 and 2.5 (w/w)% β-lg solutions are compared in Fig. 9. At both concentrations, the elastic component was predominant over the viscous one: $E' \gg E''$. The

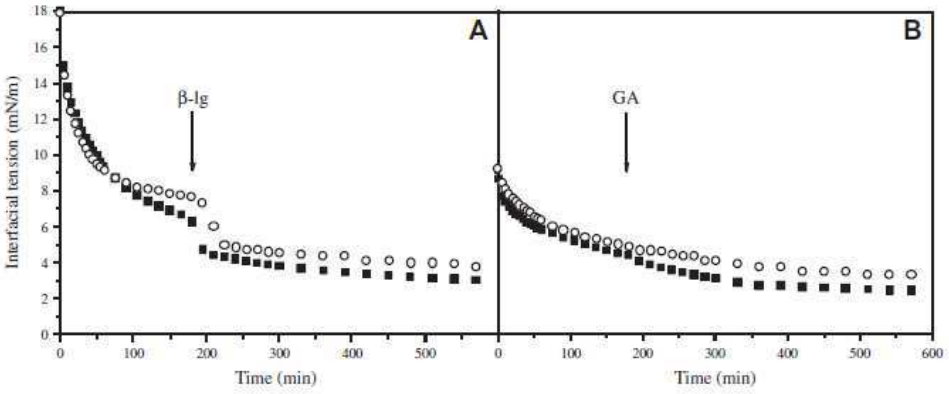


Fig. 8. Time evolution of the interfacial tension for oil-2.5 (w/w)% β-lg:GA aqueous solutions. (A) ○ 2:1, and ■ 1:2 β–lg:GA ratios with injected β-lg in the GA solution. (B) ○ 2:1, and ■ 1:2 β–lg:GA ratios with injected GA in the β-lg solution measured by the WPM. Arrow indicates the biopolymer injection time (3 h).

Author's personal copy

elastic moduli increased until reaching a maximum and then decreased with time. The viscous moduli decreased until low values (lower than 1 mN/m) were reached. This E' behaviour has already been reported by Joos [50] and Ipsen et al. [51] for β-lg at the air–water interface. However, Roth et al. [52] did not observe this decrease in E' at the oil–water interface. It is worth noticing that various experimental techniques were used by these authors [50–52]: Wilhelmy plate suspended to an electrobalance, the De Noüy ring, and a Couette-type interfacial viscosimeter equipped with a biconical disk, respectively. The discrepancy between the reported behaviours could thus also be explained by the differences of techniques.

As reported by Wüstneck et al. [53], at low biopolymer concentrations, the adsorption proceeds first at a clean interface that is free of protein molecules. When the first molecule reaches the interface in optimal conditions, it can fully adsorb at any locus and occupy a maximum interface area. The molecular unfolding, although limited for globular proteins [54], is not restricted. At higher concentrations, abundant lateral protein–protein interactions probably induce a more compact conformation of the protein. At interfacial saturation, elastic and viscous moduli reach a maximum and for higher interfacial concentrations, both moduli decrease. The concentrations represented in Fig. 9 are well above the interfacial saturation concentration, as shown previously, thus disturbing the optimal interfacial organization. A too large amount of protein would adsorb at the interface in a short time and could not be optimally arranged. This could indicate a collapse-type phenomenon, slow reconformation or exchange with multi-layers [9], thus leading to a decrease of interfacial elastic and viscous moduli. On the other hand, this would increase the thickness of the adsorbed layer [55] thus enabling stronger steric repulsions between oil droplets. At both studied β-lg concentrations, the same E' profile was observed and confirmed the results described in Section 3.3.1, showing the rapid diffusion step at these concentrations (well above the interfacial saturation). The E' maximum was observed earlier and was higher for the 0.5 (w/w)% concentration. During adsorption and at low concentration, the first adsorbed protein molecules occupied a maximum of the interface area and there was a limited hindrance in molecular unfolding. At higher concentrations, protein molecules faced restrictions in molecular unfolding which led to different rearrangements [53,56]. This could explain the earlier and higher E' maximum obtained at 0.5 (w/w)%, compared to 2.5 (w/w)%. At the former concentration, protein molecules were less restricted during their diffusion, adsorption and rearrangement steps than at the latter, inducing a faster and more intense expression of the elastic character. It is worth noticing that Ganzevles et al. [57] reported similar results for β-lg:pectin complexes at the air–water interface. In our experiments, the final E' modulus value for the 2.5 (w/w)% concentration was smaller than for the 0.5 (w/w)% one. The interface was probably better organized at 0.5% and there were probably more interfacial multi-layers at 2.5% β-lg concentration than at 0.5%. As a consequence of this better organisation, the phase angle obtained at 0.5% β-lg concentration was smaller than 45° at the beginning of the experiment confirming a predominantly elastic interface. At 2.5% β-lg concentration, δ values started above 45° and decreased in a few seconds below this value. At both concentrations, the behaviour became very quickly purely elastic with a final δ value lower than 1°. The 2.5% β-lg solution showed a slower decrease in the phase angle in agreement with increased protein molecular hindrance with concentration during the adsorption process.

3.4.2. Gum arabic

Fig. 10 shows the evolution of E', E'', and δ for the 0.5 and 2.5 (w/w)% pure GA films. The curves obtained with 2.5% GA are very similar in shape to those obtained with β-lg. E' increases up to a maximum and then decreases, always being higher than E''. The same conclusion as for β-lg solutions can thus be drawn regarding interfacial saturation. Interestingly, the curve profile was different when GA was at 0.5 (w/w)% concentration. In this latter case, E' increased with time, and reached the equilibrium state after 12 h, without indicating any interfacial saturation. E'' remained smaller than E' and decreased slowly. As reported by Nciri et al. [58], the interface became thus more elastic than viscous and so more structured with time. This suggests an increase of intermolecular interactions between adsorbed segments. An explanation for the much higher E' value obtained at 0.5% compared to 2.5% could be that interfacial saturation has probably not been reached yet at 0.5%. At this concentration, GA molecules can rearrange freely in their optimal conformation, whereas it was not the case at 2.5%. Erni et al. [27] obtained similar profiles as ours (at 0.5%) but at 10 and 20% GA concentrations. This difference might be explained by the gum type, origin, and age [29]. Erni et al. [27] probably used a GA with a different composition of AGP components. Another explanation could be the difference in the measuring technique: they recorded data from interfacial shearing rheology and we used interfacial dilational rheology.

The phase angle started from values above 45° for the 0.5 (w/w)% concentration, showing a predominantly viscous interface

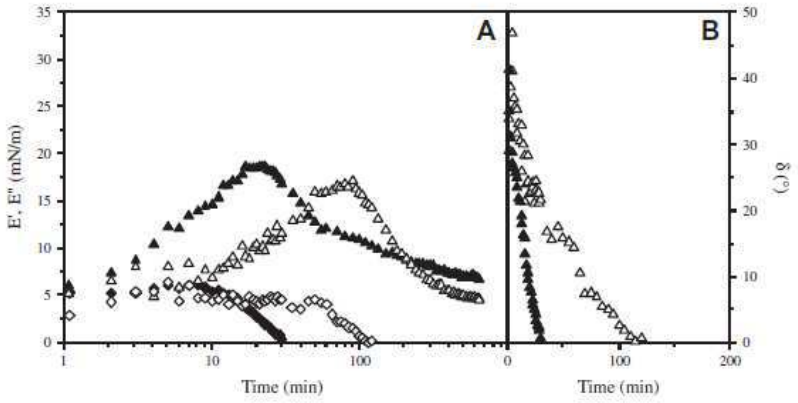


Fig. 9. Elastic (E') and viscous (E'') interfacial moduli (A) and phase angle (δ) (B) *versus* time for β-lg at 0.5 and 2.5 (w/w)% concentrations: ▲ E' 0.5%, Δ E' 2.5%, ♦ E'' 0.5%, ◇ E'' 2.5%, ▲ δ 0.5%, and Δ δ 2.5%.

Author's personal copy

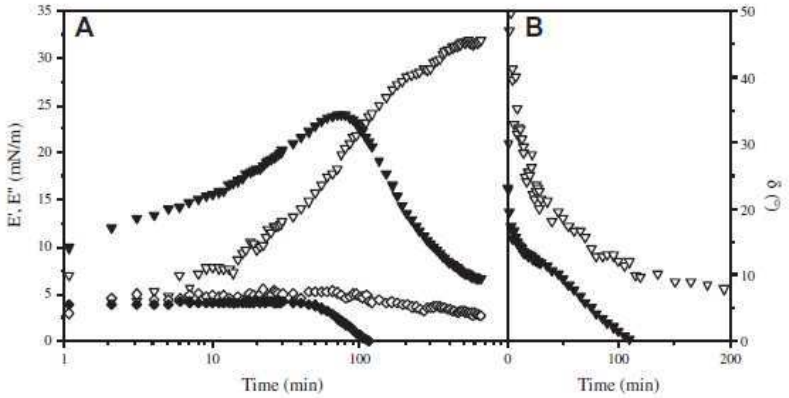


Fig. 10. Elastic (E') and viscous (E'') interfacial moduli (A) and phase angle (δ) (B) *versus* time for GA at 0.5 and 2.5 (w/w)% concentrations: ▽ E' 0.5%, ▼ E' 2.5%, ◇ E'' 0.5%, ♦ E'' 2.5%, ▽ δ 0.5%, and ▼ δ 2.5%.

at the beginning, becoming very quickly (in few seconds) more elastic than viscous. However, at 2.5 (w/w)%, GA molecules were more concentrated in the solution and could therefore, adsorb to the interface more quickly, inducing an elastic behaviour from the beginning. For both concentrations elasticity increased over time with GA adsorption.

From these results, it may be inferred, that both β-lg and GA allow the formation of elastic films at the oil–water interface. Their elastic moduli remain well above their viscous moduli. The elastic modulus maximum at 2.5% was higher for GA (24 mN/m) than for β-lg (18 mN/m). The gum anchoring to the interface through the AGP fraction seems to be very effective. Probably, its conformation and structure (wattle blossom model) [28,30] favours its interfacial adsorption and elasticity. The polypeptidic groups extend into the oil phase while the polysaccharide moieties are immersed in the solution thus giving a pronounced interfacial elasticity.

4. General discussion

The ACE appeared to be a satisfactory method to investigate the affinity between the two biopolymers in aqueous solutions. It showed that β-lg and GA could establish attractive electrostatic interactions with a binding constant in the order of 10^8 M^{-1}. Interfacial measurements by the WPM showed that β-lg:GA complexes exhibited slightly improved interfacial properties compared to the single biopolymers.

Formulating emulsions with β-lg, GA, and their complexes, very different stabilities were obtained when varying the biopolymer and the formulation protocol. Surprisingly, in our conditions, β-lg on its own was the most efficient to stabilize emulsions, although very good interfacial properties were observed for β-lg:GA complexes.

β-lg stabilized emulsions even at very low concentrations (0.5 (w/w)%). However, the stability was improved at 2.5 (w/w)% β-lg. The WPM has demonstrated that interfacial saturation was achieved at both concentrations. Oil-β-lg solution interfacial tension measurements showed that the interfacial tension kept decreasing even after 24 h showing interfacial adsorption and rearrangements. Recently, Lee et al. [59] described the changes in secondary structure of β-lg upon its adsorption at the soy oil–water interface. They found that after protein adsorption, the structural changes were mainly localized in the β-sheet structure region to form interactions with the neighbouring proteins. Some changes also occurred in the α-helical structure, consistent with the formation of interactions with the soy oil phase. Our interfacial rheological measurements also suggested more lateral interactions between proteins when increasing the interfacial coverage. A high surface coverage would then produce an interface with proteins that are not optimally packed. However, increased β-lg concentrations probably enhanced the lateral interactions and/or the thickness of the interfacial β-lg multi-layers, which in turns allowed improved emulsion stability. Bos et al. [9] consider that dilational elasticity and viscosity are very important indicators concerning film rupture, as this rupture can mainly be seen as a dilational deformation. If we consider emulsion stability, this means that if two droplets of the emulsion encounter, the elastic interface resists to the strain stress created by the deformation of the droplets, thus preventing coalescence and favouring emulsion stability [60]. This elasticity together with the low d_{43} value of β-lg emulsion droplets, explain the improved stability observed for this system.

GA at the concentration of 2.5 (w/w)% also allowed the formulation of emulsions. It probably better diffused and covered the interface at this concentration than at 0.5 (w/w)%. Interfacial analysis showed the existence of a short delay in interfacial tension decrease and before the apparition of elastic properties. Similarly, during the emulsion formulation process, GA probably needed time before controlling the interfacial properties and thus, was unable to stabilize poorly concentrated emulsions (below 2.5% GA). Interfacial rheological measurements showed that both β-lg and GA allowed the formation of elastic films at the oil–water interface. This technique suggests that GA would be more efficient in stabilizing oil-in-water emulsions (higher interfacial elasticity). The stability results obtained for β-lg and GA stabilized emulsions showed the contrary. This discrepancy could be due to phenomena that cannot be characterized with the pendant drop method such as bridging and depletion flocculations that can occur during the process of emulsification in turbulent flow, and during aging. This demonstrates the importance of combining several characterization techniques (laser diffraction, electrophoretic mobility) to understand emulsion stability. Indeed, if a structured interface is efficient in stabilizing emulsion against coalescence, the stability also mainly depends on droplet size (as d_{43} was larger for GA emulsion than for β-lg ones), and density. Moreover, it can be affected by flocculation mechanisms.

β-lg:GA mixtures stabilized emulsions differently when the two biopolymers were mixed immediately or added one after another. In the case of protocol 1, there is adsorption of surface active β-lg:GA complexes as demonstrated by interfacial measurements, however, no stable emulsions were obtained. An explanation might be that the concentration was not high enough to stabilize the emulsion. Moreover, the contact time between the two

Author's personal copy

biopolymers before the formulation of the emulsions could be increased in order to let the complexes rearrange themselves [31]. Emulsions formed first with GA and to which β-lg was then added (protocol 2) were not stable for a day. Interfacial measurements performed with the WPM showed that when β-lg was added after GA, it induced a significant decrease in the interfacial tension, confirming the co-adsorption of β-lg and GA at the interface. However, in protocol 2, β-lg molecules were added to an unstable emulsion with very large globules that could not be stabilized by the protein either.

Emulsions formed by β-lg first, and to which GA was then added (protocol 3) were only stable for a few days. Since β-lg could form stable emulsions at the two studied concentrations, GA interacted with the already adsorbed interfacial protein layer. Interfacial measurements showed that GA seemed unable to displace β-lg molecules from the interface but could form an external layer through electrostatic interactions with the adsorbed protein. However, the depiction of Fig. 3 is probably very simplistic, as we also have to consider the existence of excess free and complexed biopolymers in the aqueous phase. They can influence the stabilization mechanisms by inducing depletion or bridging flocculation. This could be an explanation to the faster occurrence of phase separation when stabilizing the emulsions with β-lg:GA mixtures, than without the gum. These destabilization mechanisms were evidenced by Gharsallaoui et al. [61] when stabilizing emulsions with pea proteins and high methoxyl pectin.

The results obtained in our study showed that the emulsification protocol has much influence on the stability of emulsions. All interfacial tension measurements showed that the interfacial organization was not the same in the case of co-adsorption of the two biopolymers or in the case of their successive adsorption. The results obtained thus indicated that the formulation protocol influenced emulsion stability by modifying the adsorbed organization of the biopolymers. Jourdain et al. [62] obtained similar conclusions with caseinate:dextran sulphate stabilized emulsions. Moreover, in another study [63], these authors precised that different interfacial composition led to different interfacial properties thus influencing emulsion stability. This is also in agreement with our results. However, some differences with our system are worth noticing: for instance, dextran sulphate is not surface active, their studies were conducted at a pH above the caseinate p*I*, and caseinate is not a globular protein. This last point is of importance as globular proteins and flexible β-casein display very different interfacial properties [64]. Caseins are more surface active than β-lg [65].

In a more general context, these interfacial organizations (co- or successive adsorptions) can be compared with what is obtained at the air–water interface. Schmitt et al. [66] described higher interfacial and foam stabilizing properties of β-lg:GA at pH 4.2 and 2:1 ratio as compared to the protein on its own. We also observed a higher interfacial tension decrease for the complexes compared to the biopolymers alone. In their work on β-lg and pectin, Ganzevles et al. [57] showed by surface dilational rheology that adsorption of pectin can reinforce an already existing β-lg layer at the interface and that pectin can complex with the remaining proteins in the bulk. The negatively charged complexes can therefore bind to the positively charged adsorbed protein layer. GA alone or in combination with free β-lg could also electrostatically interact with the previously adsorbed β-lg layer at the oil–water interface. This organization can not be possible when the two biopolymers are first mixed in the bulk. However, it is important to note that differences between the oil–water and the air–water interfaces exist. For example, Murray [67] measured interfacial pressure-area of β-lg (at pH 7) spread films at the air–water and oil–water interfaces. He found that films were more expanded at the oil–water interface than at the air–water one, and suggested that in this latter case monolayers were in a more aggregated state.

The best way to combine β-lg and GA for emulsion stabilization was first to adsorb the protein at the interface and then add the polysaccharide. This order is in agreement with the observations of Klein et al. [31]. However, they found increased stability for emulsion stabilized with this mixed system. In the literature, both cases are encountered (increased [31,68] and decreased [69] stability) when mixing proteins and polysaccharides for emulsion stabilization. Experimental conditions allowing better stability of a multilayer stabilized system *versus* a single layer stabilized one are very difficult to determine. They depend on the nature, charge, concentration, and ratio of biopolymers, and the ionic strength and pH of the aqueous medium [14]. The next step to this work will be to identify these optimal experimental conditions for this mixed system.

5. Conclusion

This study showed the interest of β-lg, GA, and their complexes for the formulation of pharmaceutical emulsions. Different experimental protocols were screened to understand biopolymers stabilization mechanisms. Two biopolymers, two concentrations, two ratios, and three formulation protocols were investigated. β-lg allowed the stabilization of emulsions at 0.5 (w/w)% and 2.5 (w/w)% concentrations. GA stabilized emulsions at 2.5% concentration but for only two days. The combination of β-lg and GA allowed the formulation of emulsions when the protein was first adsorbed at the interface and GA added later, forming an interfacial complex and a second layer around the droplet. This multilayer stabilization mechanism found for the mixed β-lg:GA system should improve emulsion stability against environmental stresses. Interfacial tension and rheological measurements gave a better insight into the stabilizing mechanisms of these biopolymers and their complexes. Interfacial tension measurements confirmed the surface activity of both biopolymers and allowed the determination of the bi-layer stabilization mechanism. For this mixed system, more experiments must be performed to determine the optimal experimental conditions for enhancing the stability of β-lg stabilized emulsion when adding GA with respect to the single biopolymers. The good interfacial properties of the β-lg:GA complexes are very promising and raise the prospect of formulating synthetic surfactant free emulsions containing a pharmaceutical active molecule.

Acknowledgments

We thank Dr. Nicolas Huang for useful discussions on the interfacial rheology measurements and Morgane Beigneux and Ni Zeng for their technical assistance in the experimental work. Dr. Claire Gaiani and Carole Jeandel (LIBio, ENSAIA-INPL) are acknowledged for the Kjeldahl analysis.

References

[1] G. Secchi, Clin. Dermatol. 26 (2008) 321.
[2] N. Garti, Colloids Surf., A 152 (1999) 125.
[3] R. Lutz, A. Aserin, L. Wicker, N. Garti, Colloids Surf., B 72 (2009) 121.
[4] B.F. McNamee, E.D. O'Riordan, M. O'Sullivan, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4551.
[5] M.L. Jayme, D.E. Dunstan, M.L. Gee, Food Hydrocolloids 13 (1999) 459.
[6] S.R. Euston, S.R. Finnigan, R.L. Hirst, Food Hydrocolloids 14 (2000) 155.
[7] X. Huang, Y. Kakuda, W. Cui, Food Hydrocolloids 15 (2001) 533.
[8] S. Damodaran, J. Food Sci. 70 (2005) 54.
[9] M.A. Bos, T.V. Vliet, Adv. Colloid Interface Sci. 91 (2001) 437.
[10] D.J. McClements, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 9 (2004) 305.
[11] E. Dickinson, in: K.L. Mittal, Promod. Kumar (Eds.), An Introduction to Food Colloids, Oxford University Press, New York, 1992, p. 140.
[12] C. Sun, S. Gunasekaran, M.P. Richards, Food Hydrocolloids 21 (2007) 555.
[13] I. Capek, Adv. Colloid Interface Sci. 107 (2004) 125.

Author's personal copy

[14] E. Dickinson, in: A.M. Stephen (Ed.), Food Polysaccharides and their Applications, M. Dekker, New York, 1995, p. 501.
[15] E. Dickinson, in: P.A. Williams, G.O. Phillips (Eds.), Gums and Stabilisers for the Food Industry-14, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008, p. 221.
[16] E. Dickinson, Soft Matter 4 (2008) 932.
[17] D. Guzey, D.J. McClements, Adv. Colloid Interface Sci. 128–132 (2006) 227.
[18] Y.S. Gu, E.A. Decker, D.J. Mc Clements, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 3626.
[19] Y.S. Gu, E.A. Decker, D.J. Mc Clements, Langmuir 21 (2005) 5752.
[20] P. Thanasukarn, R. Pongsawatmanit, D.J. McClements, Food Res. Int. 39 (2006) 721.
[21] Y.S. Gu, E.A. Decker, D.J. Mc Clements, J. Agric. Food Eng. 80 (2007) 1246.
[22] T. Aoki, E.A. Decker, D.J. McClements, Food Hydrocolloids 19 (2005) 209.
[23] M.A. Meza-Nieto, B. Vallejo-Cordoba, A.F. Gonzalez-Cordova, J. Dairy Sci. 90 (2007) 582.
[24] D.M.W. Anderson, M.M.E. Bridgeman, J.G.K. Farquhar, C.G.A. Mc Nab, Int. Tree Crops 2 (1983) 245.
[25] O.H.M. Idris, P.A. Williams, G.O. Phillips, Food Hydrocolloids 12 (1998) 379.
[26] R.C. Randall, G.O. Phillips, P.A. Williams, Food Hydrocolloids 2 (1988) 131.
[27] P. Erni, E.J. Windhab, R. Gunde, M. Graber, B. Pfister, A. Parker, P. Fischer, Biomacromolecules 8 (2007) 3458.
[28] L. Picton, I. Bataille, G. Muller, Carbohydr. Polym. 42 (2000) 23.
[29] M.L. Fauconnier, C. Blecker, J. Groyne, H. Razafindralambo, E. Vanzeveren, M. Marlier, M. Paquot, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 2709.
[30] E. Dickinson, Food Hydrocolloids 17 (2003) 25.
[31] M. Klein, A. Aserin, I. Svitov, N. Garti, Colloids Surf., B 77 (2010) 75.
[32] G.F. Palmieri, S. Martell, D. Lauri, P. Wehrle, Drug Dev. Ind. Pharm. 22 (1996) 951.
[33] H. Jizomoto, E. Kanaoka, K. Sugita, K. Hirano, Pharmaceut. Res. 10 (1993) 1115.
[34] A. Lamprecht, U.F. Schäfer, C.-M. Lehr, Eur. J. Pharm. Biopharm. 49 (2000) 1.
[35] I.J. Colton, J.D. Carbeck, J. Rao, G.M. Whitesides, Electrophoresis 19 (1998) 367.
[36] G. Mekhloufi, C. Sanchez, D. Renard, S. Guillemin, L. Hardy, Langmuir 21 (2005) 386.
[37] C. Schmitt, Ph.D. Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine: Nancy, France, 2000.
[38] M. Dribek, I. Le Potier, A. Rodrigues, A. Pallandre, E. Fattal, M. Taverna, Electrophoresis 28 (2007) 2191.
[39] N. Iki, E.S. Yeung, J. Chromatogr., A 731 (1996) 273.
[40] C. Ringard-Lefebvre, A. Bochot, E. Memisoglu, D. Charon, D. Duchêne, A. Baszkin, Colloids Surf., B 25 (2002) 109.
[41] M. El-Mahrab-Robert, V. Rosilio, M.A. Bolzinger, P. Chaminade, J.L. Grossiord, Int. J. Pharm. 348 (2008) 89.
[42] G. Mekhloufi, Ph.D. Thesis; Institut National Polytechnique de Lorraine: Nancy, France, 2005.
[43] V. Lemesle-Lamache, M. Taverna, D. Wouessidjewe, D. Duchêne, D. Ferrier, J. Chromatogr. A 735 (1996) 321.
[44] C. Schmitt, T. Palma da Silva, C. Bovay, S. Rami-Shojaei, P. Frossard, E. Kolodziejczyk, M.E. Leser, Langmuir 21 (2005) 7786.
[45] S. Laplante, S.L. Turgeon, P. Paquin, Food Hydrocolloids 19 (2005) 721.
[46] E. Akiyama, A. Kashimoto, K. Fukuda, H. Hotta, T. Suzuki, T. Kitsuki, J. Colloid Interface Sci. 282 (2005) 448.
[47] B. Demé, V. Rosilio, A. Baszkin, Colloids Surf., B 4 (1995) 357.
[48] V. Ducel, J. Richard, Y. Popineau, F. Boury, Biomacromolecules 6 (2005) 790.
[49] S. Tcholakova, N.D. Denkov, I.B. Ivanov, B. Campbell, Adv. Colloid Interface Sci. 123–126 (2006) 259.
[50] P. Joos, Biochem. Biophys. Acta 375 (1975) 1.
[51] R. Ipsen, J. Otte, R. Sharma, A. Nielsen, L.G. Hansen, K.B. Qvist, Colloids Surf., B 21 (2001) 173.
[52] S. Roth, B.S. Murray, E. Dickinson, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 1491.
[53] R. Wüstneck, B. Moser, G. Muschiolik, Colloids Surf., B 15 (1999) 263.
[54] M.B. Meinders, H.H.J. de Jongh, Biopolymers 67 (2002) 319.
[55] D.E. Graham, M.C. Phillips, J. Colloid Interface Sci. 70 (1979) 427.
[56] A.A. Perez, C.R. Carrara, C. Carrera Sanchez, L.G. Santiago, J.M. Rodriguez Patino, Food Hydrocolloids 23 (2008) 1253.
[57] R.A. Ganzevles, K. Zinoviadou, T. van Vliet, M.A. Cohen Stuart, H.H.J. de Jongh, Langmuir 22 (2006) 10089.
[58] H. Nciri, N. Huang, V. Rosilio, M. Trabelsi-Ayadi, M. Benna-Zayani, J.-L. Grossiord, Rheol. Acta 49 (2010) 961.
[59] S.-H. Lee, T. Lefèvre, M. Subirade, P. Paquin, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 10924.
[60] A. Laza-Knoerr, N. Huang, J.-L. Grossiord, P. Couvreur, R. Gref, J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. doi:10.1007/s10847-010-9805-5.
[61] A. Gharsallaoui, K. Yamauchi, O. Chambin, E. Cases, R. Saurel, Carbohyd. Polym. 80 (2010) 817.
[62] L. Jourdain, M.E. Leser, C. Schmitt, M. Michel, E. Dickinson, Food Hydrocolloids 22 (2008) 647.
[63] L. Jourdain, C. Schmitt, M.E. Leser, B.S. Murray, E. Dickinson, Langmuir 25 (2009) 10026.
[64] E. Dickinson, J. Dairy Sci. 80 (1997) 2607.
[65] H. Singh, A. Ye, in A. Thompson, M.J. Boland, H. Singh (Eds.), Milk Proteins, from Expression to Food, Elsevier, Amsterdam, 2009, p. 321.
[66] C. Schmitt, E. Kolodziejczyk, M.E. Leser, in: E. Dickinson (Ed.), Food Colloids: Interactions, Microstructure and Processing, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2005, p. 284.
[67] B.S. Murray, Colloids Surf., A 125 (1997) 73.
[68] E. Ibanoglu, J. Food Eng. 52 (2002) 273.
[69] A. Ye, Y. Hemar, H. Singh, Food Hydrocolloids 18 (2004) 737.

V. Etude de la diffusion de la β-lactoglobuline à l'interface huile-eau.

La détermination du coefficient de diffusion de la β-lactoglobuline a été réalisée à partir de mesures de la tension interfaciale entre des solutions de β-lg à différentes concentrations et de l'huile. Les mesures de tensions interfaciales ont été réalisées à l'aide du tensiomètre à lame de Wilhelmy (Digital tensiometer K10ST Krüss, Hamburg, Allemagne), décrit dans la section II de ce chapitre, en collaboration avec le Pr. Véronique Rosilio et le Dr. Catherine Ringard. L'huile a été délicatement rajoutée à la surface de la solution de β-lg à analyser de façon à totalement immerger la lame (Figure 21). Le zéro avait été effectué préalablement à la mesure en immergeant la lame de Wilhelmy dans l'huile. La gamme de concentrations de solutions de β-lg était de 2,3 x 10^{-5} à 3 (m/m) %. Ces mesures ont initialement été réalisées afin de déterminer si les concentrations de β-lg utilisées pour la formulation des émulsions (0,5 et 2,5 %) étaient en excès ou non pour saturer l'interface huile-eau.

Elles n'ont, dans un premier temps, pas été réalisées pour la GA car les émulsions obtenues aux concentrations étudiées (0,5 et 2,5 %) n'étaient pas stables (voir article à la section précédente). Pour plus de précisions sur les conditions expérimentales, se référer à la partie IV de ce chapitre.

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication 2 qui précède, cependant pour une meilleure compréhension de la méthode de détermination du coefficient de diffusion, ils sont également représentés dans la Figure 24.

Cette figure montre la variation de la tension interfaciale à l'équilibre (après 24 h) des différentes solutions de β-lg en fonction du logarithme népérien de la concentration en protéine. La jonction entre les deux droites représentées dans la figure se trouve à une concentration d'environ 7 x 10^{-4} (m/m) % qui correspondrait à la concentration permettant de saturer l'interface par les molécules de β-lg.

Aux temps courts et pour des concentrations faibles, il reste des sites d'adsorption libres à l'interface et il n'y a pas de barrière énergétique à l'adsorption.

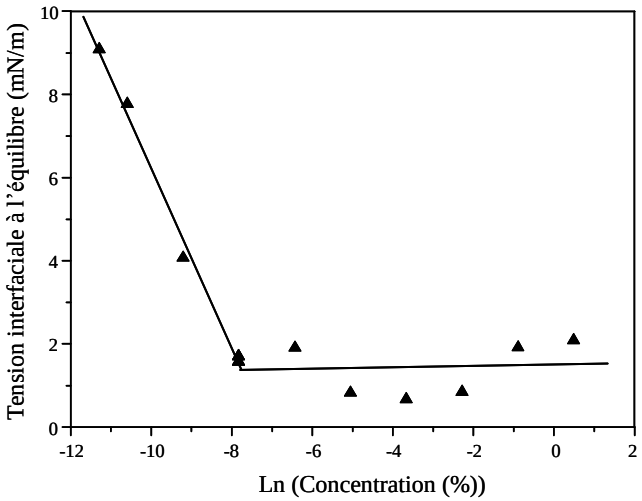


Figure 24 : *Tension interfaciale à l'équilibre (après 24 h) en fonction du logarithme népérien de la concentration des solutions de β-lg.*

Ward et Tordaï (1946) ont défini le nombre de molécules diffusant au travers d'une section de phase continue et donc à l'interface au temps t par la relation :

$$\Gamma = 2C\left(\frac{Dt}{\pi}\right)^{1/2} \qquad \text{Equation 18}$$

avec Γ la concentration de surface (mol/m^2), C la concentration en solution (mol/m^3), et D le coefficient de diffusion (m^2/s). Cette relation est linéaire lorsque l'adsorption interfaciale se fait sans barrière énergétique.

L'équation simplifiée de Gibbs relie Γ et la tension interfaciale (γ) (Baskin *et al.*, 1991) :

$$\Gamma = -\frac{1}{RT}\left(\frac{d\gamma}{d\ln C}\right) \qquad \text{Equation 19}$$

avec R la constante des gaz parfaits (8,314 JK^{-1}mol^{-1}) et T la température (K).

En combinant les équations 18 et 19, on obtient :

$$\gamma = \gamma_0 - 2CRT\left(\frac{Dt}{\pi}\right)^{1/2} \qquad \text{Equation 20}$$

avec γ_0, la tension interfaciale initiale.

Lorsque cette relation n'est plus linéaire, cela signifie que le processus d'adsorption n'est plus uniquement contrôlé par la diffusion. La Figure 25 représente nos résultats tracés suivant cette dernière équation pour les 900 premières secondes de l'adsorption de la β-lg.

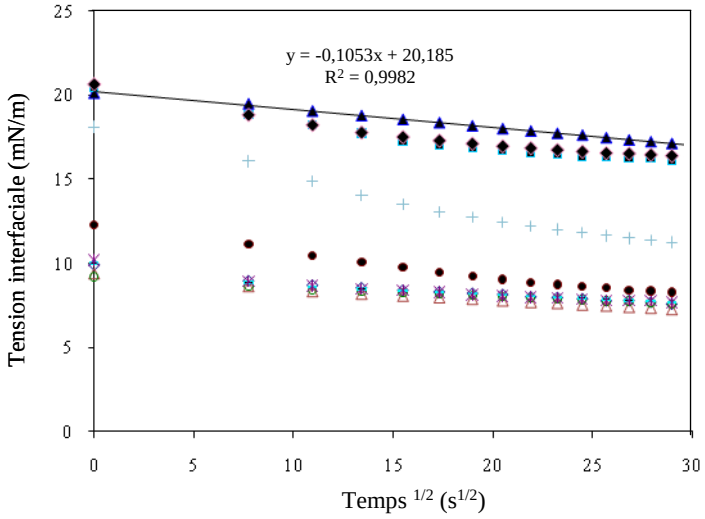


Figure 25 : *Evolution de la tension interfaciale en fonction de la racine carrée du temps pour les solutions de β-lg. (◆) 2,3 × 10^{-5} %, (■) 4,6 × 10^{-5} %, (▲) 1,8 × 10^{-4} %, (+) 7,3 × 10^{-4} %, (●) 2,9 × 10^{-3} %, (∗) 1,2 × 10^{-2} %, (-) 4,7 × 10^{-2} %, (○) 1,9 × 10^{-1} %, (△) 7,5 × 10^{-1} %, (◇) 3 %.*

La concentration de 7,3 x 10^{-4} % correspondant au point de rupture de pente de la Figure 24 semble ici être la concentration à partir de laquelle la courbe $\gamma = f(t^{1/2})$ n'est plus linéaire.

La pente de l'équation 20 pour la concentration de 1,8 x 10^{-4} % (précédent la concentration limite et dont l'équation est présentée sur la Figure 25) permet donc de calculer le coefficient de diffusion de la β-lg à l'interface, dans des conditions initiales. La Figure 25 montre une droite de pente p = - 0,1053 mN.m^{-1}.s$^{-1/2}$.

On a donc d'après l'équation 20 :

$$p = -2CRT\left(\frac{D}{\pi}\right)^{1/2} \qquad \text{Equation 21}$$

soit

$$D = \frac{p^2 \pi}{4R^2 C^2 T^2}$$ Equation 22

L'application numérique avec $C = 1{,}8 \times 10^{-4}$ (m/m) % soit 1×10^{-4} mol/m^3 ($M_{monomère}$ = 18 400 g/mol).

$T = 298$ K

$p = - 0{,}1053 \times 10^{-3}$ N.m^{-1}.s$^{-1/2}$

donne un coefficient de diffusion de la protéine $D = 1 \times 10^{-7}$ m^2/s.

Ce même calcul effectué avec la masse molaire de la protéine sous forme de dimère ($M_{dimère}$ = 36 800 g/mol) conduit à $D = 6 \times 10^{-7}$ m^2/s, ce qui reste du même ordre de grandeur que pour le monomère.

Dans un second temps, le coefficient de diffusion de la GA devrait également être déterminé afin de le comparer avec celui de la β-lg et ainsi confirmer que sa diffusion initiale est moins rapide, retardant l'effet au niveau de la tension interfaciale.

CHAPITRE 6 - Etude de la stabilité d'émulsions huile-dans-eau formulées à l'aide de β-lactoglobuline, de gomme arabique et/ou de gomme xanthane.

I. Introduction - résumé

Ce chapitre s'intéresse à la formulation et à la stabilisation d'émulsions huile-dans-eau par la β-lg et par deux polysaccharides ayant des mécanismes de stabilisation différents, à savoir la GA s'adsorbant à l'interface et la GX augmentant la viscosité de la phase continue. Nous avons de la même manière qu'au Chapitre 5, formulé dans un premier temps les émulsions à l'aide de ces biopolymères, puis étudié les mécanismes mis en jeu par ces biopolymères pour la stabilisation des émulsions.

Plusieurs émulsions ont tout d'abord été formulées, à l'aide de β-lg, de GA, de GX, de mélanges β-lg : GA et β-lg : GX. L'association β-lg : GA a été réalisée à pH 4,2 afin de permettre l'établissement d'interactions électrostatiques attractives entre ces biopolymères. La combinaison β-lg : GX a, quant à elle, été réalisée à pH 7 où l'établissement d'interactions attractives n'était pas possible, ces deux biopolymères étant globalement chargés négativement à ce pH. La stabilité de ces émulsions a été évaluée sur une période de 6 mois à température ambiante et à l'abri de la lumière. La concentration massique totale en biopolymère était initialement de 1 % et a été augmentée à 2,5 % dans le cas où les émulsions à 1 % n'étaient pas stables.

Dans ce travail, il a été montré par des mesures de diffraction laser, d'intensité de retrodiffusion et des observations au microscope confocal après marquage des biopolymères à la fluorescence, que la stabilité des émulsions obtenues pouvait être classée ainsi : GA < β-lg : GA < β-lg < GX = β-lg : GX. Différents mécanismes de stabilisation ont ainsi pu être mis en évidence : par adsorption interfaciale de β-lg ou de GA, par épaississement de la phase continue de l'émulsion avec la GX, par formation d'une bi-couche de β-lg et de GA à

l'interface, et pour la β-lg : GX, l'adsorption interfaciale de la protéine a été combinée à l'épaississement de la phase continue par le polysaccharide.

Ce chapitre comprend tout d'abord une description des principales techniques de caractérisation utilisées (les autres techniques de caractérisation ayant été présentée dans les chapitres précédents). Un article devant être soumis à *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* est ensuite présenté dans la section III de ce chapitre.

II. Principales techniques d'analyses mises en œuvre

1 - Turbiscan™

Le Turbiscan™ (Formulaction, France) permet d'effectuer des mesures optiques sur des dispersions, par transmission ou rétrodiffusion. Le suivi de l'évolution de la séparation de phases pouvant avoir lieu dans ces dispersions permet d'évaluer leur état de stabilité. L'échantillon à analyser est placé dans un tube en verre, fermé par un bouchon (Figure 26). L'appareil balaye ensuite verticalement l'échantillon grâce à une source lumineuse émettant dans le proche infrarouge (diode électroluminescente, $\lambda = 850$ nm). Deux détecteurs sont capables de recevoir la lumière transmise (à l'angle de 0°) et la lumière rétrodiffusée (à l'angle de 135°) tous les 40 µm le long du tube. Les flux lumineux transmis et rétrodiffusé sont exprimés en pourcentage en fonction de la hauteur du tube (mm). Les profils obtenus décrivent l'état d'un échantillon à un instant donné.

Dans cette thèse, l'évaluation de la stabilité des émulsions a été menée à l'aide d'un Turbiscan™ MA 2000 en collaboration avec le Dr. Christine Vauthier (Equipe 6 : Amélioration du passage des barrières par les molécules biologiquement actives, UMR CNRS 8612). Ces analyses ont été réalisées de façon périodique jusqu'à ce qu'un déphasage soit détecté dans le tube.

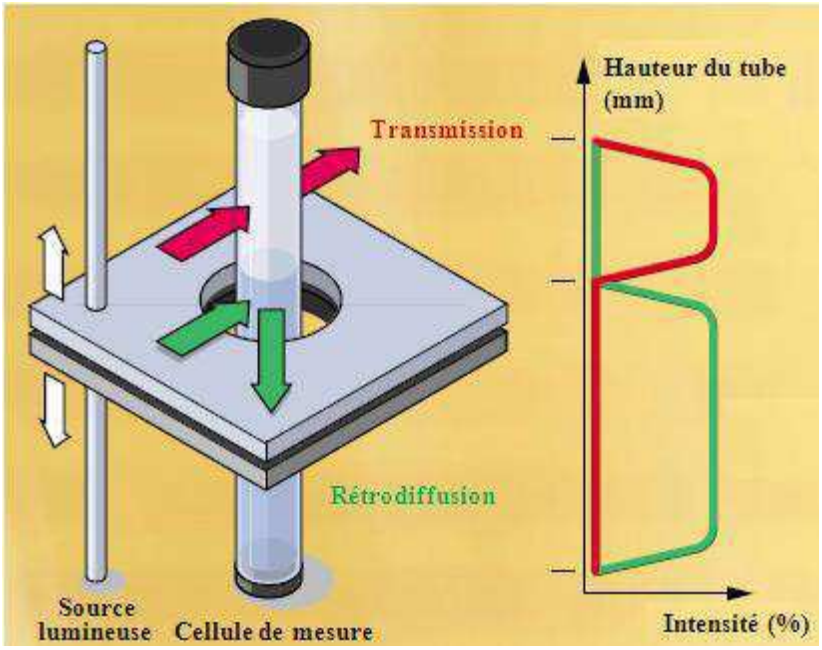


Figure 26 : *Principe de fonctionnement du Turbiscan^{TM} (adapté du site internet de Formulaction).*

2 - Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

Cette technique est réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser, ou confocal laser scanning microscope en anglais (CLSM). Son principe de fonctionnement a initialement été décrit par Mervin Minsky (Minsky, 1967). Il s'agit d'une adaptation d'un microscope optique conventionnel afin de réaliser des images de très faible profondeur de champs, nommées « sections optiques ». Pour cela, le plan focal de l'objectif est positionné à différents niveaux de profondeur de l'échantillon, et la lumière émise ou réfléchie à partir de ce plan focal uniquement, est focalisée (Figure 27). Les autres faisceaux lumineux sont arrêtés par un diaphragme de détection (« pinhole ») placé en avant du détecteur photomultiplicateur (Conchello et Lichtman, 2005). Le signal issu du photomultiplicateur est traduit en une valeur numérique entière appelée « niveau de gris » stockée dans la mémoire de l'ordinateur. Chaque point du plan focal est traduit dans l'image numérisée par un pixel dont l'intensité est proportionnelle à l'intensité de fluorescence de l'échantillon. L'ensemble des sections optiques reconstitue ainsi une image tridimensionnelle à l'ordinateur.

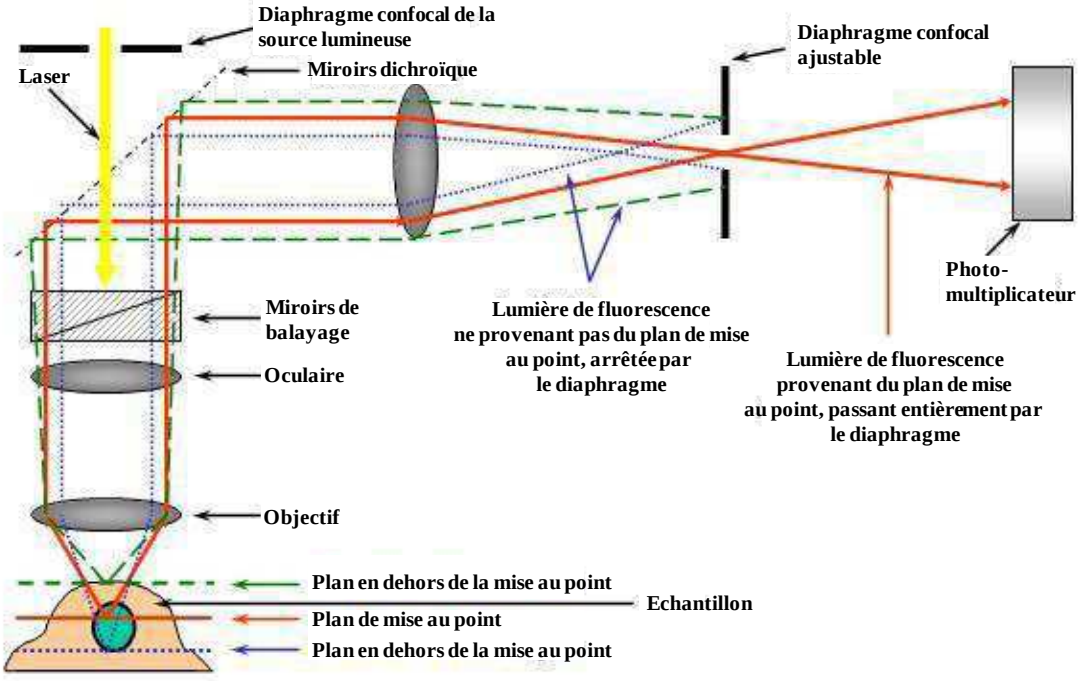


Figure 27 : *Principe de fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser.*

Dans le cadre de cette thèse, des émulsions ont pu être observées grâce au MCBL. Ces observations ont été réalisées à l'IFR141-ITFM : Plate-Forme Imagerie Cellulaire en collaboration avec Valérie Nicolas. Le microscope utilisé était un CLSM 510 (Zeiss, Germany) équipé d'un objectif à immersion (huile) 63 x Plan Apochromat (Ouverture Numérique : 1,40). La résolution était de 200 nm dans le plan focal (X, Y) et de 500 nm en Z lors d'un parcours axial (profondeur).

Deux marqueurs fluorescents ont été utilisés : la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et la rhodamine B isothyocyanate (RITC). Le premier pour le marquage de la protéine et le second pour le marquage des deux polysaccharides. Le détail de la procédure de marquage et les longueurs d'ondes d'excitation/détection peut être trouvé dans l'article présenté en section III de ce chapitre. Les Figures 28 et 29 montrent respectivement les formules des marqueurs fluorescents et les réactions de marquage mises en jeu.

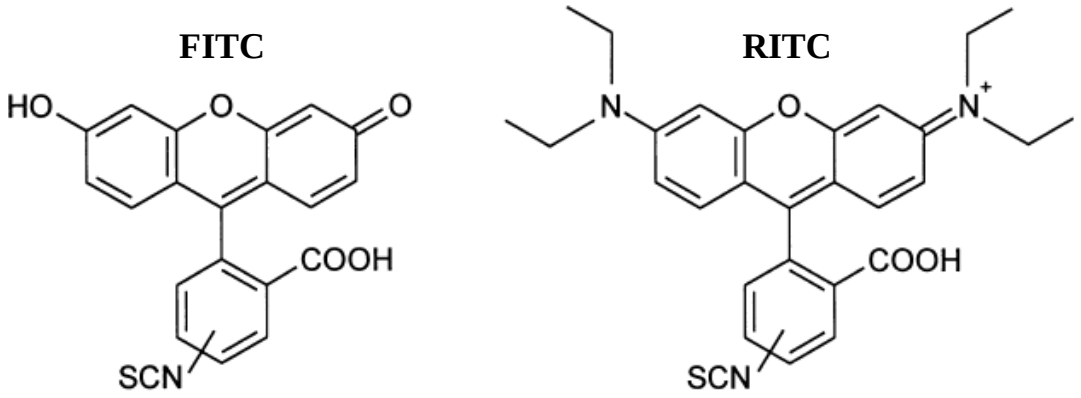
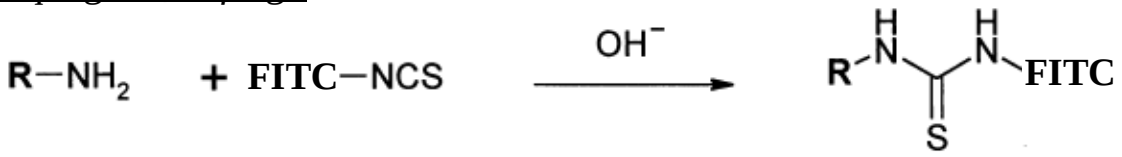


Figure 28 : *Structure moléculaire de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et de la rhodamine B isothiocyanate (RITC) (Lamprecht et al., 2000).*

Marquage de la β-lg :



Marquage de la GA et de la GX :

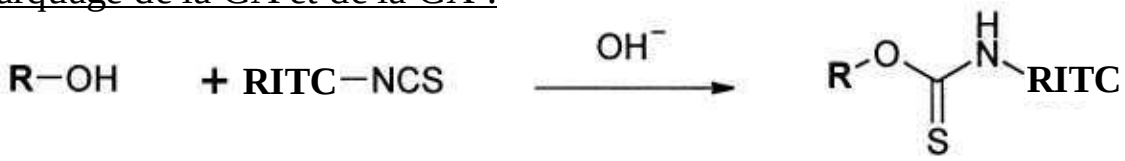


Figure 29 : *Schémas des réactions lors des procédures de marquage des différents biopolymères avec les deux marqueurs fluorescents. FITC : Fluorescéine isothiocyanate, RITC : Rhodamine B isothiocyanate.*

III. Etude de la stabilité d'émulsions huile-dans-eau formulées à l'aide de β-lactoglobuline, de gomme arabique et/ou de gomme xanthane.

PUBLICATION 3:

β-lactoglobulin, gum arabic, and xanthan gum for emulsifying sweet almond oil: formulation and stabilization mechanisms.

Eléonore Bouyer[1,2], Ghozlene Mekhloufi[1,2,†], Valérie Nicolas[1,3], Jean-Louis Grossiord[1,2], Véronique Rosilio[1,2], Florence Agnely[1,2]

Article de prochainement soumis à *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*

[1] Univ Paris Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France.
[2] CNRS, UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France.
[3] IFR141-ITFM Plate-Forme Imagerie Cellulaire, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France.
[†] Corresponding author: CNRS, UMR 8612, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296, Châtenay-Malabry Cedex, France. Tel.: +33 1 46 83 59 91; fax: +33 1 46 83 58 82. E-mail address: ghozlene.mekhloufi@u-psud.fr.

Abbreviations: β-lg, β-lactoglobulin; **GA**, gum arabic; **XG**, xanthan gum ; **AG**, arabinogalactan; **GP**, glycoprotein; **AGP**, arabinogalactan-protein; **WPM**, Wilhelmy plate method; **FITC**, Fluorescein isothiocyanate; **RITC**, Rhodamine B isothiocyanate; **DMSO**, Dimethyl Sulfoxide.

Abstract

Emulsions are thermodynamically unstable systems that are generally stabilized by small surfactant molecules. However, it is possible to replace them by natural emulsifiers such as proteins and polysaccharides to answer sustainable development concerns. This article deals with oil-in-water emulsions stabilized by natural biopolymers and is divided in two parts. The first one was aimed at studying the stability of emulsions stabilized by various combinations of β-lactoglobulin (β-lg), gum arabic (GA) and xanthan gum (XG) at 1 or 2.5 (w/w) % total biopolymer concentrations over a 6-month period. Zeta potential and granulometric measurements in combination with Turbiscan and optical microscopy observations were carried out to study emulsion stability. The obtained stabilities were in the order GA < β-lg:GA < β-lg < XG = β-lg:XG stabilized emulsions. The second part of this study focused on the determination of the stabilization mechanisms induced by these biopolymers, by combining interfacial tension and rheological measurements, and confocal microscopy observations. Five stabilization mechanisms were highlighted: β-lg interfacial adsorption, GA interfacial adsorption, XG thickening of the continuous phase, βlg:GA interfacial bi-layer formation, and for β-lg:XG stabilized emulsion a combination of protein interfacial adsorption and thickening of the aqueous phase by XG.

Keywords: β-lactoglobulin; Confocal microscopy; Emulsion; Gum arabic; Interfacial tension; Multilayer stabilization; Protein:polysaccharide complexes; Stability; Xanthan gum.

1. Introduction

In recent years, pharmaceutical and cosmetic industries have shown increasing interest regarding the use of "clean labelled" ingredients and sustainable development [1, 2]. Biopolymers are currently used in the food industry as texturizing and stabilizing agents [3-6], and could replace synthetic surfactants in the formulation of pharmaceutical emulsions. Indeed, proteins generally act as the main stabilizers and polysaccharides contribute through their thickening and steric stabilizing properties [7]. Most polysaccharides form an extended network in the continuous phase that enhances its viscosity [8] or even forms a gel [9, 10], enabling to slow down droplets movements and encounters. However, some polysaccharides are also able to adsorb at droplets interface by their hydrophobic residues, decrease the interfacial tension and form a steric barrier against coalescence [11]. The association of the properties of proteins and polysaccharides under appropriate conditions (concentrations, protein-to-polysaccharide ratio, pH, ionic strength, temperature) has been increasingly studied to improve emulsion stability [12-15]. Two biopolymers can either form an electrostatic complex or not. In the former case, the protein first adsorbs at the interface and the polysaccharide forms an interfacial complex with the protein through attractive electrostatic interactions. It is then possible to form multi-layered "membranes" around oil droplets by adsorbing alternative layers of oppositely charged biopolymers [15]. The formation of a protein:polysaccharide complex has been reported to provide enhanced thermal stability and resistance to external treatments to emulsions (*i.e.* thermal processing, chilling and freezing) [15-17]. In the latter case (without electrostatic-based complexation), the protein adsorbs at the interface, whereas the polysaccharide generally plays the role of viscosity enhancer of the continuous phase.

In the present study, three biopolymers have been chosen to stabilize oil-in-water emulsions: β-lactoglobulin (β-lg), the major whey protein, gum arabic (GA), an exudate from *Acacia* trees, and xanthan gum (XG), produced by the bacterium *Xanthomonas campestris*.

β-lg is a globular protein that contains 162 amino acid residues, one thiol group and two disulphide bonds. Several genetic variants exist such as variant A (Gln59, Asp64, Val118) and variant B (Gln59, Gly64, Ala118) which are the most abundant ones [18]. The molar mass of a monomer is

18.3 x 10^3 g/mol and the isoelectric point (p*I*) is about 5.2. At pH below this p*I*, the protein displays a global positive charge and at pH values above it, the protein is negatively charged. β-lg is currently used with success in food emulsions [19, 20]. When it adsorbs at the oil-water interface, it reorganizes its structure and partially unfolds in order to expose its hydrophobic residues toward the lipophilic phase [21, 22].

GA is a hetero-polysaccharide containing both protein and polysaccharide residues. It consists of three fractions: arabinogalactan (AG) (80-90 wt % of the total gum), glycoprotein (GP) (2-4 wt % of the total gum), and arabinogalactan-protein complex (AGP) (10-20 wt % of the total gum) [23]. The glucuronic acid residues in its chemical structure confer a net negative charge to the gum above pH 2.0. Molar mass of GA varies from 3.0 x 10^5 to 5.8 x 10^5 g/mol depending on its origin and age [24]. The AGP fraction has been considered to be responsible for the emulsifying properties of the gum [25-28]. Polysaccharidic blocks are distributed along the peptidic chain allowing a so-called "wattle blossom" –type structure that confers the amphiphilic character to the gum and allows its adsorption at the oil-water or air-water interfaces [24, 29]. Indeed, the protein components in GA would embed in the oil phase while the carbohydrate ones would extend into water [27, 30].

XG is an anionic polysaccharide, which molar mass varies from 1.5 x 10^6 to 5 x 10^6 g/mol depending on the fermentation conditions, as well as the content of acetate and pyruvate residues, influencing solution viscosity [31]. The stiff polymer chain may exist as a single, double or triple helix that interacts with another molecule to form a complex, loosely bound network in solution [32, 33]. This particular structure gives the gum its unusual rheological characteristics in solutions: high low-shear viscosity and strong shear-thinning character that allow its use as emulsion stabilizer [34].

In a recent study [35], our group has shown the possibility to formulate β-lg, GA, and β-lg:GA stabilized emulsions. The best stability was obtained with β-lg at the concentration of 2.5 (w/w) %, over a 20 day-period. Interfacial measurements revealed that the protein adsorbed at the oil-water interface and that GA electrostatically bound to it, thus forming a second layer around the globules. In the continuity of this work, the present study aimed to evaluate the long term stability of these systems

and to compare it to the one obtained with another protein:polysaccharide combination (β-lg:XG). In the first part of this article, several emulsions were formulated and a 6-month stability study was conducted. The formulated emulsions were stabilized by β-lg (1 and 2.5 %), GA (1 and 2.5 %), β-lg:GA (2:1 ratio at 1 and 2.5 %), XG (1 %), and β-lg:XG (1:1 ratio at 1 %). The concentrations are expressed as total biopolymer concentration in weight. β-lg and GA were associated at pH 4.2 in order to allow attractive electrostatic interactions and thus the formation of a complex [36, 37]. Some studies have shown that the 2:1 β-lg:GA ratio at pH 4.2 induced a maximum interactions between the two biopolymers [36, 37]. Conversly, β-lg and XG were mixed at pH 7, where both biopolymers displayed an anionic charge, in order to avoid formation of a complex and ensure that XG would only act as a thickener in the continuous phase. The 1:1 β-lg:XG ratio was chosen as it was the simplest one. In the second part of this article, we focused on emulsion stabilization mechanisms by these biopolymers so as to evaluate their influence on emulsion stability.

2. Materials and methods

2.1. Materials

β-lg (batch JE 002-8-992) was supplied by Davisco Foods International, Inc. (USA). The powder composition was 89.8 (w/w) % protein, 8.8 (w/w) % moisture, and 1.4 (w/w) % ash [39]. GA (INSTANTGUM AA) was a gift from CNI Company (Rouen, France). Its composition contained 10 (w/w) % moisture, and 4 (w/w) % ash with a molar mass of about 350,000 g/mol as reported by the supplier. The protein content was 2.5 (w/w) % as determined by Kjeldahl analysis (N x 6.66). XG (Satiaxane^{TM} CX 910, lot 20060134) was generously given by Degussa (Paris, France). As reported by the supplier, the powder contained 7 (w/w) % protein, 11 (w/w) % moisture, and 9 (w/w) % ash. Sweet almond oil (batch 07120145\A) was provided by Cooper (Melun, France) and sodium azide (batch K305.2) by Roth (Lauterbourg, France). Sodium hydroxide, hydrochloric acid, and citric acid were analytical grades from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Water used in all experiments was purified using a Millipore Synergy 185 apparatus coupled to a RiOs5^{TM}, with a resistivity of 18.2 MΩ.cm. Fluorescein isothiocyanate (FITC, M = 389.38 g/mol, Fluka-46950), the protein dye,

Rhodamine B isothiocyanate (RITC, M = 536.08 g/mol, Sigma-R1755), the polysaccharide one, and dimethyl sulfoxide (DMSO) (D8418) were provided by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

2.2. Preparation of biopolymer solutions

Biopolymer solutions were prepared at total final concentrations of 1 and 2.5 (w/w) % for β-lg and GA, and of 0.1 and 1 (w/w) % for XG. The powders were dissolved in MilliQ water under gentle stirring at 20 ± 1 °C for at least 2 h. XG solutions were heated to 60 °C after dispersion in order to allow the solubilisation of the gum. All the biopolymer solutions were then allowed to hydrate overnight at 4 ± 1 °C. Sodium azide (0.05 (w/w) %) was added to the biopolymer solutions as an antimicrobial agent. The pH of β-lg solutions was adjusted to 4.8 (lowest β-lg solubility pH [36]) using 0.1 or 1 N HCl solutions. β-lg solutions were then centrifuged at 10,000 g, 20 ± 1 °C for 30 min to remove insoluble particles and β-lg aggregates. This step induced a 10 % loss of β-lg [36] that was taken into account when preparing the protein solutions. The final pH of β-lg solutions was then adjusted to either 4.2 or 7.0 using 0.1 or 1 N HCl solutions or 1 N NaOH solution. The pHs of GA and XG solutions were adjusted to 4.2 and 7.0, respectively.

2.3. Oil-in-water emulsion preparation

Emulsions were prepared by homogenizing 30 (w/w) % sweet almond oil with aqueous biopolymer solutions. Five different emulsifier compositions were studied: β-lg, GA, β-lg:GA, XG, and β-lg:XG. The total biopolymer concentration was first set to 1 % and when emulsions were not stable, it was increased to 2.5 %.

β-lg and GA stabilized emulsions were formulated by adding the oil to the biopolymer solution in a rotor-stator homogenizer (Polytron PT-MR 3100, Kinematica AG, Bioblock Scientific) for 2 min at 15,000 rpm. Emulsions were then passed through a two-stage high-pressure valve homogenizer (APV Invensys) for 5 min and with two successive pressure steps, 500 and 50 bars.

Mixed β-lg:GA stabilized emulsions were formulated by adding a GA solution to a previously formed β-lg stabilized emulsion at pH 4.2, by simple hand reversal shaking to minimize system destructuring. They were formulated at a protein:polysaccharide ratio of 2:1.

The formulation of XG emulsions consisted in heating the oily phases and the aqueous XG solutions to 50 °C in order to decrease their viscosities. The oil phases were then added to the continuous phases using a Turbotest Rayneri paddle and left for 45 min at 2,600 tr/min. XG stabilized emulsions were finally passed in a rotor-stator homogenizer (Polytron PT-MR 3100, Kinematica AG, Bioblock Scientific) for 5 min at 15,000 rpm.

β-lg:XG stabilized emulsions were formulated with the same protocol as XG stabilized emulsions, with the difference that the oily phases were first dispersed into the β-lg solutions. XG solutions were then added to these β-lg stabilized emulsions using a Turbotest Rayneri paddle for 2 min at 1,000 tr/min. They were formulated with a 1:1 β-lg:XG ratio.

It is important to note that the formulation protocols were not identical for all the emulsions. We first tried to formulate all the emulsions without using any high-pressure valve homogenizer to have the lowest possible energy expense in the formulation process. However, β-lg, GA and β-lg:GA stabilized emulsions phase separated immediately probably due to the large sizes of the formed droplets and the low viscosities of the continuous phases (results not shown). These results explain the use of a high-pressure valve homogenizer to prepare β-lg, GA, and β-lg:GA stabilized emulsions, and thus the differences in the formulation protocols when using XG. All these emulsions were formulated to study their stability over a 6-month period. Emulsions prepared for confocal microscopy observations were at 1 % total biopolymer concentration in order to minimize biopolymer excess in the aqueous phase and achieve clearer observations.

2.4. Assessment of emulsion stability

Emulsions were characterized only when stable for at least 24 h. All measurements were performed on the first day of stability and regularly over a 6-month period (except for zeta potential measurements) if

no phase separation was visually noticed. During this period, emulsions were stored at room temperature and away from light.

2.4.1. Turbiscan measurements

The stability of emulsions was evaluated using a Turbiscan Classic MA 2000 (Formulaction®, L'Union, France). The apparatus is composed of a reading head consisting of a pulsed near infrared light source (λ = 850 nm) and two synchronous detectors that scan the entire length of an emulsion filled tube. The transmission detector measures the light flux transmitted (at the angle of 0 °) through the emulsion, and the backscattering detector receives the light backscattered (at 135 °) by the emulsion. Retrodiffusion and transmission intensities *versus* sample height and time are obtained, thus allowing detection of flocculation and coalescence processes even at an early stage (invisible to the eye) [38, 39].

2.4.2. Zeta potential measurements

ζ-potential measurements were performed thanks to the Zetasizer Nano ZS 90. Emulsions were diluted to 1/50 with MilliQ water prior to analysis. The measurements were conducted in triplicate on the first day of stability. Results are mean ζ-potential values of oil droplets.

2.4.3. Droplet size determinations

Emulsions droplet size was measured by laser diffraction. The mean volume diameter, d_{43}, of emulsions droplet was determined using a laser granulometer Mastersizer S (Malvern Instruments, England). The laser wave length was 632.8 nm. To avoid multiple scattering, the samples were diluted in MilliQ water. Measurements were performed at a 13 % obscuration. Results are the mean of triplicates.

Emulsions were also observed with an Olympus BX60 optical microscope linked to a CCD video camera controlled by an image processor (Pinnacle Studio 12). Pictures were taken at x 40 magnification. These observations allowed the complementary determination of emulsion droplet sizes.

2.5. Evaluation of the stabilization mechanisms

2.5.1. Interfacial tension measurements

Biopolymer solutions were analysed by the Wilhelmy plate method to measure the evolution of the interfacial tension with time. An automatic thermostated digital tensiometer (Krüss K10T, Hamburg, Germany) was used as previously described [40, 41]. The Wilhelmy plate caught at the air-water interface was progressively and carefully covered with oil, and the interfacial tension was continuously recorded over 24 h at 25 ± 1 °C. The reported surface tension values are mean values of at least three measurements. The experimental uncertainty was estimated to be 0.2 mN/m. All glassware in contact with the biopolymers solutions was properly cleaned with a hot TFD4 solution (Franklab) and rinsed with MilliQ water.

2.5.2. Rheological measurements

The rheological behaviour of β-lg and GA solutions at 2.5 % was studied at 25.00 ± 0.01 °C by means of a controlled rate (CR) rheometer (Roto Visco 1 Thermo Electron Corporation, Haake) equipped with a Z 41 coaxial cylinder geometry (with a height of 55.000 mm, a bottom gap of 3.000 mm and a side gap of 1.980 mm) because of the low biopolymer solution viscosity. In each experimental run, the shear rate was varied from 0 to 400 s^{-1} over 180 s. The rheological behaviour of emulsions and XG solution at 1 % was studied at 25.00 ± 0.01 °C with a controlled stress (CS) rheometer (Rheo Stress 600, Thermo Electron Corporation, Haake) equipped with a stainless cone-plate sensor C60/1 ° (with a diameter of 60 mm, a cone angle of 1 ° and a gap of 0.052 mm). A thermostatic Universal Temperature Control (UTC) was used to maintain the plate temperature. A solvent trap was added to prevent water evaporation during measurements. In each experimental run, the shear stress was varied from 0 to 1 Pa over 180 s, except for emulsions containing XG (0 to 10 Pa) because of their higher viscosities. Measurements were performed on the first day of emulsion stability and are expressed as the mean of at least two measurements.

2.5.3. Biopolymer labelling and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

For some emulsions, and in order to observe the biopolymer localization in the emulsions (at the interface or in the bulk), two fluorescent dyes were used for the labelling of protein and polysaccharides. The labelling protocol was based on a method used by Schmitt *et al.* [42] that assumes covalent labelling of the fluorescence dyes to the biopolymer molecules without fluorescent dyes excess. The pH of the 1 (w/w) % β-lg solution was adjusted to 8.5. Then, 25 µL of a 2 wt % FITC dispersion in DMSO was added to 100 mL protein solution. The cross-linking reaction lasted 1 h 30. The two polysaccharides were labelled with RITC by following the same procedure but at a higher pH (10.5). Biopolymer stabilized emulsions were immediately formulated using these labelled solutions, and then observed. The microstructure of the emulsions was imaged using CLSM 510 (Zeiss, Germany), coupled to LSM 510 acquisition software (Zeiss, Germany). All images were acquired with air-cooled argon and helium neon lasers at 488 nm (FITC) and 543 nm (RITC), respectively, and using a Plan Apochromat 63 x objective (NA 1.40, oil immersion). Fluorescence emission was collected with the use of filters, either band pass of 505 – 550 nm for FITC (green fluorescence) or long-pass starting at 560 nm for RITC (red fluorescence).

3. Results and discussion

3.1. Assessment of emulsion stability

3.1.1. Turbiscan measurements

Turbiscan measurements gave the time evolution over a 6-month period of the retrodiffusion intensity of emulsions along tubes height. Figure 1 shows the results for β-lg 2.5 (w/w) % stabilized emulsions. From this figure, it is clear that the emulsion phase separates at one point. Indeed, the retrodiffusion intensity of the bottom of the tube (between 0 and 20 mm) starts decreasing with time after about 20 days, indicating a clarification process and thus the beginning of creaming. It is worth noticing that this creaming was not visible with the naked eye before about 5 months. A similar profile was obtained for β-lg 1 (w/w) % stabilized emulsion (results not shown).

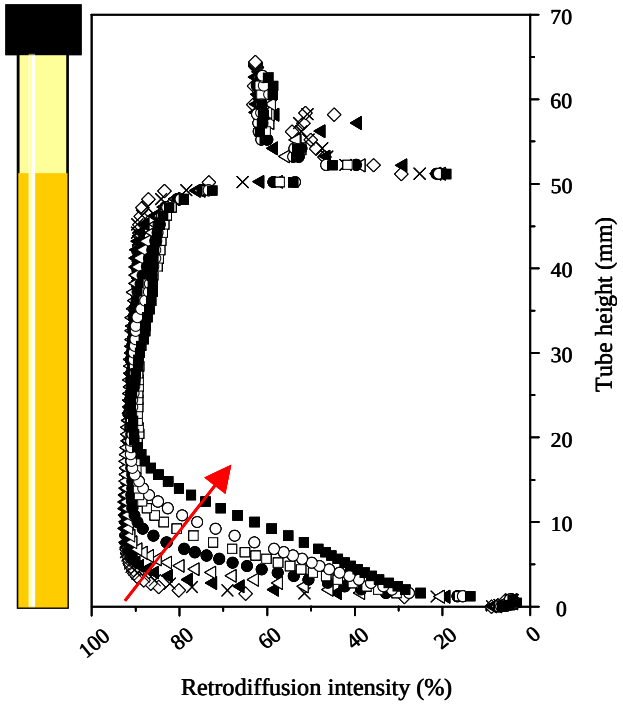


Figure 1: Time evolution of retrodiffusion intensity along tube's height for β-lg 2.5 (w/w) % stabilized emulsion. d: day after emulsion formulation. ◇ d1, x d15, ▲ d30, △ d60, ● d90, □ d120, ○ d150, ■ d180.

Whereas GA and β-lg:GA stabilized emulsions phase separated within 3 days, XG and β-lg:XG ones maintained their initial retrodiffusion intensity for 6 months. This evolution indicates that they all remained stable over this period of time, at least. Figure 2 illustrates a typical retrodiffusion graph for XG emulsion at 1 % concentration.

The small variation observed at the top of the sample is due to evaporation: the fill-in level slightly decreased in the 6-month time.

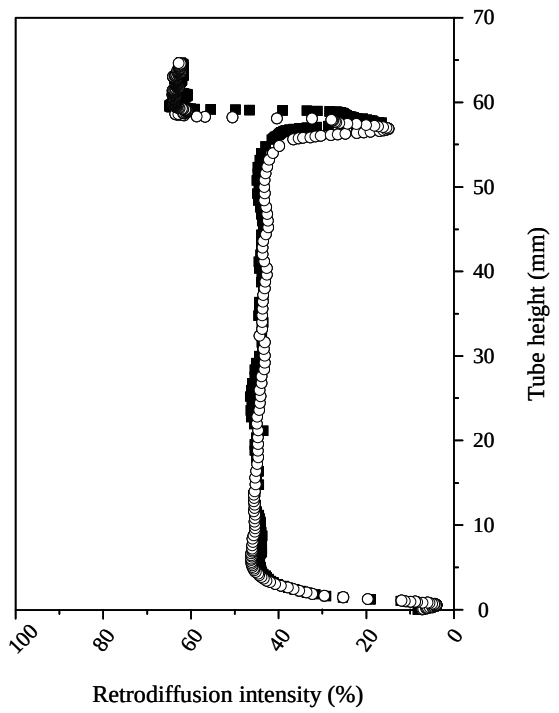


Figure 2: Time evolution of the retrodiffusion intensity along tube's height for XG 1 (w/w) % emulsion. ■ d1, ○ d 180.

The maximum percentage of retrodiffusion intensity is directly dependent on the oil fraction, the refractive index and the size of the globules. In all the studied systems, the oil fraction as well as the refractive index did not vary. It is thus possible to link the retrodiffusion intensity differences between samples to their droplet sizes. The more intense the retrodiffusion is, the smaller the droplet size. Figure 3 shows the retrodiffusion intensities for each emulsion on the first day of the stability study period. The initial values were in the order XG < β-lg:XG < GA 2.5% < GA 1 % < β-lg:GA < β-lg. The droplet sizes were thus in the reverse order: β-lg < β-lg:GA < GA 1 % < GA 2.5 % < β-lg:XG < XG. Whereas no difference can be seen between the two β-lg concentrations, GA stabilized emulsions seem to have smaller droplets at 1 % than at 2.5 %. However, these results are qualitative, and must be confirmed by d_{43} measurements.

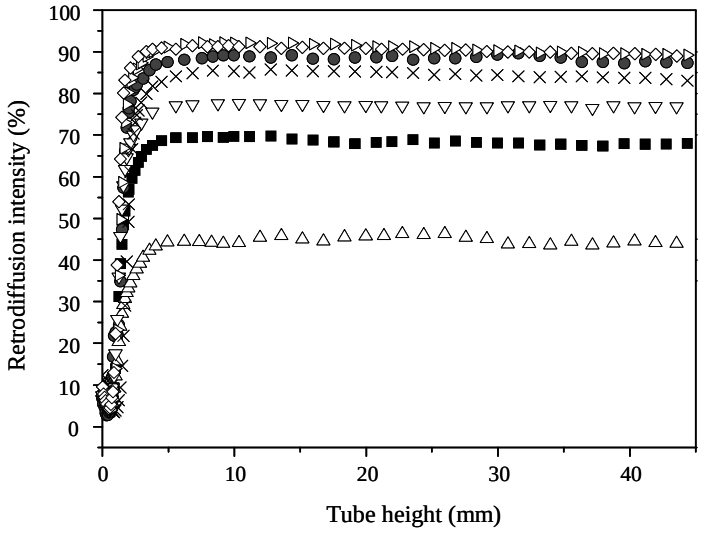


Figure 3: Retrodiffusion intensities of the different emulsions on the first day of stability when stabilized with: ◇ β-lg 1 %, ▷ β-lg 2.5 %, ● β-lg:GA 2.5 %, x GA 1 %, ▽ GA 2.5 %, ■ β-lg:XG 1 %, △ XG 1 %.

3.1.2. Emulsion characterization on the first day of the stability period.

The main results obtained for the different emulsions after one day following their preparation are gathered in Table I.

Table I: Main stability parameters obtained for emulsions at day-1.

Stabilizing biopolymer	β-lg		GA		XG	β-lg:GA		β-lg:XG
Ratio						2:1		1:1
Concentration (w/w %)	1	2.5	1	2.5	1	1	2.5	1
pH	4.2	4.2	4.2	4.2	7	4.2	4.2	7
ζ (mV)	nd	+ 17	- 21	- 16	- 75	nd	nd	- 60
d_{43} (µm)	1	2	7	10	37	6	7	18
Full stability period (days)	~ 20	~ 20	1	2	> 180	2	3	> 180

nd: not determined.

ζ-potential measurements performed on β-lg (1 %) and β-lg:GA stabilized emulsions did not meet the quality criteria required to obtain non dubious values. However, ζ-potential should be positive for the former as the protein was positively charged at pH 4.2 [35], and as it was confirmed from the positive value (+17 mV) for β-lg (2,5 %) stabilized emulsion (Table I). Conversely, if GA covered the outer surface of the droplets, ζ-potential was certainly negative for the β-lg:GA stabilized emulsions as it was

negative for GA solutions [35] and GA stabilized emulsions at pH 4,2. It is worth noticing that indeed, the combination of β-lg and GA in aqueous solution, even at protein:polysaccharide ratio of 2:1, gave a negative ζ-potential value indicating the main contribution of the gum to this parameter in the mixed dispersion [35, 36]. GA and β-lg:GA stabilized emulsions phase separated within 3 days and were thus not further investigated. For XG and β-lg:XG stabilized emulsions, the ζ-potential values were negative, according to the negative charge of both biopolymers at pH 7. However, the value obtained for the latter was less negative than for the former. Since the concentration of 1 % corresponds to the total biopolymer concentration, there was less gum in the β-lg:XG system than in the XG stabilized one. No measurement could be performed on the β-lg stabilized emulsion at pH 7, which was prepared without high-pressure homogenizing and thus phase separated within an hour. However, the ζ-potential value of this emulsion was supposed to be negative as the protein bore a net negative charge at pH 7.

From the ζ-potential measurements, first assumptions on most stable systems could be emitted: XG and β-lg:XG stabilized emulsions should be the most stable systems with regards to their high ζ-potential values. Indeed, they remained stable over 180 days.

d_{43} measurements performed on the first day of stability indicated that the protein was able to form and stabilize very small droplets (~ 2 µm). For both β-lg concentrations, d_{43} values were of the same order of magnitude, probably because the interface was already saturated at 1 % [35]. Adding GA to these emulsions enhanced the diameter of the droplets to 6 or 7 µm, but without giving a better stability. GA stabilized emulsions had d_{43} values of 7 and 10 µm. No significant influence of the concentration could be observed. XG stabilized emulsions had a d_{43} value of 37 µm. β-lg:XG stabilized ones had smaller size probably due to the first emulsification with β-lg. Note that even though β-lg stabilized emulsions were not stable when formulated without using any high pressure homogenizer (probably due to the formation of large droplets), the addition of XG just after their formation led to stable emulsions with smaller droplets than XG stabilized ones. It is worth noticing that results obtained with the Turbiscan gave the same droplet size classification: β-lg < β-lg:GA < GA < β-lg:XG < XG. This classification is however not related to the obtained stabilities, as β-lg:GA and GA stabilized emulsions had smaller droplets than XG stabilized ones but were less stable. A small droplet size is thus not always a

guarantee of stability and other parameters should be checked such as the rheology, the probable occurrence of flocculation, *etc*.

3.1.3. Microscopic observations

The main microscopic observations of the emulsions can be found in Figure 4. They confirmed that the droplet size did not increase over the 6 month time lapse for the most stable emulsions (β-lg at 2.5 (w/w) %, XG and β-lg:XG (ratio 1:1) both at 1 (w/w) % stabilized ones). Figures 4-1a and 1b show a typical β-lg 2.5 % stabilized emulsion with droplet sizes smaller than 5 µm, which is in agreement with the corresponding d_{43} mean value (~ 2 µm). Figure 4-2a shows a micrography of GA 1 % stabilized emulsion with droplet sizes of about 7 µm but with significant polydispersity. This value is also coherent with the obtained d_{43} value. Figures 4-3a and 3b show XG 1% stabilized emulsions with droplets ≥ 35 µm, alike the obtained d_{43} value. Figure 4-4a shows a typical migrography of β-lg:GA 2.5 % stabilized emulsion. Droplet sizes were not clearly visible, but seemed slightly larger than β-lg stabilized emulsions, in agreement with the corresponding d_{43} value. Finally, β-lg:XG stabilized emulsion (Figure 4-5) did not show any increase in size (~ 20 µm) with time. This value is coherent with the corresponding d_{43} value. The droplet size is then probably governed by the protein as XG stabilized emulsion had larger droplets.

3.1.4. Droplet size evolution

The evolution of the d_{43} values was examined for the most stable emulsions: β-lg at 2.5 (w/w) %, XG and β-lg:XG (ratio 1:1) both at 1 (w/w) % stabilized emulsions. Figure 5 presents the d_{43} values obtained for these emulsions over a 6-month period. The graph shows no tendency of the d_{43} values to increase except for XG stabilized emulsions However, this increase was not microscopically observed.. These results demonstrate the very good stability of these three emulsions. d_{43} values are in the order β-lg (2.5 %) < β-lg:XG (1 %) < XG (1 %). This order is coherent with the fact that β-lg, being very efficient in decreasing the interfacial tension, led to the formation of smaller droplets as compared to

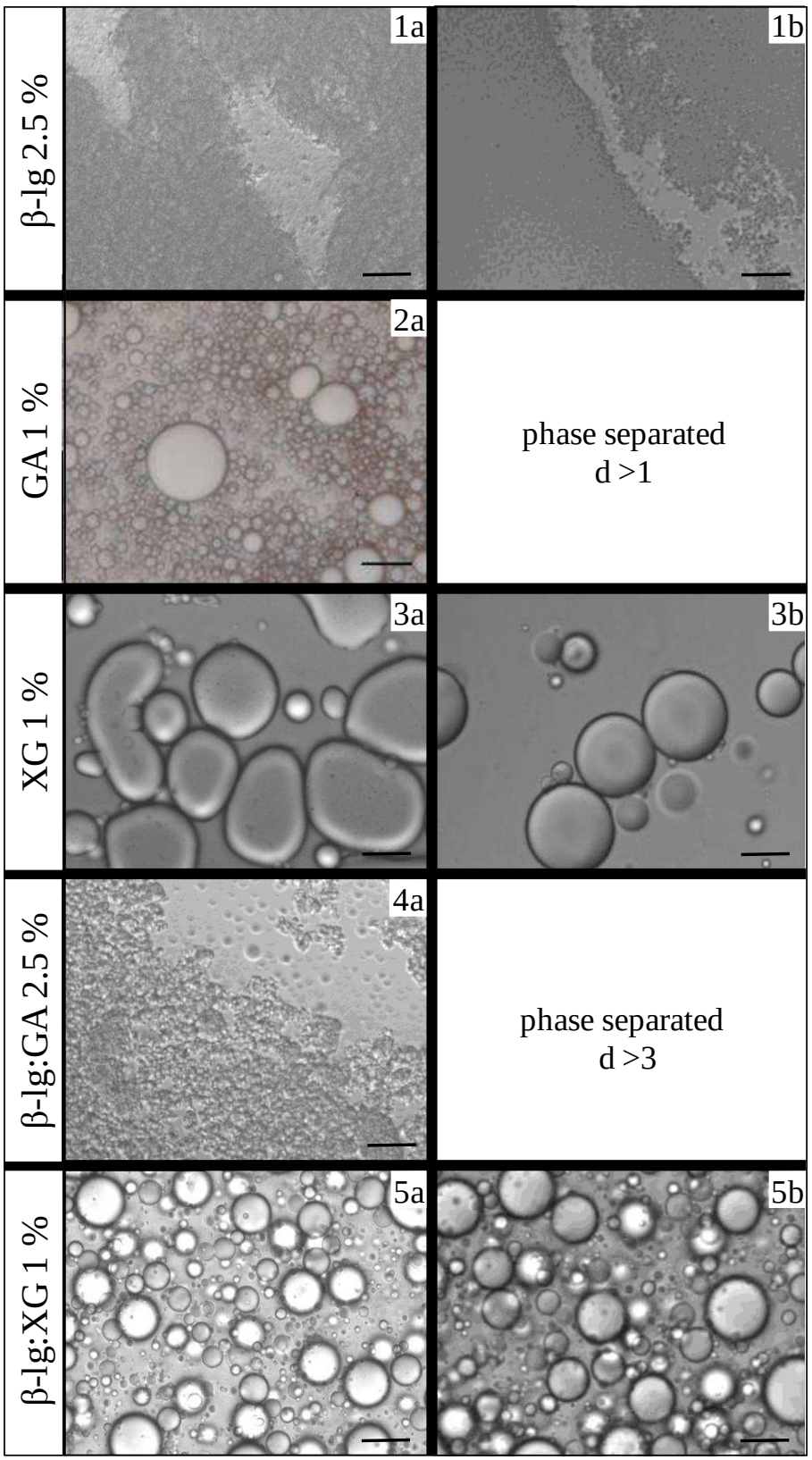


Figure 4: Micrographies of biopolymer stabilized emulsions (magnificence x 40). a: first day, and b: 6 months of stability, except for β-lg 2.5 (w/w) % (after 4 months). 1: β-lg 2.5 (w/w) %, 2a: GA 1 (w/w) %, 3: XG 1 (w/w) %, 4a: β-lg:GA (ratio 2:1) 2.5 (w/w) %, and 5: β-lg:XG (ratio 1:1) 1 (w/w) %. The scale bar corresponds to 20 µm; d: day.

β-lg:XG and XG stabilized emulsions. XG has not been reported to be surface active, which could explain why it produced larger droplets. In this latter case, the imposed shear during the formulation process play an important role in the decrease of droplet sizes. And it is important to note that the use of an homogenizer evidently decreased β-lg stabilized droplet sizes when comparing with the non homogenized β-lg:XG and XG stabilized ones. d_{43} values obtained for β-lg:XG stabilized emulsions were between β-lg and XG emulsions values, which seems logical. Despite the fact that they had the smallest droplet sizes, β-lg stabilized emulsions (2.5 %) started to phase separate after about 20 days, even if no change was observed in the corresponding d_{43} values over time.

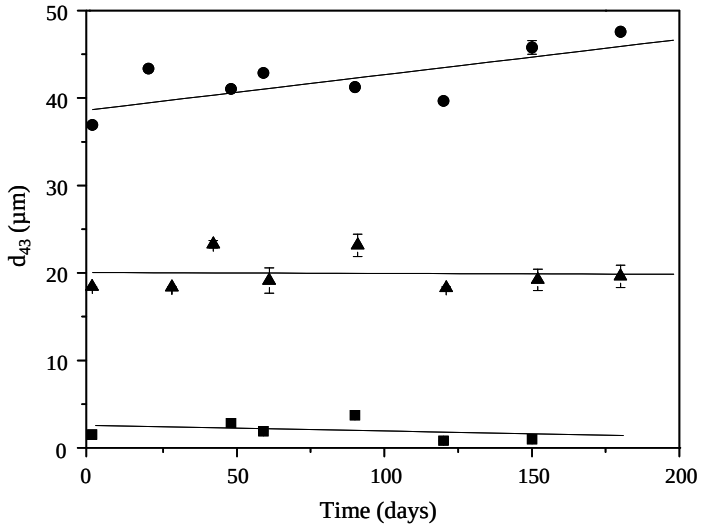


Figure 5: Evolution of the d_{43} values obtained for: ■ β-lg at 2.5 (w/w) %, ● XG and ▲ β-lg:XG (ratio 1:1) at 1 (w/w) % stabilized emulsions over a 6-month period.

3.2. Evaluation of the stabilization mechanism

3.2.1. Interfacial tension measurements

Interfacial tension measurements were performed to evaluate the surface properties of the different biopolymers. The concentration of XG solutions was lowered to 0.1 % to avoid any influence of viscosity on the measurements. Figure 6 represents the 24 h-interfacial tension evolutions of oil-water systems containing β-lg 2.5 %, GA 2.5 %, β-lg:GA 2.5 %, XG 0.1 %, or no biopolymer. It is very interesting to note that the pure oil-water interfacial tension decreased from 21 to 6 mN/m over the

24 h-period. This decrease can be explained by the presence of impurities or coexistence of various amphiphilic oil components. As indicated by the supplier, the natural sweet almond oil contains β-sitosterol, δ-5-avenasterol, oleic and linoleic acids. These components can lower the interfacial tension with different γ-time relationships. The effect of contaminants has already been reported by Wüstneck *et al*. for sunflower oil containing triglycerides, saturated and unsaturated fatty acids, all of them being interfacial active components [43]. The interaction of various components of the oil with the emulsifier could affect emulsion stability.

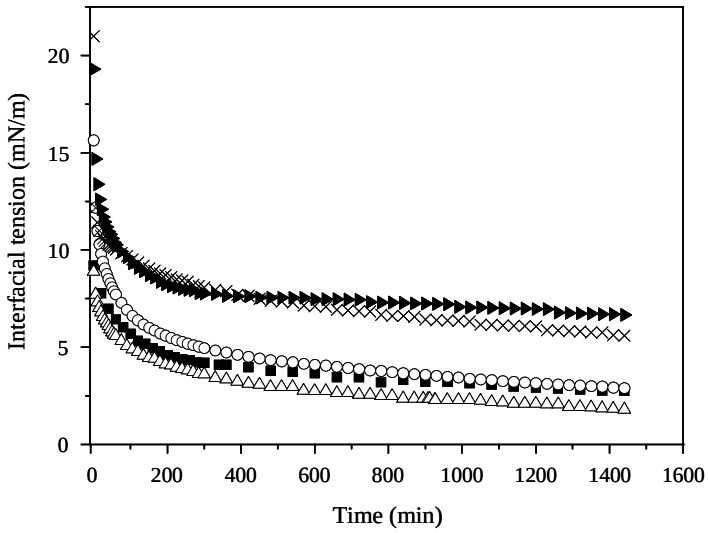


Figure 6: Time evolution of the interfacial tension for oil-aqueous solutions: ► XG 0.1 %, x water, ○ GA 2.5 %, ■ β-lg 2.5 %, and △ β-lg:GA 2.5 % solutions.

No significant difference could be observed on the interfacial tension when XG was present or absent in water, confirming that XG had no surface properties. β-lg, GA, and β-lg:GA solutions significantly decreased the interfacial tension. β-lg adsorbed and decreased it faster than GA. At initial time (t = 0 min), the interfacial tension values for β-lg and GA solutions were about 9 and 16 mN/m, respectively. However, after few hours, their interfacial activity appeared similar. GA needed more time than β-lg to adsorb at the interface [35]. β-lg:GA mixed solutions showed the best interfacial properties probably due to the formation of the protein:polysaccharide complex.

3.2.2. Rheological measurements

The different rheograms of biopolymer solutions and formulated emulsions are presented in Figure 7. β-lg and GA (2.5 %) solutions had a Newtonian behaviour with viscosities of about 2 mPa.s. β-lg and GA stabilized emulsions also displayed a Newtonian behaviour with viscosities of about 2 and 5 mPa.s, respectively. The presence of oil globules probably only induced a slight increase in GA emulsion viscosity. Conversely, β-lg:GA stabilized emulsion exhibited a slightly shear-thinning behaviour. The complexation of the protein and polysaccharide obviously led to new interfacial and rheological properties.

Both XG (1 %) solution and emulsion showed a shear-thinning behaviour with an apparent yield stress value of about 4 and 3 Pa, respectively. β-lg:XG emulsions also exhibited a shear-thinning behaviour (with an apparent yield stress of about 2 Pa) governed by the presence of XG, since β-lg stabilized emulsions had a Newtonian behaviour.

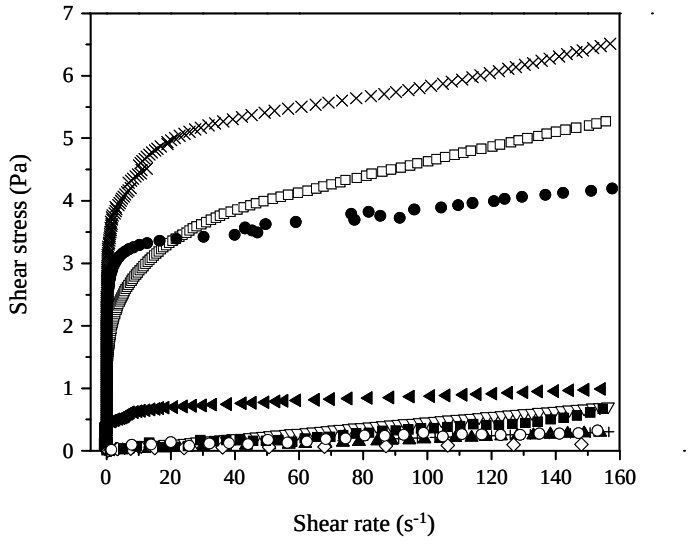


Figure 7: Rheograms of: x XG 1 % solutiuon, □ β-lg:XG 1 % emulsion, ● XG 1 % emulsion, ◄ β-lg:GA 2.5 % emulsion, ▽ GA 2.5 % emulsion, ■ GA 2.5 % solution, ○ β-lg 2.5 % solution, ▲ GA 1 % emulsion, + β-lg 1 % emulsion, and ◇ β-lg 2.5 % emulsion.

For a better understanding, Table II compares the viscosities of the different emulsions at a shear rate of 150 s^{-1}.

Table II: Viscosities (η) of the different solutions and emulsions at a shear rate of 150 s^{-1}.

	Solutions			Emulsions						
Biopolymers	β-lg	GA	XG	β-lg		GA		XG	β-lg:GA	β-lg:XG
Concentrations (w/w) %	2.5	2.5	1	1	2.5	1	2.5	1	2.5	1
η (mPa.s)	2	4	11	2	2	2	5	28	7	35

The viscosities for the various emulsions can be classified in the order: β-lg < GA < β-lg:GA < XG < β-lg:XG. These values explain the better stability of emulsions containing XG compared to β-lg alone, even if the droplets formed in the β-lg stabilized emulsions were smaller than those in XG stabilized ones. XG clearly enhanced the viscosity of the continuous phase of the emulsions and conferred to them a shear-thinning behaviour. The viscosity was thus rather high at low shear stress and decreased when the stress was increased. This behaviour has largely been reported in the literature for XG stabilized emulsions where it is used to prevent flocculation and creaming [44-48].

Some authors have estimated the minimal value of the yield stress (τ_0) of the weakly viscosified aqueous phase, required to stabilize droplets and prevent creaming in the emulsions, as reported in Equation 1 [48, 49].

$$\tau_0 \geq \frac{4}{3}\Delta\rho g R \qquad \text{Eq. 1}$$

with $\Delta\rho$ the density difference between the two phases, g the gravity acceleration, and R the mean radius of the droplets. Knowing the mean radius allows the determination of the necessary minimum yield stress value to obtain for stable emulsions. Applying this equation for XG, β-lg:XG, and β-lg:GA stabilized emulsions can allow us to predict the stability of these emulsions. If the obtained apparent yield stress is above the calculated one, emulsions can be considered as stable.

If we assume a density (ρ) of about 1 x 10^3 kg/m^3 for all the biopolymer solutions and of 0.9 x 10^3 kg/m^3 for the oil phase used in this work, $\triangle\rho \approx 100$ kg/m^3. The gravity acceleration is

considered as equal to 10 m/s^2 and the mean radius is calculated on the basis of the obtained d_{43} values. The following values were thus used: 18.5, 9, and 3.5 μm for XG, β-lg:XG, and β-lg:GA stabilized emulsions, respectively. The calculated minimum yield stress values were 25, 12, and 5 mPa, respectively. If one compares these values with those obtained experimentally: 3, 2, and 0.7 Pa, respectively, all the emulsions should be stable. However, β-lg:GA stabilized emulsion phase separated very quickly. An explanation could be that the condition needed to apply the previous equation - *i.e.* globules are considered as isolated spheres - is probably not respected. Some flocculation and coalescence probably occured thus modifying the mean radius.

3.2.3. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

β-lg stabilized emulsion at 1 % concentration is pictured in Figure 8a. In the micrograph, the protein appears in green and the oil droplets in black. It is clear that the labelled protein is largely in excess thus colouring the entire aqueous continuous phase. It is not really possible to conclude whether β-lg is localized at the interface or not. However, droplet size is very small and interfacial tension measurements have shown evidence of β-lg interfacial adsorption. Moreover, results published in [35] indicated that the interface was fully saturated at the concentration of 1 %. The result in Figure 8a is thus not surprising. Figure 8b shows a GA stabilized emulsion at 1 %. It confirms that the gum (in red) was able to adsorb at the oil-water interface. The aqueous phase is not coloured in red probably because the gum is not in excess or because it forms aggregates. β-lg:GA stabilized emulsions at 1% and 2:1 ratio can be visualized in Figure 8d. This picture shows red circles around oil globules, indicating that the GA was bound to the interface, probably through electrostatic interactions with the already adsorbed β-lg molecules. This is in agreement with the results obtained in our previous work [35]. XG stabilized emulsions are illustrated in Figure 8c. Red circles appear around oil globules accounting for the interfacial localization of this gum.

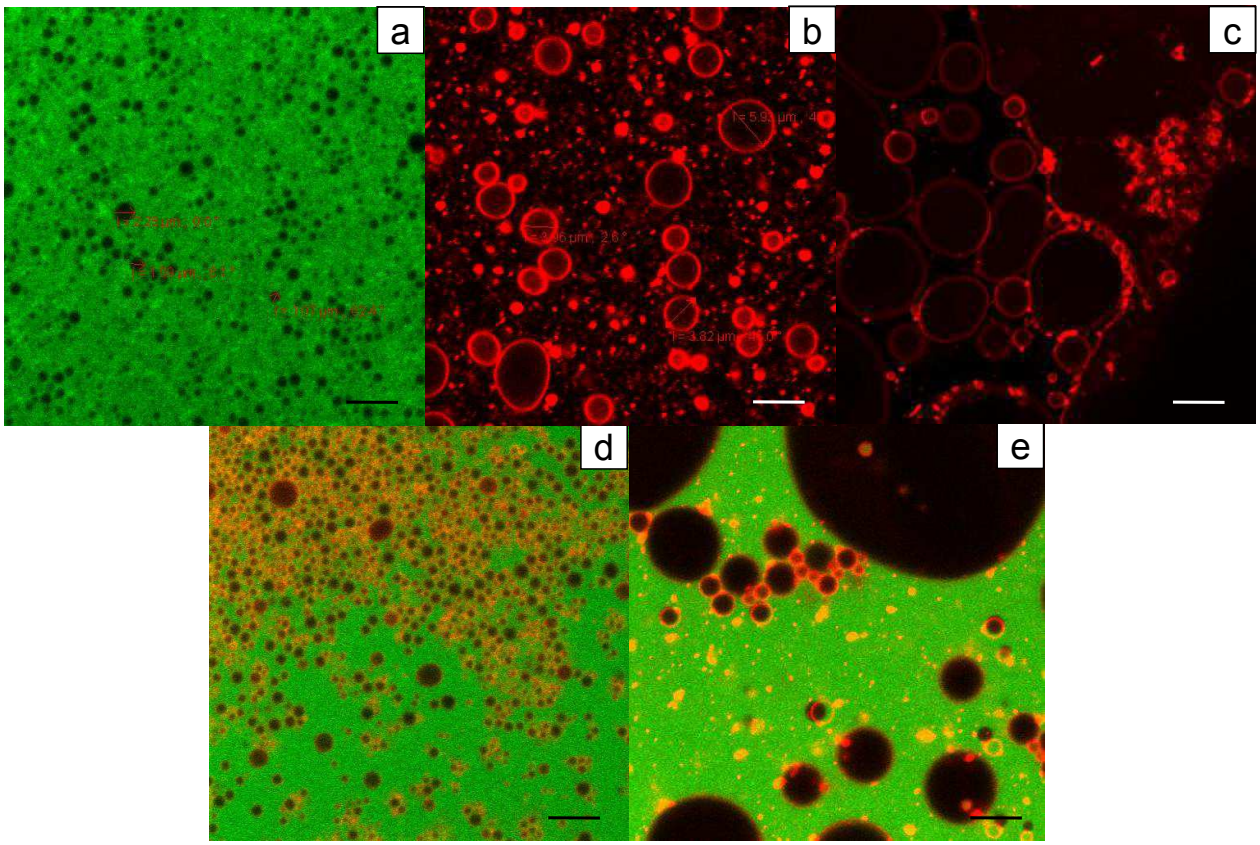


Figure 8: CLSM micrographs of stabilized emulsions by 1 % biopolymer total concentration (magnification x 100), 2 x zoom, (a): β-lg, (b): GA, (c): XG, (d): β-lg:GA ratio 2:1, and (e): β-lg:XG ratio 1:1. The scale bar corresponds to 6 µm.

However, interfacial tension measurements have shown that XG had no surface properties. An explanation of this unexpected adsorption could be that the labeling process of XG has changed the physicochemical properties of the gum and favored its adsorption. Kolodziejczyk *et al.*, for example, have reported that the fluorescein dye or high rhodamine concentrations (3.8×10^{-6} M) influenced β-lg interfacial film properties (*i.e.* thicker film) [50]. Figure 8e is particularly interesting because it shows a uniform green aqueous phase (β-lg), and XG (in red) around oil globules. XG adsorbed at the interface even if it had the same negative charge as β-lg. Two hypotheses can explain the interfacial localization of XG. The first one is the already mentioned change in surface properties of XG due to the labelling process. The second hypothesis is that the protein carries on its surface positive charge density areas named "patches", even if its global charge is negative [51]. XG could then complex with β-lg in these areas and adsorb at the oil-water interface. It has already been reported that two

biopolymers were able to form complexes despite their negative charge. Lutz *et al.* [2] for example, evidenced by confocal laser scanning microscopy that whey protein isolate and modified pectins were able to form an electrostatic complex even if they were both negatively charged at pH 6. However, these authors also studied this biopolymer association at pH 8 and showed that the negative charge of the protein was then too high to allow complexation. At pH = 7, β-lg is well above its p*I* and is highly negatively charged. The second hypothesis thus seems unlikely to occur.

Taking into account all the results obtained in this study, five stabilization mechanisms have been identified for biopolymer-stabilized emulsions (Figure 9). In β-lg stabilized emulsions (Figure 9a), the mechanism by which the protein stabilized the emulsions is well known. β-lg adsorbed at the oil-water interface, rearranged its structure in order to expose hydrophobic groups to the lipophilic phase [25, 26], and decreased the interfacial tension [35, 52]. Moreover, because the protein was positively charged at pH 4.2, electrostatic repulsions occurred between oil droplets thus contributing to the stabilization. It has also been reported that adsorbed β-lg films possess an elastic behaviour [35, 43]. Wüstneck *et al.*, performed interfacial dilational rheology measurements using the pendant drop method and showed that low protein concentrations led to an optimally packed β-lg molecules film [43]. On the contrary, at high concentrations, abundant lateral protein-protein interactions induced a more compact conformation of the protein at the interface. We made similar observations in our previous work [35], showing that 1 and 2.5 % concentrations were high compared to the protein concentration necessary for interfacial saturation (7×10^{-4} (w/w) %) [35]. In the emulsion studied in the present work, some β-lg molecules were free in the bulk aqueous phase. However, these emulsions started creaming after about 20 days as evidenced by Turbiscan measurements, probably because of non-optimal interfacial packing.

The second identified mechanism was for GA stabilized emulsions (Figure 9b). Interfacial measurements and CLSM observations confirmed that the gum was able to adsorb at the oil-water interface and decrease the interfacial tension.

The third stabilization mechanism obtained in this study (Figure 9c) was for XG emulsions. Interfacial tension measurements showed that XG had no surface activity. Emulsion stability can thus be attributed to the high viscosity and shear-thinning behaviour of the aqueous phase. The high viscosity at low shear rate prevents droplets from encountering each others and thus slows down flocculation and creaming mechanisms.

The fourth stabilization mechanism is that for β-lg:GA stabilized emulsions (Figure 9d). Confocal microscopy observations confirmed that GA was bound to the interface. Taking into account the results obtained in [35], it may be concluded that GA can form a second layer around oil droplets previously covered by β-lg thanks to attractive electrostatic interactions. This bi-layer stabilization mechanism is often reported to enhance emulsion stability compared to a biopolymer alone. However, in our case, β-lg:GA stabilized emulsions were less stable than β-lg stabilized emulsion probably due to droplets flocculation.

The fifth mechanism is that observed for β-lg:XG stabilized emulsions (Figure 9e). If β-lg molecules first adsorbed at the interface, the addition of XG enhanced emulsion stability from 20 days to more than 6 months by modifying the continuous phase rheology, without reducing the droplet size. It is a very interesting result as it shows the possibility to obtain biopolymer stabilized emulsions without adding any synthetic surfactant, nor using a high pressure homogenizer.

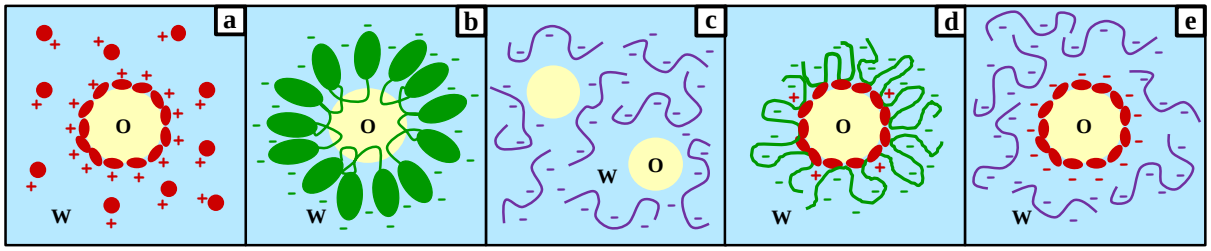


Figure 9: Schematic representation of the five obtained stabilization mechanisms with (a): β-lg pH 4.2, (b): GA pH 4.2, (c): XG pH 7, (d): β-lg:GA pH 4.2, and (e): β-lg:XG pH 7.

4 Conclusion

In this manuscript, we describe a stability study led for emulsions stabilized with β-lg, GA, XG, β-lg:GA, and β-lg:XG. GA and β-lg:GA stabilized emulsions were the less stable. β-lg stabilized emulsions were more stable but phase separated after about 20 days. Emulsions containing XG appeared the most stable because no phase separation occurred in the studied 6-month period. The stabilization mechanisms were deduced from interfacial tension and rheology measurements, and microscopic observations. XG showed no surface properties but contributed to the shear-thinning behaviour of emulsions. This particular behaviour could explain the longer stability of the emulsions stabilized by this gum, compared to β-lg and GA stabilized emulsions, which exhibited Newtonian behaviour. Confocal images confirmed the interfacial localization of GA in β-lg:GA stabilized emulsions, but also showed that labelled XG could adsorb at the oil-water interface.

Five different stabilization mechanisms were identified. The two first ones consist in the interfacial adsorption of either β-lg or GA. They differ by the kinetics of adsorption of the two emulsifiers. The lengthier adsorption of GA impairs emulsion stability. The third one is the modification of emulsion rheological properties (XG). The fourth mechanism consists in the formation of a double interfacial layer by interfacial adsorption of β-lg, then GA binding through attractive electrostatic interactions. Finally, the fifth mechanism is that of a β-lg adsorbed layer at the oil-water interface and free XG molecules in the aqueous phase modifying emulsion rheology. This work demonstrates the feasibility of biopolymer-stabilized emulsions formulation, with respect to sustainable development concern. These systems could be an alternative to pharmaceutical emulsions formulated with synthetic surfactant.

Acknowledgments

We thank Morgane Beigneux for her technical assistance in the experimental work.

References

[1] N. Garti, What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? Colloids Surf. A 152 (1999) 125-146.

[2] R. Lutz, A. Aserin, L. Wicker, N. Garti, Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate, Colloids Surf. B 72 (2009) 121-127.

[3] B.F. McNamee, E.D. O'Riordan, M. O'Sullivan, Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4551-4555.

[4] M.L. Jayme, D.E. Dunstan, M.L. Gee, Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions, Food Hydrocolloids 13 (1999) 459-465.

[5] S.R. Euston, S.R. Finnigan, R.L. Hirst, Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions, Food Hydrocolloids 14 (2000) 155-161.

[6] X. Huang, Y. Kakuda, W. Cui, Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity, Food Hydrocolloids 15 (2001) 533-542.

[7] E. Dickinson, Proteins at liquid interfaces, in: K.L. Mittal, Promod Kumar (Eds.), An introduction to food colloids, Oxford University Press, New York, 1992, pp. 140-173.

[8] E. Dickinson, Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers, Food Hydrocolloids 23 (2009) 1473-1482.

[9] J. Weiss, I. Scherze, G. Muschiolok, Polysaccharide gel with multiple emulsion, Food Hydrocolloids 19 (2005) 605-615.

[10] M. Benna-Zayani, N. Kbir-Ariguib, M. Trabelsi-Ayadi, J.-L. Grossiord, Stabilization of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels, Colloids Surf. A 316 (2008) 46-54.

[11] I. Capek, Degradation of kinetically-stable o/w emulsions, Adv. Colloid Interface Sci. 107 (2004) 125-155.

[12] E. Dickinson, Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes, in: A.M. Stephen (Ed.), Food polysaccharides and their applications. New York: Marcel Dekker, 1995, pp. 501-515.

[13] E. Dickinson, Emulsification and emulsion stabilization with protein-polysaccharide complexes, in: P.A. Williams, G.O. Phillips (Eds.), Gums and stabilizers for the food industry-14. Cambridge, UK: Royal Society, 2008, pp. 221-232.

[14] E. Dickinson, Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions, Soft Matter 4 (2008) 932-942.

[15] D. Guzey, D.J. McClements, Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry, Adv. Colloid Interface Sci. 128 (2006) 227-248.

[16] Y.S. Gu, E.A. Decker, D.J. McClements, Application of multi-component biopolymer layers to improve the freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions: β-lactoglobulin-ι-carrageenan-gelatin, J. Food Eng. 80 (2007) 1246-1254.

[17] P. Thanasukarn, R. Pongsawatmanit, D.J. McClements, Utilization of layer-by-layer interfacial deposition technique to improve freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions, Food Res. Int. 39(6) (2006) 721-729.

[18] M.A. Meza-Nieto, B. Vallejo-Cordoba, A.F. Gonzalez-Cordova, Effect of β-Lactoglobulin A and B whey protein variants on the rennet-induced gelation of skim milk gels in a model reconstituted skim milk system, J. Dairy Sci. 90 (2007) 582-593.

[19] S. Tcholakova, N.D. Denkov, I.B. Ivanov, B. Campbell, Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins, Adv. Colloid Interface Sci. 123-126 (2006) 259-293.

[20] E. Dickinson, Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments, J. Dairy Sci. 80 (1997) 2607-2619.

[21] S. Damodaran, Protein stabilization of emulsions and foams, J. Food Sci. 70 (2005) 54-66.

[22] M.A. Bos, T.V. Vliet, Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review, Adv Colloid Interface Sci. 91 (2001) 437-471.

[23] D.M.W. Anderson, M.M.E. Bridgeman, J.G.K. Farquhar, C.G.A. McNab, The chemical characterization of the test article used in toxicological studies of gum arabic (Acacia Senegal (L) Willd). Int. Tree Crops 2 (1983) 245-254.

[24] O.H.M. Idris, P.A. Williams, G.O. Phillips, Characterization of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography, Food Hydrocolloids 12 (1998) 379-388.

[25] R.C. Randall, G.O. Phillips, P.A.Williams, The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic, Food Hydrocolloids 2 (1988) 131-140.

[26] P. Erni, E.J. Windhab, R. Gunde, M. Graber, B. Pfister, A. Parker, P. Fischer, Interfacial rheology of surface-active biopolymers: Acacia senegal gum versus hydrophobically modified starch, Biomacromolecules 8(11) (2007) 3458-3466.

[27] L. Picton, I. Bataille, G. Muller, Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation, Carbohydrate Polymers 42(1) (2000) 23-31.

[28] M.L. Fauconnier, C. Blecker, J. Groyne, H. Razafindralambo, E. Vanzeveren, M. Marlier, M. Paquot, Characterization of two Acacia gums and their fractions using a langmuir film balance, J. Agric. Food Chem. 48(7) (2000) 2709-2712.

[29] E. Dickinson, Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, Food Hydrocolloids 17 (2003) 25-39.

[30] R. Chanamai, D.J. McClements, Comparison of Gum Arabic, Modified Starch, and Whey Protein Isolate as Emulsifiers: Influence of pH, $CaCl_2$ and Temperature, J. Food Sci. 67(1) (2002) 120-125.

[31] J.A. Casas, V.E. Santos, F. Garcia-Ochoa, Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties, Enzyme and Microbial Technology 26 (2000) 282-291.

[32] P.-E. Jansson, L. Kenne, B. Lindberg, Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*, Carbohydrate Research 45 (1975) 275-282.

[33] L.D. Melton, L. Mindt, D.A. Rees, G.R. Sanderson, Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: Evidence from partial hydrolysis studies, Carbohydrate Research 46 (1976) 245-257.

[34] C. Sun, S. Gunasekaran, M.P. Richards, Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions, Food Hydrocolloids 21 (2007) 555-564.

[35] E. Bouyer, G. Mekhloufi, I. Le Potier, T. du Fou de Kerdaniel, J.-L. Grossiord, V. Rosilio, F. Agnely, Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β-lactoglobulin and gum arabic, J. Colloid Interface Sci. 354 (2011) 467-477.

[36] G. Mekhloufi, C. Sanchez, D. Renard, S. Guillemin, L. Hardy, pH-Induced structural transitions during complexation and coacervation of beta-lactoglobulin and acacia gum, Langmuir 21 (2005) 386-394.

[37] C. Schmitt. Etude de la coacervation complexe entre la β-lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. Ph.D Thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine: Nancy, France, 2000.

[38] O. Mengual, G. Meunier, I. Cayré, K. Puech, P. Snabre, TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurements for concentrated emulsion and suspension instability analysis, Talanta 50 (1999) 445-456.

[39] C. Lemarchand, P. Couvreur, C. Vauthier, D. Costantini, R. Gref, Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan, Int. J. Pharm. 254 (2003) 77-82.

[40] C. Ringard-Lefebvre, A. Bochot, E. Memisoglu, D. Charon, D. Duchêne, A. Baszkin, Effect of spread amphiphilic β-cyclodextrins on interfacial properties of the oil/water system, Colloids Surf. B 25 (2002) 109-117.

[41] M. El-Mahrab-Robert, V. Rosilio, M.A. Bolzinger, P. Chaminade, J.-L. Grossiord, Assessment of oil polarity : comparison of evaluation methods, Int. J. Pharm. 348 (2008) 89-94.

[42] C. Schmitt, C. Sanchez, A. Lamprecht, D. Renard, C.-M. Lehr, C.G. De Kruif, J. Hardy, Study of beta-lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy, Colloids Surf. B 20 (2001) 267-280.

[43] R. Wüstneck, B. Moser, G. Muschiolik, Interfacial dilational behaviour of adsorbed β-lg layers at different fluid interfaces, Colloids Surf. B 15 (1999) 263-273.

[44] M. Benna-Zayani, N. Kbir-Ariguib, M. Trabelsi-Ayadi, J.-L. Grossiord, Stabilization of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels, Colloids Surf. A 316 (2008) 46-54.

[45] C. Sun, S. Gunasekaran, M.P. Richards, Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions, Food Hydrocolloids 21 (2007) 555-564.

[46] M. Hennock, R.R. Rahalkar, P. Richmond, Effect of xanthan gum upon the rheology and stability of oil-water emulsions, J. Food Sci. 49(5) (1984) 1271-1274.

[47] R.P. Chhabra, Bubbles drops and particles in Non-Newtonian Fluids, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

[48] L. Jossic, A. Magnin, Structuring of gelled suspensions flowing through a sudden three dimensional expansion, J. Non-Newtonian Fluid Mech, 127 (2005) 201-212.

[49] M. Benna-Zayani, N. Kbir-Ariguib, M. Trabelsi-Ayadi, J.-L.Grossiord, Stabilization of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels, Colloids Surf. A 316 (2008) 46-54.

[50] E. Kolodziejczyk, V. Petkova, J.-J. Benattar, M.E. Leser, M. Michel, Effect of fluorescent labeling of β-lactoglobulin on film and interfacial properties in relation to confocal fluorescence microscopy, Colloids Surf. A 279 (2006) 159-166.

[51] J.M. Park, B.B. Muhoberac, P.L. Dubin, J. Xia, Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation, Macromolecules 25 (1992) 290-295.

[52] Paulsson M, Dejmek P. Surface film pressure of β-lactoglobulin, α-lactalbumin and bovine serum albumin at the air/water interface studied by wilhelmy plate and drop volume, J. Colloid Interface Sci. 150(2) (1992) 394-403.

Table and Figure captions

Table I: Main stability parameters obtained for emulsions at day-1.

Table II: Viscosities (η) of the different solutions and emulsions at a shear rate of 150 s^{-1}.

Figure 1: Time evolution of retrodiffusion intensity along tube's height for β-lg 2.5 (w/w) % stabilized emulsion. d: day after emulsion formulation. ◇ d1, x d15, ▲ d30, △ d60, ● d90, □ d120, ○ d150, ■ d180.

Figure 2: Time evolution of the retrodiffusion intensity along tube's height for XG 1 (w/w) % emulsion. ■ d1, ○ d 180.

Figure 3: Retrodiffusion intensities of the different emulsions on the first day of stability when stabilized with: ◇ β-lg 1 %, ▷ β-lg 2.5 %, ● β-lg:GA 2.5 %, x GA 1 %, ▽ GA 2.5 %, ■ β-lg:XG 1 %, △ XG 1 %.

Figure 4: Micrographies of biopolymer stabilized emulsions (magnificence x 40). a: first day, and b: 6 months of stability, except for β-lg 2.5 (w/w) % (after 4 months). 1: β-lg 2.5 (w/w) %, 2a: GA 1 (w/w) %, 3: XG 1 (w/w) %, 4a: β-lg:GA (ratio 2:1) 2.5 (w/w) %, and 5: β-lg:XG (ratio 1:1) 1 (w/w) %. The scale bar corresponds to 20 µm; d: day.

Figure 5: Evolution of the d_{43} values obtained for: ■ β-lg at 2.5 (w/w) %, ● XG and ▲ β-lg:XG (ratio 1:1) at 1 (w/w) % stabilized emulsions over a 6-month period.

Figure 6: Time evolution of the interfacial tension for oil-aqueous solutions: ► XG 0.1 %, x water, ○ GA 2.5 %, ■ β-lg 2.5 %, and △ β-lg:GA 2.5 % solutions.

Figure 7: Rheograms of: x XG 1 % solutiuon, □ β-lg:XG 1 % emulsion, ● XG 1 % emulsion, ◄ β-lg:GA 2.5 % emulsion, ▽ GA 2.5 % emulsion, ■ GA 2.5 % solution, ○ β-lg 2.5 % solution, ▲ GA 1 % emulsion, + β-lg 1 % emulsion, and ◇ β-lg 2.5 % emulsion.

Figure 8: Emulsions stabilized by 1 % biopolymer (magnification x100), 2x zoom, (a): β-lg, (b): GA, (c): XG, (d): β-lg:GA ratio 2:1, and (e): β-lg:XG ratio 1:1.

Figure 9: Schematic representation of the five obtained stabilization mechanisms with (a): β-lg pH 4.2, (b): GA pH 4.2, (c): XG pH 7, (d): β-lg:GA pH 4.2, and (e): β-lg:XG pH 7.

CHAPITRE 7 - DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse s'est attaché à étudier les différents mécanismes de stabilisation d'émulsions par des biopolymères. Une protéine et deux polysaccharides ont été étudiés : la β-lg, la GA et la GX. Chacun de ces biopolymères est couramment utilisé dans l'industrie agroalimentaire et nous avons souhaité dans cette thèse les étudier dans le cadre de la stabilisation d'émulsions pharmaceutiques biodégradables.

Tout d'abord, un certain nombre de caractérisations de ces biopolymères a pu être réalisé, notamment par chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée, électrophorèse sur gel de polyacrylamide et chromatographie d'exclusion stérique. Il a été montré que la poudre de β-lg contenait une impureté : l'α-lactalbumine et que l'albumine de serum bovin n'était pas retrouvée probablement pour des raisons de sensibilité de la méthode. Les GA et GX, n'ont malheureusement pu être caractérisées de façon précise pour des raisons d'équipements inadaptés à leurs masses molaires trop élevées.

Les biopolymères ont ensuite été utilisés pour stabiliser des émulsions huile-dans-eau contenant 30 % d'huile d'amande douce. Ils ont été introduits seuls ou en combinaison avec un autre biopolymère. La combinaison de deux biopolymères a été rapportée comme permettant d'améliorer la stabilité des émulsions comparées à celles n'ayant qu'un seul biopolymère, notamment vis-à-vis des stress environnementaux tels que des changements de températures (Guzey et McClements, 2006 ; Gu *et al.*, 2007 ; Thanasukarn *et al.*, 2006). Ainsi, des émulsions ont pu être formulées avec les biopolymères seuls suivants : β-lg, GA, GX et avec les mélanges β-lg : GA et β-lg : GX. Différents paramètres de formulation ont pu être modulés tels que le protocole de formulation, les concentrations massiques totales en biopolymères, le pH et le ratio massique β-lg : GA. Le protocole de formulation a été modifié et adapté au vu des différentes stabilités. Il était initialement le plus simple possible afin de permettre une faible consommation d'énergie et ne comportait donc pas l'utilisation d'un homogénéisateur haute pression. Lorsque les émulsions ainsi formulées n'étaient pas stables, le protocole a été modifié afin de permettre l'obtention de tailles de globules plus petites

(assurant une meilleure stabilité de l'émulsion) et ce grâce au passage des émulsions dans un homogénéisateur haute pression. Enfin, dans ce dernier type de protocole, l'ordre d'ajout des biopolymères utilisés en combinaison a pu être varié afin d'évaluer son influence sur la stabilité des émulsions. La concentration massique totale en biopolymère a également été variée. Notre but était d'utiliser le moins possible de biopolymère pour stabiliser les émulsions. Les concentrations utilisées initialement étaient donc de 1 % et ont pu être modulées suivant les stabilités obtenues, en 0,5 % ou 2,5 %. Le pH a également été un des facteurs que nous avons fait varier. Il était de 4,2 ou de 7,0 suivant les conditions d'interactions souhaitées entre les biopolymères utilisés en combinaison. Le pH de 4,2 a permis d'établir des interactions électrostatiques attractives entre la β-lg et la GA (avec une constante d'affinité déterminée à $(1,2 \pm 0,2) \times 10^8$ M^{-1}), tandis que le pH 7 ne permettait pas la formation d'un complexe entre la β-lg et la GX. Enfin, deux ratios massiques β-lg : GA ont été étudiés (2 : 1 et 1 : 2). Ces deux ratios ayant déjà été étudiés dans le cadre de l'étude des interactions en solution β-lg : GA (Schmitt, 2000 ; Mekhloufi *et al.*, 2005). Pour la combinaison β-lg : GX, un seul ratio a été étudié, le 1 : 1, pour une raison de simplicité.

Il a été montré que les émulsions stabilisées par la β-lg, la GA ou la combinaison β-lg : GA nécessitaient l'utilisation d'un homogénéisateur haute pression afin d'obtenir des tailles de globules suffisamment petites et donc une meilleure stabilité. La combinaison β-lg : GA n'a néanmoins pas permis d'améliorer la stabilité des émulsions comparé aux émulsions stabilisées par l'un ou l'autre des biopolymères. L'ordre d'ajout de la protéine et du polysaccharide est important et nous avons montré qu'il était nécessaire de formuler l'émulsion avec la β-lg et d'ajouter ensuite la GA. Les émulsions contenant de la GX (seule ou en combinaison) n'ont, quant à elles, pas nécessité l'utilisation de cet appareil ce qui permet d'envisager leur fabrication par un procédé plus simple et moins coûteux en énergie.

Concernant l'influence des concentrations en biopolymère, la β-lg semble devoir être à une concentration d'au moins 1 ou 2,5 % pour obtenir une stabilité d'environ 20 jours. Il serait intéressant d'augmenter la concentration enfin de voir si cela conduit à une amélioration de la stabilité. La GA, quant à elle, n'a pas réellement permis d'obtenir d'émulsion stable à 2,5 % et là encore, il serait intéressant de formuler des émulsions à des concentrations supérieures. La combinaison β-lg : GA n'a pas permis d'améliorer la stabilité des émulsions même à une concentration totale de 2,5 %. Cette concentration est sans doute à moduler pour permettre d'éviter des phénomènes de floculation par pontage ou par déplétion. Les émulsions contenant de la GX ont été stabilisées à une concentration de 1 %. Il serait intéressant de la

diminuer afin de connaître la concentration minimale en GX nécessaire à la stabilisation des émulsions.

Les stabilités obtenues ont été les suivantes : GA < β-lg : GA < β-lg < GX = β-lg : GX et nous avons par la suite cherché à comprendre les mécanismes physico-chimiques qui régissaient la stabilité de ces émulsions. Ces deux derniers systèmes ne se sont pas distingués sur une période de 6 mois et il conviendrait de les étudier sur une période encore plus longue. Principalement, l'étude des propriétés interfaciales de ces biopolymères a été d'une importance cruciale, ainsi que l'étude des tailles et des propriétés rhéologiques des émulsions. Les observations au microscope confocal ont été d'une aide précieuse pour la confirmation des mécanismes de stabilisation.

La β-lg et la GA ont montré un comportement tensioactif certain, qui était en accord avec de nombreux résultats de la littérature (Dickinson *et al.*, 1989 ; Bos et Vliet, 2001 ; Damodaran, 2005) et leurs films interfaciaux ont présenté des propriétés viscoélastiques. Ces deux résultats permettent clairement de démontrer que ces biopolymères sont capables de s'adsorber à la surface des globules d'huile d'une émulsion et de les stabiliser. La GX, pour sa part, ne s'adsorbe pas à l'interface huile-eau. La combinaison β-lg : GA a montré tout d'abord que les complexes ainsi formés sont tensioactifs. De plus, lorsqu'ils sont additionnés l'un après l'autre, la structure adoptée au niveau de l'interface par les biopolymères n'est pas la même. La GA additionnée après que la β-lg soit déjà adsorbée permet d'obtenir une seconde couche à l'interface sans que la GA ne vienne s'intercaler entre les molécules de β-lg. Ceci a permis d'expliquer le mécanisme de stabilisation de l'émulsion formulée à l'aide de β-lg et de GA. Quelques points doivent être abordés ici, notamment le fait que la poudre de β-lg contenait de l'α-la et peut être des traces de BSA. Il est quasiment certain que ces protéines ont également contribuées à l'abaissement de la tension interfaciale. Cependant leur quantité étant très faible, nous avons considéré que leur contribution était minime comparé à celle de la β-lg. De plus, nous souhaitions étudier le comportement interfacial de notre poudre commerciale de β-lg et non celui d'une poudre pure. Ceci est conforté par le fait que dans l'hypothèse où ce biopolymère serait utilisé au niveau industriel, il serait moins coûteux que s'il était purifié. Un autre point nous semble important : celui de la diminution de tension interfaciale observée pour une interface huile-eau supposée propre et donc sans aucun biopolymère. Il a été expliqué dans le Chapitre 6 que certaines huiles possédaient des acides gras saturés et insaturés qui étaient capables de diminuer la tension interfaciale huile-eau. Cette observation avait notamment été faite par Wüstneck *et al.* (1999) sur de l'huile de

tournesol. Des études supplémentaires seraient donc nécessaires afin de préciser exactement les molécules responsables de cette diminution. Cependant, leur élimination n'était ici pas recherchée pour la même raison que cela induirait un coût supplémentaire. Cette diminution n'a pas été un frein à l'observation des propriétés tensioactives des biopolymères.

L'étude rhéologique a permis de mettre en évidence le mécanisme de stabilisation de la GX. Elle augmente la viscosité de la phase aqueuse continue des émulsions et leur confère un seuil d'écoulement. Les globules des émulsions sont donc répartis au sein d'un réseau lâche de molécules de GX et l'émulsion ne peut s'écouler qu'à partir d'une certaine contrainte imposée au système.

Enfin, les observations réalisées au microscope confocal à balayage laser nous ont permis de confirmer les mécanismes de stabilisation des émulsions en visualisant la localisation des biopolymères au sein des émulsions (à l'interface ou dans le volume). La β-lg n'a pas pu être clairement localisée à l'interface car elle était présente en excès dans l'émulsion observée et colorait donc toute la phase aqueuse. Cependant, en appui sur les mesures interfaciales, nous étions certains qu'elle se trouvait à l'interface également. La GA a très nettement été visualisée à la surface des globules, que ce soit pour les émulsions où elle était utilisée seule ou bien celle en combinaison avec la β-lg. Cette dernière observation a reconfirmé l'hypothèse émise lors des mesures de tensions interfaciales : dans le système mixte la β-lg s'adsorbe tout d'abord et la GA forme ensuite une seconde couche autour du globule par des interactions électrostatiques attractives. La GX enfin a étrangement été visualisée à la surface des globules huileux. L'hypothèse émise, étant donné qu'elle n'avait pas montré de propriétés tensioactives lors des mesures de tensions interfaciales, est que ces propriétés physico-chimiques ont été modifiées par le marquage. Néanmoins cette hypothèse demanderait à être étayée par une étude plus approfondie des biopolymères marqués. Il serait ainsi intéressant d'étudier les propriétés interfaciales des biopolymères marqués et de les comparer à celles des biopolymères non marqués.

Cette étude montre bien la possibilité de formuler des émulsions stabilisées par des polymères naturels. Cette provenance pose malgré tout certains problèmes qu'il sera nécessaire de résoudre avant toute commercialisation et utilisation en routine.

Leur variabilité de composition en fonction de leur origine ou de leur mode d'obtention pose le problème de la reproductibilité des formulations. La GA ne possède pas toujours la même quantité de fraction AGP responsable de son adsorption interfaciale, la β-lg

pas toujours la même pureté, *etc*. Ces variations influencent notamment les propriétés interfaciales de ces biopolymères qui pour une concentration identique n'auront pas les mêmes effets sur la stabilisation des émulsions. Pour une application pharmaceutique, il sera nécessaire d'utiliser des grades avec des spécificités bien contrôlées.

Certains polymères naturels peuvent également poser un problème d'allergénicité. Nous sommes conscients que la β-lg par exemple est bien connue pour les allergies alimentaires qu'elle peut causer (protéines laitières). La voie d'administration a ainsi son importance car il se peut que dans le cadre d'une utilisation cutanée, elle ne cause aucune réaction du fait qu'elle resterait dans le stratum cornéum. Des études seraient à effectuer dans ce cadre là, d'autant qu'il a été rapporté par Mouécoucou *et al.*, (2007) que l'association d'une protéine avec un polysaccharide réduirait la liaison aux IgE et donc potentiellement les allergies alimentaires. La complexation de la β-lg avec la GA pourrait ainsi diminuer cette liaison aux IgE et peut-être également empêcher une pénétration cutanée de la β-lg compte tenu de la masse molaire élevée du complexe formé.

Un autre point important est celui des tailles de globules qui ont été obtenues lors de nos formulations. Les tailles de globules n'ont pas été inférieures au micromètre et étaient mêmes de l'ordre de 40 µm pour les plus grosses. Cette gamme de taille exclut inévitablement la voie d'administration parentérale. Pour cette raison, les émulsions formulées dans cette thèse seront plus destinées à être administrées par voie orale ou topique. Elles pourraient donc convenir pour l'application que nous avions initialement envisagée en dermatologie, par exemple dans le traitement de l'acné en introduisant un principe actif approprié dans la phase interne huileuse.

Enfin, du fait de l'origine naturelle des biopolymères utilisés, les émulsions formulées vont être confrontées à des problèmes bactériologiques et de stockage. Nous avons dans notre cas ajouté un conservateur, l'azoture de sodium. Cependant ce composé ne correspond pas à l'orientation naturelle et biodégradable que nous avons souhaité mettre en œuvre initialement et il serait intéressant de pouvoir le remplacer. Il a été rapporté dans la littérature la possibilité de lyophiliser les émulsions ou de les sécher (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Cette procédure pourrait être une alternative à l'utilisation de conservateurs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à formuler et stabiliser des émulsions d'intérêt pharmaceutique par de la β-lg, de la GA et de la GX, afin d'obtenir des émulsions s'inscrivant dans la tendance actuelle des produits naturels et du développement durable.

Dans ce but, nous avons évalué l'influence de divers protocoles de formulation, associations de biopolymères, concentrations, pH et ratios protéine : polysaccharide sur la stabilité des émulsions obtenues. Il a été nécessaire d'étudier les mécanismes de stabilisation de ces émulsions afin de mieux comprendre l'influence de ces paramètres sur la stabilité des émulsions. Pour cela, nous avons procédé à des mesures de tailles, de potentiels zêta et de rhéologie sur les émulsions formulées, et nous avons évalué leur stabilité avec un Turbiscan. Le comportement interfacial des biopolymères a été étudié par tensiométrie et rhéologie interfaciales. Des mesures en microscopie confocale après marquage des biopolymères à la fluorescence a permis de visualiser leur localisation au sein des émulsions.

Il en ressort que chacun des paramètres varié lors de la formulation des émulsions à son importance. Le protocole de formulation joue principalement sur la taille des globules obtenus mais également, suivant l'ordre d'incorporation des biopolymères, sur la localisation et la structure du film de biopolymères au niveau de l'interface. Les concentrations influencent la quantité de biopolymères se trouvant à l'interface. Le pH et les ratios contrôlent les associations protéine : polysaccharide en modulant respectivement la charge des biopolymères et leur proportions l'un par rapport à l'autre. Suivant les biopolymères et les associations étudiées, différents mécanismes de stabilisation ont pu être identifiés. Le premier concerne la β-lg qui s'adsorbe à l'interface huile-eau, diminue la tension interfaciale et stabilise donc les globules huileux. La β-lg étant chargée aux pH étudiés, elle permet également une répulsion électrostatique des globules entre eux. Le second mécanisme est

celui de la GA, qui elle aussi, s'adsorbe à l'interface huile-eau avec un petit peu plus de délai, mais diminue de façon aussi efficace que la β-lg la tension interfaciale. De par sa charge négative aux pH étudiés, elle a également permis de stabiliser les émulsions en établissant des répulsions électrostatiques entre les globules. De plus, son adsorption interfaciale se faisant par les groupements AGP de sa structure, la conformation qu'elle adopte à l'interface est de type « wattle blossom » avec des groupements polysaccharidiques qui restent dans la phase aqueuse. Cette conformation permet également une stabilisation stérique des globules. L'association β-lg : GA a conduit dans le meilleur des cas à la formation d'une double couche stabilisante à l'interface des globules et correspond ainsi au troisième type de mécanisme de stabilisation. La β-lg a constitué la première couche et la GA la seconde. Cependant, cette combinaison n'a pas pour autant permis d'améliorer la stabilité des émulsions par rapport aux biopolymères seuls pour des raisons probables de floculation par pontage ou par dépletion. Il serait intéressant de faire varier la quantité de GA par rapport à la β-lg afin de déterminer les conditions permettant d'éviter les floculations. Le quatrième mécanisme de stabilisation obtenu est celui de la GX : elle a permis d'augmenter la viscosité de la phase continue aqueuse des émulsions et donc de ralentir les phénomènes de floculation, coalescence et crémage. Enfin, le dernier type de stabilisation combine celui de la β-lg et de la GX : la protéine s'adsorbe à l'interface et la GX augmente la viscosité de la phase aqueuse. Dans les conditions que nous avons mises en œuvre, les systèmes qui ont permis d'obtenir une stabilité sur plus de 6 mois sont les émulsions formulées présentant les deux derniers mécanismes. Il semble bien que seule, la taille des globules, ne suffit pas pour prédire la stabilité des émulsions. La viscosité de la phase continue et la concentration totale en biopolymères peuvent également jouer un rôle.

Afin d'approfondir cette étude des mécanismes de stabilisation, plusieurs résultats seraient à compléter.

Il serait tout d'abord bien évidemment nécessaire, de caractériser la GA et la GX par chromatographie d'exclusion stérique, par exemple, afin de connaître leurs masses molaires réelles et leur composition.

Dans un second temps, et afin de confirmer que le marquage de la GX avec la RITC a bien modifié les caractéristiques physico-chimiques de la gomme, il serait intéressant d'étudier les propriétés interfaciales de la GX marquée. Ceci nous permettrait de comprendre sa localisation interfaciale lors des observations au microscope confocal. De plus, et afin

d'être exhaustif, des mesures identiques avec la β-lg et la GA marquées devraient être réalisées afin d'exclure une modification de leurs propriétés interfaciales par le procédé de marquage.

Dans une optique similaire à ce qui a été fait pour l'association β-lg : GA, la combinaison β-lg : GX devrait être étudiée par des mesures de tensiométrie et de rhéologie volumique.

De façon générale, les associations β-lg : GA et β-lg : GX devraient être caractérisées en rhéologie interfaciale afin de mieux comprendre la stabilité des émulsions formulées avec ces deux biopolymères.

Il serait intéressant d'étudier d'autres concentrations de GX pour la formulation des émulsions et notamment d'effectuer des mesures de détermination de seuil d'écoulement pour des solutions de GX afin de déterminer à quelle valeur exacte il se trouve.

En vue d'éviter l'origine animale et allergène de la β-lg, il pourrait être envisagé de la remplacer par d'autres protéines naturelles comme les protéines de pois qui sont d'origine végétales.

Enfin, dans les perspectives de ce travail, il serait intéressant de procéder à des essais d'incorporation d'un principe actif modèle, tel que la trétinoïne, dans la phase interne des émulsions restées stables. Ce principe actif est une molécule liposoluble dérivée de la vitamine A et possédant des propriétés anti-acné. Son incorporation dans la phase interne permettra de le protéger de la lumière et de l'oxygène. Suite à l'incorporation de cette molécule d'intérêt, différentes études peuvent être envisagées, à savoir, l'influence de la présence de ce principe actif sur la stabilité des émulsions, l'intégrité chimique de la molécule (interactions éventuelles avec l'huile ou les biopolymères à l'interface), la libération de la trétinoïne en application cutanée (modèle *ex vivo* sur cellules de Franz) et la comparaison avec des formes commercialisées notamment vis-à-vis de la diminution de l'irritation cutanée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ali B.H., Ziada A., Blunden G. (2009) Biological effects of gum arabic: a review of some recent research. *Food Chemical Toxicology*. 47, 1-8.

AOAC. (1984). Dans Horwitz W. (Ed.), Official methods of analysis, 40ème edition, Washington DC : *Association of Official Analytical Chemists*.

Aoki T., Decker E.A., McClements D.J. (2005) Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids.* 19, 209-220.

Arai M., Ikura T., Semisotnov G.V. Kihara H., Amemiya Y., Kuwajima K. (1998) Kinetic refolding of β-lactoglobulin. Studies by synchrotron X-ray scattering, and circular dichroism, absorption and fluorescence spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 275, 149-162.

Aveyard R, Binks B.P. Clint J.H. (2003) Emulsions stabilized solely by colloidal particles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 100-102, 503-546.

Baeza R., Carrera Sanchez C., Pilosof A.M.R., Patino J.M.R. (2005) Interactions of polysaccharides with β-Lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*. 19, 239-248.

Baskin A., Rosilio V., Albrecht G., Sunamoto J. (1991) Cholesteryl-pullulan and cholesteryl-amylopectin interactions with egg phosphatidylcholine monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science.* 145, 502-511.

Benichou A., Aserin A., Garti N. (2007) W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 294, 20-32.

Benjamins J., Cagna A., Lucassen-Reynders E.H. (1996) Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interfaces covered by proteins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 114, 245-254.

Benna-Zayani M., Kbir-Ariguib N., Trabelsi-Ayadi M., Grossiord J.-L. (2008) Stabilization of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 316, 46-54.

Binks B.P., Clint J.H, Mackenzie G, Simcock C, Whitby C.P. (2005) Naturally occurring spore particles at planar fluid interfaces and in emulsions. *Langmuir.* 21, 8161-8167.

Binks B.P., Horozov T.S. (2006) Colloidal particles at liquid interfaces. Binks B.P., Horozov T.S. (Eds.). Cambridge University Press.

Bos M.A., Vliet T.V. (2001) Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Adv Colloid Interface Sci.* 91, 437-471.

Brochette P. (1999) Emulsification : Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés*. J 2 150, 18p.

Brownlow S., Cabral J.H.M., Cooper R., Flower D.R., Yewdall S.J., Polikarpov I., North A.C.T., Sawyer L. (1997) Bovine β-lactoglobulin at 1.8 Å resolution - Still an enigmatic lipocalin. *Structure.* 5, 481–495.

Cabane B., Hénon S. (2003) Liquides : Solutions, dispersions, émulsions, gels. Collection Echelles. Edition Belin.

Canselier J.P., Poux M. (2004) Procédés d'émulsification : Mécanismes de formation des émulsions. *Techniques de l'Ingénieur*. J 2 152, 12p.

Cayot P., Lorient D. (1998) Structures et technofonctions des protéines du lait. Paris : Lavoisier.

Conchello J.-A., Lichtman J.W. (2005) Optical Sectioning Microscopy. *Nature Publishing Group (npg).* 2, 920-931.

Damodaran S. (2005) Protein stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*. 70(3), 54-66.

Das K.P., Kinsella, J. E. (1990) Stability of food emulsions physicochemical role of protein and non protein emulsifiers. In : *Advances in food and nutrition research*, New York, Academic Press. 34, 81-201.

Dentini M., Crescenzi V., Blasi D. (1984) Conformational Properties of Xanthan Derivatives in Dilute Aqueous Solution. *International Journal of Biological Macromolecules.* 6, 93-98.

Derjaguin B., Landau L. (1941) Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physica et Chimica*. 14(6), 633-662.

Desprairies M. (2005) Les Hydrocolloïdes autres que l'amidon. *Présentation Cargill*.

Dickinson E. (1993) Protein - Polysaccharide Interactions in Food Colloids. Dickinson E., Walstra P. (Eds.). *Food Colloids & Polymers: Stability & Mechanical Properties*. Royal Society of Chemistry. p. 77-93.

Dickinson E. (1995) Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes. Stephen A.M. (Ed). *Food polysaccharides and their applications.* New York: Marcel Dekker. p. 501-515.

Dickinson E. (2003) Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids.* 17, 25-39.

Dickinson E. (2008a) Emulsification and emulsion stabilization with protein-polysaccharide complexes. Williams P.A., & Phillips G.O. (Eds). *Gums and stabilizers for the food industry-14.* Cambridge, UK : Royal Society. p. 221-232.

Dickinson E. (2008b) Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*. 4, 932-942.

Dickinson E. (2009) Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*. 23, 1473-1482.

Dickinson E., Elverson D.J., Murray B.S. (1989) On the film-forming and emulsion stabilizing properties of gum arabic : dilution and flocculation aspects. *Food Hydrocolloids* 3, 101-114.

Dickinson E., Rodriguez Patino J.M. (1999) Food Emulsions and Foams: Interfaces, Interactions and Stability. UK: Royal society of Chemistry. 390p.

Doi E. (1993) Gels and gelling of globular proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 1-5.

Dorobantu L.S., Yeung A.K.C., Foght J.M., Gray M.R. (2004) Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria. *Appl Environ Microbiology.* 70, 6333-6336.

Doublier J.-L. (1993) Rhéologie des Polyosides en Milieu Aqueux: Solutions, Gels et Mélanges. *Cahier Scientifique*. Conférence présentée au Congrès IFTEC, la Haye.

Doublier J.-L., Garnier C., Renard D., Sanchez C. (2000) Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 5, 202-214.

Dribek M. (2006) Etude par électrophorèse capillaire des interactions entre le peptide vasoactif intestinal et les polymères poly (amidoamine). *Rapport de stage de M2 Pharmacotechnie et Biopharmacie*.

Edwards P.J.B., Jameson G.B., Palmano K.P., Creamer L.K. (2002) Heat resistant structural features of bovine β-lactiglobulin A revealed by NMR H/D exchange observations. *International Dairy Journal*. 12(4), 331-344.

El-Agamy E.I. (2007) The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research.* 68, 64-72.

Fogolari F., Ragona L., Licciardi S. (2000) Electrostatic Properties of Bovine β-lactoglobulin. *Proteins: Structure, Function and Genetic.* 39, 317-330.

Formulaction : site internet. Page consultée le 05/12/10. http://www.formulaction.com/

Friberg S.E., Venable R.L. (1983) Microemulsions. Becher P. (Ed.). *Encyclopedia of emulsion technology vol 1.* New York: Marcel Dekker. p.287-336.

Garti N. (1999) Hydrocolloids as emulsifying agents for oil-in-water emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology.* 20, 327-355.

Garti N., Reichman D. (1993) Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food microstructure.* 12, 411-426.

Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Int.* 40, 1107-1121.

Gibbs J.W. (1931) The collected work of J.W. Gibbs. Longmans, Green & Company, New York.

Gu Y.S., Decker E.A., McClements D.J. (2005) Influence of pH and carrageenan type on properties of β-lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids.* 19, 83-91.

Gu Y.S., Decker E.A., Mc Clements D.J. (2007) Application of multi-component biopolymer layers to improve the freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions: beta-lactoglobulin-iota-carrageenan-gelatin. *J. Agric. Food Eng.* 80, 1246-1254.

Guzey D., McClements D.J. (2006) Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 128, 227-248.

Guzey D., Kim H.J., McClements D.J. (2004) Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β-lactoglobulin-pectine membranes. *Food Hydrocolloids*. 18, 967-975.

Heegard N., Nilsson S., Guzman N.A. (1998) Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *Journal of Chromatography B*. 715, 29-54.

Hunter R.J. (1986) Transport properties of suspensions. *Foundations of Colloid Science, vol 1*. Oxford University Press: New York. 494-536.

Idris O.H.M., Williams P.A., Phillips G.O. (1998) Characterisation of gum from Acacia Senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocolloids.* 12, 379-388.

Ikeguchi M., Kato S.-I., Shimizu A., Sugai S. (1997). Molten globule state of equine β-lactoglobulin. *Proteins : Struct. Funct. Gen.* 27, 567-575.

Islam, A.M., Phillips G.O., Sljivo A., Snowden M.J., Williams P.A. (1997) A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. *Food Hydrocolloids.* 11, 493-505.

Kang K.S., Pettitt D.J. (1992) Xanthan gum. Whistler R.L. (Ed.). *Industrial Gums: polysaccharides and their derivatives.* 3ème ed. San Diego p. 342.

Kitamura S., Takeo K., Kuge T., Stokke B. (1991) Thermally Induced Conformational Transition of Double-stranded Xanthan in Aqueous Salt Solutions. *Biopolymers.* 31, 1243-1255.

Kravtchenko T.P. (1997) Application of Acacia Gum as a Natural Source of Soluble Dietary Fibre. Food Ingredients Europe, *Conference Proccedings*, Maarssen (The Netherlands): Miller Freeman 56-60.

Krüss : site internet. Page consultée le 01/12/10. http://www.kruss.de/

Lamprecht A., Schäfer U.F., Lehr C.M. (2000) Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 49(1), 1-9.

Laneuville S.I., Paquin P., Turgeon S.L. (2000) Effect of preparation conditions on the characteristics of Whey protein – Xanthan gum complexes. *Food Hydrocolloids.* 14(4), 305-314.

Langevin D. (2000) Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties, *Adv. Colloid Interface Sci.* 88, 209-222.

Laplante S., Turgeon S.L., Paquin P. (2006) Emulsion-stabilizing properties of chitosan in the presence of whey protein isolate: Effect of the mixture ratio, ionic strength and pH. *Carbohydrate Polymers*. 65, 479-487.

Lecourtier J., Chauveteau G., Muller G. (1986) Salt-induced Extension and Dissociation of Native Double-Stranded Xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 8, 306-310.

Li Y., Hu M., Xiao H., Du Y., Decker E.A., McClements D.J. (2010) Controlloing the functional performance of emulsion-based delivery systems using multicomponent biopolymer coatings. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76, 38-47.

Lucassen J., Van Den Tempel M. (1972) Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science.* 27, 1283-1291.

Lutz R., Aserin A., Wicker L., Garti N. (2009) Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 72(1), 121-127.

Le Martret C. (1998) Formulation de matrices hydrophiles par la mise en œuvre de différents grades d'hydrocolloïdes (xanthane, guar et caroube). Thèse d'exercice de la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry - Université Paris-Sud 11.

Le Neindre B. (1993) Tensions superficielles et interfaciales. *Techniques de l'Ingénieur*. K 4751-12.

Le Potier I., Taverna M., Morin P. (2003) Electrophorèse capillaire. *Techniques de l'Ingénieur*. P 3365-2.

Le Saux T. (2004) Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par les méthodes électrophorétiques capillaires. Champ d'application et performances. Rationalisation des protocoles. Thèse de doctorat de l'université Paris VI-Pierre et Marie Curie 276 p.

Martini M.-C. (2007) Tensioactifs. Dans Encycl Med Chir. Cosmetologie et dermatologie esthétique. Paris Elsevier Masson Ed, p. 8 [50-120-C-10].

Mattison K.W., Dubin P.L., Brittain I.J. (1998) Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: Effects of polymer charge density. *Journal of Physical Chemistry*. 102, 3830-3836.

Mc Namee B.F., O'Riordan E.D., O'Sullivan M. (1998) Emulsification and microencapsulation properties of gum Arabic. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46, 4551-4555.

McSwiney M., Singh H., Campanella O.H. (1994) Thermal aggregation and gelation of bovine β-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids* 8, 441-453.

Mekhloufi G. (2005) Mise en place d'une approche multi-méthodologique de l'étude de la complexation et de la coacervation complexe entre protéines et polysaccharides. Thèse de Doctorat de L'Institut National Polytechnique de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy 137p.

Mekhloufi G., Sanchez C., Renard D., Guillemin S., Hardy L. (2005) pH-Induced structural transitions during complexation and coacervation of beta-lactoglobulin and acacia gum. *Langmuir* 21, 386-394.

Meza-Nieto M.A., Vallejo-Cordoba B., Gonzalez-Cordova A.F. (2007) Effect of β-lactoglobulin A and B whey protein variants on the rennet-induced gelation of skim milk gels in a model reconstituted skim milk system. *J. Dairy Sci.* 90, 582-593.

Minsky M. (1967) Microscopy apparitus. *Brevet US 3013467*.

Möbius D., Miller R. (1998) *Proteins at Liquid Interfaces.* Amsterdam: Elsevier.

Moorhouse R., Walkinshaw M.D., Arnott S. (1977) Xanthan Gum-Molecular, Conformation and Interactions. In: Extracellular Microbial Polysaccharides, *Symposium Series* American Chemical Society, Washington, D.C. 45, 90-102.

Morris E.R., Rees D.A., Young G., Walkinshaw M.D., Darke A. (1977) Order-disorder Transition for a Bacterial Polysaccharide in Solution. *Journal of Molecular Biology*. 110, 1-16.

Morris V.J. (1990) Science, structure and applications of microbial polysaccharides. In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, Vol. 5, pp. 315-328. Phillips, G.O., Williams, P.A., Wedlock, D.J. (Eds.), Oxford University: IRL Press.

Morris V.J. (1995) Bacterial Polysaccharides. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*, Chap. 11, pp. 341-375. Stephen A.M. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York.

Mouécoucou J., Frémont S., Villaume C., Sanchez C., Méjean L. (2004) Polysaccharides reduce in vitro IgG/IgE-binding of β-lactoglobulin after hydrolysis. *Food Chemistry*. 104, 1242-1249.

Muller G., Anrhourrache M., Lecourtier J., Chauveteau G. (1986) Salt dependence of the conformation of a single-stranded xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 8, 167-172.

Myers D. (1999) Surfaces, Interfaces and Colloids principles and applications. 2ème éd. Wiley J., Sons (Eds.). United States of America p. 257.

Norde W. (2003) Colloids and interfaces in life Sciences. New York: Marcel Dekker.

Oboroceanu D., Wang L., Brodkorb A. (2010) Characterization of β-lactoglobulin fibrillar assembly using atomic force microscopy, polyacrylamide gel electrophoresis, and in situ Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 3667-3673.

Ostwald W. (1901) Die Wissenschaftlichen grundlegen der analytischen Chemie. 3ème éd. Wilhem, Ingelmann, Leipzig.

Paoletti S., Cesaro A., Delben F. (1983) Thermally induced conformational transition of xanthan polyelectrolyte. *Carbohydrate Research*. 123, 173-178.

Papiz M.Z., Sawyer L., Eliopoulos E.E., North A;C.T., Findlay J.B.C., Sivaprasadarao R., Jones T.A., Newcomer M.E., Kraulis J.P. (1986) The structure of β-Lactoglobulin and its similary to plasma retinal-binding protein. *Nature*. 324-383.

Paraskevopoulou A., Boskou D., Kiosseoglou V. (2004) Stabilization of olive oil-lemon juice emulsion with polysaccharides. *Food Chemistry*. 90, 627-634.

Pérez M.D., Calvo M. (1994) Interaction of β-Lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein : a review. *Journal of Dairy Science*. 78, 976-988.

Pharmacopée Européenne 6ème edition (2006) Direction Européenne de la Qualité des Médicaments du Conseil de l'Europe, Strasbourg.

Pickering S.U. (1907) Emulsions. *J. Chem. Soc.* 91, 2001-2021.

Picton L., Bataille I., Muller G. (2000) Analysis of a complexe polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fraction. *Carbohydrate Polymers*. 42, 23-31.

Ramsden W. (1903) The separation of solid materials on the surface of solutions and suspensions. Observations concerning surface diaphragms, foam blisters, emulsions and mechanical coagulation. *Proc. Roy. Soc*. 72, 156-164.

Randall R.C., Phillips G.O., Williams P.A. (1989) Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. *Food Hydrocolloids* 3, 65-75.

Rocherfort W.E., Middleman S. (1987) Rheology of Xanthan Gum: Salt, Temperature, and Strain Effects in Oscillatory and Steady Shear Experiments. *The Society of Rheology*. 31(4), 337-369.

Rosset R., Claude M., Jardy A. (1991) Chromatographies en phses liquide et supercritique. 3ème ed. Masson (Ed.), 919 p.

Said H.M., Ong D.E., Shinleton J.L. (1989) Intestinal uptake of retinol : enhancement by bovine milk β-Lactoglobulin. *American Journal of Clinical Nutrition*. 49, 690-694.

Sanchez C., Renard D., Robert P., Schmitt C., Lefebvre J. (2002) Structure and rheological properties of Acacia gum dispersions. *Food Hydrocolloids*. 16, 257-267.

Sawyer L., Kontopidis G. (2000) The core lipocalin, bovine β-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482, 136-148.

Schmitt C. (2000) Etude de la coacervation complexe entre la β-lactoglobuline et la gomme arabique en solution aqueuse. Thèse de Doctorat de L'Institut National Polytechnique de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy 217p.

Schmitt C., Palma da Silva T., Bovay C, Rami-Shojaei S., Frossard P., Kolodziejczyk E., Leser M.E. (2005) Effect of Time in the Interfacial and Foaming Properties of β-lactoglobulin/Acacia Gum Electrostatic Complexes and Coacervates at pH 4.2. *Langmuir*. 21, 7786-7795.

Schubert H., Ax K., Behrend O. (2003) Product engineering of dispersed systems. *Trends in Food Science and Technology*. 14, 9-16.

Schubert H., Engel R. (2004) Product and formulation engineering of emulsions. *Chemical Engineering Research and Design*. 82(A9), 1137-1143.

Secchi G. (2008) Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology.* 26, 321-325.

Seyrek E., Dubin P.L., Tribet C., Gamble E.A. (2003) Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions. *Biomacromolecules.* 4, 273-282.

Shimada K., Cheftel J.-C. (1989) Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 37, 161-168.

Simon J.L. (2001) Gomme xanthane : agent viscosifiant et stabilisant. *Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire.* F 4 300, 8p.

Solans C., Pons R., Kunieda H. (1997) Overview of basic aspects of microemulsions. Solans C., Kunieda H. (Eds.). *Industrial applications of microemulsions* vol 66. New York: Marcel Dekker p.1-19.

Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N., Garcia-Celma M.J. (2005) Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 10, 102-110.

Street C.A., Anderson D.M.W. (1983) Refinement of the structures previously proposed for gum arabic and other *Acacia* gum exudates. *Talanta.* 30, 887-893.

Sun C., Gunasekaran S., Richards M.P. (2007) Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids.* 21, 555-564.

Sutherland I.W. (1990) Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides. Cambridge University Press. Melbourne.

Swaisgood H.E. (1982) Chemistry of milk proteins. Dans Fox P.F. (Ed), Developments in dairy chemistry – I. Proteins, pp. 1-59, Londres : Applied Science Publishers.

Tadros T.F. (2004) Application of rheology for assessment and prediction of the long term physical stability of emulsions. *Adv. Coll. Interfaces Sci.* 108-109, 227-257.

Tadros T.F. (2009) Emulsion science and Technology: A general Introduction. Tadros TF. (Ed). *Emulsion Science and Technology.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA p. 1-56.

Tadros T.F., Vincent B. (1983) Emulsion Stability. Becher P. (Ed). *Encyclopedia of emulsion technology* vol 1. New York: Marcel Dekker p. 129-285.

Tambe D.E., Sharma M.M. (1994) The effect of colloidal particles on fluid-fluid interfacial properties and emulsion stability. *Adv. Colloid Interface Sci.* 52, 1-63.

Tanaka Y., Terabe S. (2002) Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B.* 768, 81-92.

Tardat-Henry M., Beaudry J.P. (1992) Chimie des eaux, 2nde Ed. Le Griffon d'argile, 537p.

Thanasukarn P., Pogsawatmanit R., McClements D.J. (2006) Utilization of layer-by-layer interfacial deposition technique to improve freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions. *Food Res. Int.* 39(6), 721-729.

Timasheff S.N., Mescanti L., Basch J.J., Townend R. (1966) Conformational transitions of bovine β-lactoglobulins A, B and C. *J. Biol. Chem.* 241, 2496-2501.

Tolstoguzov V.B. (1986) Functional Properties of Protein-Polysaccharide Mixtures. Dans Mitchell J.R., Ledward D.A. (Eds.). *Functional Properties of Food Macromolecules.* Elsevier Applied Science: London 385p.

Tolstoguzov V.B. (1997) Protein - Polysaccharide Interaction. Damodaran S., Paraf A. (Eds.). *Food Proteins and their Applications*. Marcel Dekker, Inc., New York. p. 171-198.

Tolstoguzov V.B. (2003) Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*. 17, 1-23.

Townend R., Timasheff S.N. (1960) Molecular interactions in β-lactoglobulin. III. Light Scattering Investigation of the Stoichiometry of the Association between pH 3.7 and 5.2. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 3168-3174.

Verheul M., Pedersen J.S., Roefs S.P.F.M., de Kruif C.G. (1999) Association behavior of native β-lactoglobulin. *Biopolymers.* 49(1), 11-20.

Wang H., Hobbie E.K. (2003) Amphiphobic carbon nanotubes as macroemulsions surfactants. *Langmuir*. 19, 3091-3093.

Ward A.F.H., Tordaï L. (1946) Time dependence of boundary tensions of solutions. I. The role of diffusion in time-effects. *J. Chem. Phys.* 14, 453-461.

Weiss J., Scherze I., Muschiolok G. (2005) Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids*. 19, 605-615.

Witz J., Timasheff S.N., Luzzati V. (1964) Molecular Interactions in β-lactoglobulin. VIII. Small-angle X-ray scattering investigation of the geometry of β-lactoglobulin A tetramerization. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 168-173.

Wüstneck R., Moser B., Muschiolik G. (1999) Interfacial dilational behaviour of adsorbed β-lg layers at different fluid interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 15, 263-273.

Yadav M.P., Igartuburu J.M., Yan Y., Nothnagel E.A. (2007) Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. *Food Hydrocolloids.* 21, 297-308.

ANNEXE

Formulation et caractérisation d'émulsions huile-dans-eau stabilisées par de la β-lactoglobuline et de la gomme arabique.

Formulation et caractérisation d'émulsions huile dans eau stabilisées par de la β-lactoglobuline et de la gomme arabique.

E. BOUYER, G. MEKHLOUFI, V. ROSILIO, J.L. GROSSIORD, F. AGNELY*

UFR de Pharmacie – Université Paris-Sud 11, UMR CNRS 8612 « Physicochimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie », 5 rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex. (*eleonore.jouanny@u-psud.fr)

RESUME : Dans cette étude, nous avons choisi de remplacer les agents tensioactifs de synthèse servant à stabiliser des émulsions par des émulsifiants et des stabilisants « naturels » de façon à développer des émulsions pharmaceutiques et cosmétiques qui s'inscrivent dans la tendance actuelle de produits naturels et biodégradables.

Dans ce but, des émulsions simples huile dans eau (H/E) stabilisées par de la β-lactoglobuline (β-lg), de la gomme arabique (GA) et des mélanges β-lg : GA ont été formulées et caractérisées. Préalablement, les dispersions aqueuses des biopolymères et de leurs mélanges ont été caractérisées par des mesures de la diffusion dynamique de la lumière, du potentiel zêta et de la viscosité.

Ce travail a permis de montrer la possibilité de réaliser des émulsions stabilisées avec la GA seule, lorsque la concentration totale en biopolymère dans les dispersions est de 2,5 et 5 %. Dans le cas de la β-lg seule, la réalisation d'émulsions stables a nécessité l'utilisation d'un homogénéisateur afin d'obtenir de très faibles tailles de globules, ce qui a permis d'abaisser la concentration en β-lg à 0,5 et 1 %. Dans le but d'améliorer la stabilité des émulsions réalisées avec un mélange de β-lg et de GA, nous avons tenté d'établir des interactions électrostatiques attractives entre ces deux biopolymères en se plaçant à un pH de 4,2 auquel la protéine et le polysaccharide possèdent des charges globales opposées. L'émulsion la plus stable obtenue a été réalisée grâce à une dispersion de β-lg ensuite diluée à l'aide d'une dispersion de GA pour un ratio massique β-lg : GA de 2 : 1. Des mesures de tension interfaciale ont montré que la β-lg s'adsorbe à l'interface et que la GA s'organise probablement autour des globules huileux par des interactions électrostatiques attractives avec la β-lg.

Ces résultats montrent l'intérêt de l'utilisation de la β-lg, de la GA et des complexes β-lg : GA dans la stabilisation d'émulsions.

MOTS-CLES : Émulsion, β-lactoglobuline, gomme arabique, complexes protéine-polysaccharide, tension interfaciale.

1. INTRODUCTION

Les domaines où l'on rencontre des émulsions sont extrêmement nombreux et variés tels que l'agroalimentaire, la cosmétique, la pharmacie, les produits d'entretien, les revêtements routiers, etc [1]. Ces émulsions ne sont pas à l'équilibre thermodynamique et sont donc sujettes à une déstabilisation et une séparation de phases. Le formulateur peut ralentir ou inhiber les mécanismes physiques conduisant normalement à la démixtion des phases non miscibles. L'ajout d'agents tensioactifs permet ainsi la formation d'émulsions plus stables dans le temps. Leur rôle est d'abaisser la tension interfaciale entre les deux liquides non miscibles donnant lieu à la formation de gouttelettes de plus petite taille et formant un film protecteur autour de ces gouttelettes pour limiter ainsi leur agrégation ou leur coalescence.

Ce travail vise à remplacer les tensioactifs synthétiques par des émulsifiants et stabilisants « naturels » afin de développer des émulsions qui s'inscrivent dans la tendance actuelle de produits naturels et biodégradables. Cette approche a déjà été utilisée dans l'industrie agroalimentaire qui utilise couramment les protéines et les polysaccharides comme ingrédients de contrôle de la structure, de la texture et de la stabilité des produits grâce, entre autres, à leurs propriétés de surface, d'agrégation et de gélification [2,3]. A notre connaissance, cette utilisation n'existe pas encore dans les domaines pharmaceutique et cosmétique.

Deux biopolymères ont été utilisés dans cette étude : la β-lactoglobuline (β-lg) et la gomme arabique (GA).

La β-lactoglobuline est une petite protéine globulaire appartenant à la famille des lipocalines. Elle constitue la protéine majeure du lactosérum puisqu'elle représente environ 50 % de la masse des protéines contenue dans celui-ci. De manière générale, elle est présente dans le lait de nombreux ruminants et d'autres espèces [4]. Elle est largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes. Elle est aussi utilisée comme agent nutritif dans certains produits cosmétiques.

La séquence primaire de la β-lg comporte 162 acides aminés, pour une masse molaire de 18 400 g/mol, un rayon hydrodynamique qui varie entre 1,8 et 2,9 nm, et un point isoélectrique d'environ 5,1 [5]. Elle contient deux ponts disulfures et un groupement thiol libre [6].

La gomme arabique, également appelée gomme d'Acacia, est un polysaccharide complexe de type arabinogalactane. Elle est produite par exsudation des arbres du genre Acacia et est principalement utilisée comme émulsifiant dans l'industrie agroalimentaire. Elle est considérée comme la meilleure gomme à utiliser dans des systèmes émulsionnés de type huile dans eau [7]. Il est également possible de faire

de la microencapsulation en raison de sa haute solubilité dans l'eau et de sa faible viscosité même à forte concentration [8]. Son écoulement est considéré comme newtonien jusqu'à une concentration en gomme de 20-30 %, voire plus [9].

La gomme arabique est composée de sucres et de deux acides uroniques qui lui confèrent un caractère polyanionique [10]. Elle contient également près de 2 % de protéines liées de façon covalente à la fraction saccharidique, donnant un mélange de complexes arabinogalactane-protéine (AGP). Cet assemblage de blocs polysaccharidiques autour de la chaine peptidique est à l'origine du caractère amphiphile de la gomme. L'AGP est l'une des trois principales fractions identifiées dans la gomme arabique, les deux autres étant l'arabinogalactane (AG) et la glycoprotéine (GP) [9,11]. La fraction AGP représente moins de 15 % de la masse totale de la gomme, l'AG près de 80 à 85 % et la GP environ 1 % [12]. La teneur en protéines de la fraction AG ne représente que 0,35 % de la teneur globale de la gomme. Néanmoins, la composition protéique des fractions AG et AGP est quasiment similaire en terme d'acides aminés, les plus abondants étant l'hydroxyproline et la sérine [13]. La masse molaire totale de la gomme peut varier de $4,6 \times 10^5$ à $5,8 \times 10^5$ g/mol et le rayon hydrodynamique moyen est compris entre 12 et 20 nm [14]. Le pKa de la gomme arabique est inférieur à 3,6 [15].

Les polysaccharides sont très utilisés dans la formulation des émulsions pour leurs propriétés stabilisantes, en modifiant la viscosité de la phase continue aqueuse, en la gélifiant ou encore en s'adsorbant à l'interface entre les deux liquides [16]. Par ailleurs, il a été montré dans la littérature que les propriétés émulsifiantes des protéines et/ou des polysaccharides se trouvent améliorées lorsque des interactions s'établissent entre ces deux biopolymères conduisant à la formation de complexes [3].

Nous nous proposons donc de développer et de caractériser des émulsions simples d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique formulées et stabilisées avec la β-lg, la GA et les mélanges β-lg : GA. Dans un premier temps, les dispersions aqueuses de β-lg et de GA, ainsi que les mélanges β-lg : GA ont été caractérisés. Nous avons par la suite réalisé des émulsions d'huile d'amande douce dans une phase continue formée soit par la dispersion de β-lg, soit par celle de GA ou encore par le mélange β-lg : GA. Nous nous sommes intéressés à l'influence de différents paramètres sur la stabilisation des émulsions à savoir, la concentration totale en biopolymères, le pH, le ratio protéine : polysaccharide et sur la méthode de formulation. Nous avons réalisé des analyses de mobilité électrophorétique, des mesures rhéologique et interfaciale afin d'élucider le mécanisme de stabilisation des émulsions par ces deux émulsifiants.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Matériels

La β-lg utilisée lors de ce travail (lot n° JE 002-8-992) a été fournie par Davisco Foods International Inc. (Etats-Unis). La poudre contenait (en g/100g de poudre humide) : 89,8 % de protéines, 8,8 % d'humidité et 1,4 % de cendres. La composition minérale (en g/100g de poudre) était : Ca^{2+} : 0,079 ; Mg^{2+} : 0,013 ; K^{+} : 0,097 ; Na^{+} : 0,576 et Cl^{-} : 0,050.
La GA INSTANTGUM AA nous a été gracieusement donnée par la société CNI (Colloïdes Naturels International, Rouen, France). D'après le fournisseur, la poudre contenait jusqu'à 10 % d'humidité et 4 % de cendres.
L'huile d'amande douce a été fournie par la Cooper (Melun, France). Deux lots ont été utilisés : l'huile vierge (lot n° 05120091/C) et l'huile raffinée (lot n° 06040028/A). Le raffinement de l'huile permet une meilleure conservation. Par souci de simplification, nous l'appellerons « huile » dans le reste de ce document.
L'acide chlorhydrique 2 N (lot n° 0C566024) utilisé pour l'ajustement du pH était de qualité analytique (Merck).

2.2 Préparation des dispersions de β-lactoglobuline et de gomme arabique

Des dispersions de β-lg et de GA à 0,5 et 1 % (m/m) de concentrations finales en biopolymères ont été préparées à température ambiante par dispersion de poudres de β-lg et de GA dans de l'eau MilliQ (résistivité : 18,2 mΩ.cm) (Millipore Synergy 185). Durant au moins 2 heures, une agitation magnétique a été maintenue de façon modérée afin d'éviter la formation de bulles d'air. Les dispersions obtenues ont alors été placées à 4 ± 1°C durant une nuit afin de permettre l'hydratation des biopolymères. Il est à noter que des dispersions à 2,5 et 5 % ont également été réalisées.
Le pH des dispersions de β-lg a ensuite été ajusté à 4,8 (pH de solubilité minimale de la β-lg [17]) avec des solutions aqueuses de HCl 1 N et 0,1 N (pHmètre MeterLab PHM 220 LAB). Les dispersions de β-lg ont ensuite été centrifugées à 10 000 g pendant 30 min à 20 ± 1°C, afin d'éliminer les particules insolubles ainsi que les agrégats de β-lg (Centrifugeuse Sigma 3K30 Bioblock Scientific). La quantité éliminée suite à cette étape s'élève à environ 10 % (m/m) [17]. Nous avons tenu compte de cette perte de masse dans la quantité de poudre initialement dispersée afin d'obtenir la concentration finale désirée. Le pH des dispersions de β-lg a été alors réajusté à 4,2 par addition de HCl 1 N et 0,1 N. Le pH des dispersions de GA a de la même façon, été ajusté à 4,2 sans procéder à une étape de centrifugation.
Le pH a été choisi afin de permettre l'établissement d'interactions électrostatiques attractives entre les deux biopolymères et former des complexes [18]. En effet, le point isoélectrique de la β-lg étant proche de 5,1, elle est chargée positivement à pH 4,2. La GA, quant à elle, est alors chargée négativement. Ainsi, l'influence de la complexation sur la stabilité des émulsions formulées à l'aide de ces dispersions a pu être étudiée.

2.3 Préparation des émulsions

L'huile d'amande douce a été dispersée dans une solution de β-lg, de GA ou de mélange β-lg : GA. La phase dispersée constitue 30 % (m/m). Les concentrations des solutions de β-lg et de GA utilisées pour réaliser les émulsions étaient de 0,5 et 1 %. Il est à noter que des concentrations à 2,5 et 5 % ont également été étudiées.
Dans le cas où les émulsions ont été stabilisées par un seul des biopolymères, l'émulsification a été réalisée à l'aide d'un dispositif rotor-stator (PolytronŠ) pendant 2 minutes à 15 000 rpm. Les émulsions ont ensuite été passées à l'homogénéisateur haute pression (APV invensys) pendant 5 minutes et selon 2 étapes de pression successives : 500 et 50 bars.
Dans le but d'obtenir des émulsions stabilisées simultanément par de la β-lg et de la GA, des dispersions des deux biopolymères ont été mélangées à des ratios massiques protéine : polysaccharide de 2 : 1 et de 1 : 2. Cette étape a été réalisée au dernier moment et uniquement pour la concentration de 0,5 %. Pour chacun de ces ratios, trois protocoles ont été mis au point pour la préparation des émulsions (figure 1). Le protocole 1 a consisté à réaliser l'émulsion à partir d'une phase continue de β-lg et de GA. Dans le protocole 2, une émulsion a été formée à l'aide d'une dispersion de GA, qui a été ensuite diluée par ajout d'une dispersion de β-lg. Enfin, dans le protocole 3, l'émulsion a été réalisée avec une dispersion de β-lg et ensuite diluée à l'aide d'une dispersion de GA. La méthode de fabrication était identique à celle décrite ci-dessus (ultraturax et homogénéisateur) et la dilution par la dispersion de l'un ou l'autre des biopolymères a été réalisée par simple agitation manuelle (retournement) afin de minimiser la perturbation du système.

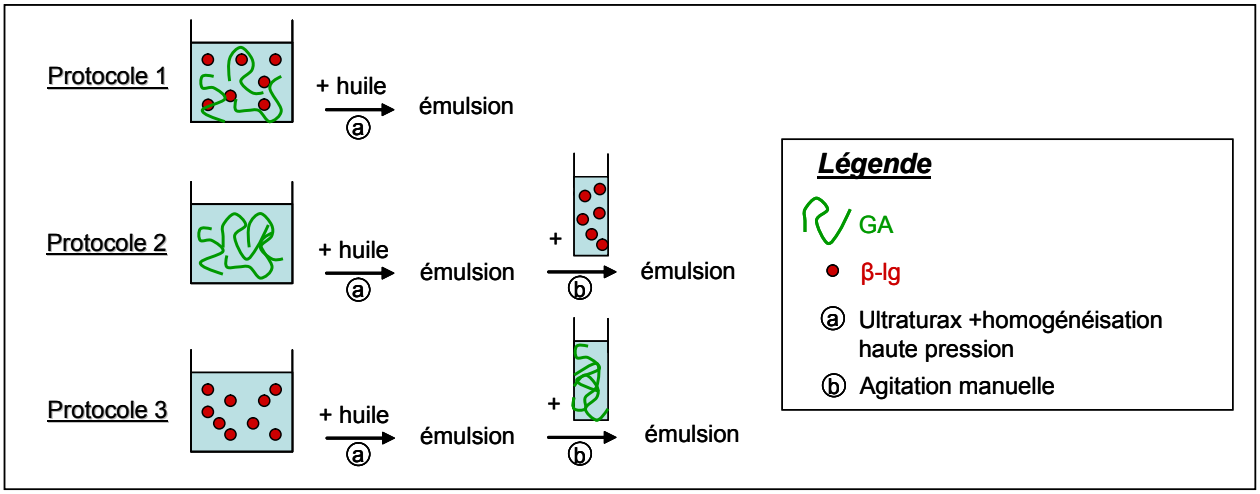


Figure 1 : Représentation schématique des 3 protocoles de préparation des émulsions stabilisées par le mélange β-lg : GA à 0,5 % et aux ratios 2 : 1 et 1 : 2.

2.4 Caractérisation des dispersions et des émulsions

Les différentes dispersions et les émulsions, lorsqu'elles étaient stables pendant au moins 24 h, ont été caractérisées par les techniques décrites ci-dessous. Toutes les mesures ont été réalisées le premier jour de stabilité (J1) et trois fois pour chaque échantillon, à l'exception de l'analyse au Turbiscan.

2.4.1 Evaluation de la stabilité des émulsions

L'évaluation de la stabilité des émulsions a été réalisée par des observations macroscopiques, en notant l'apparition d'un éventuel déphasage. Une étude plus précise a également été menée à l'aide d'un Turbiscan MA 2000. Cette technique consiste à placer 5 à 6 mL d'émulsion dans un tube et à suivre les intensités de transmission et de rétrodiffusion en fonction de la hauteur du tube, permettant ainsi de détecter le moindre déphasage. Ces analyses ont été réalisées à J1, J2, J7 et pour les émulsions les plus stables à J17 et J20.

2.4.2 Détermination de la taille des globules

La taille des globules des émulsions a été étudiée grâce à deux techniques différentes : la diffraction laser et la diffusion dynamique de la lumière.

a) Diffraction laser

Nous avons utilisé un granulomètre laser Coulter LS 230, possédant un laser solide à l'arsenure de gallium d'une longueur d'onde de 750 nm. La cellule de mesure utilisée permet de fonctionner en module micro volume de 15 mL. De l'eau MilliQ filtrée à 0,22 µm a été utilisée pour réaliser le blanc et pour diluer les émulsions afin d'obtenir une obscuration comprise entre 8 et 13 % permettant d'éviter les phénomènes de diffusion multiple. L'appareil permet alors d'accéder à une distribution de taille des globules en volume et au diamètre moyen en volume (D_m).

b) Diffusion dynamique de la lumière

Cette caractérisation a été effectuée à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Angleterre). La mesure des fluctuations d'intensité diffusée à 90° a permis d'obtenir le rayon hydrodynamique (R_h) des globules. Avant leur analyse, les émulsions ont été diluées au 1/6ème à l'aide d'eau MilliQ filtrée à 0,22 µm afin d'éviter la diffusion multiple.

2.4.3 Mesure du potentiel zêta

Les mesures de mobilité électrophorétique ont également été réalisées à l'aide du Zetasizer Nano ZS 90. La mobilité électrophorétique est déterminée en appliquant la théorie de von Smoluchowski modifiée par Henry [19]. Le potentiel zêta (ζ) peut ensuite être calculé par l'application de l'équation de Henry. Les mesures ont été réalisées à 25°C, sur des dispersions de β-lg, de GA et des mélanges β-lg : GA aux ratios 2 : 1 et 1 : 2 ; ainsi que sur les émulsions. Ces dernières étaient diluées au 1/6ème dans de l'eau MilliQ filtrée à 0,22 µm.

2.4.4 Etude du comportement rhéologique

Le comportement rhéologique des émulsions a été étudié à T = 25,00 ± 0,01°C, en écoulement à contrainte imposée à l'aide du rhéomètre HAAKE Rhéo Stress RS600 (Thermo Electron Corporation) équipé d'une géométrie cône/plan (cône : 60 mm, 1° ; troncature : 0,052 mm). La régulation de température était assurée par un système de diodes Peletier (UTC RS 600). Le protocole établi consiste à faire varier la contrainte de cisaillement de 0 à 1 Pa pendant 180 s.
Le comportement rhéologique des dispersions a été analysé à l'aide d'un rhéomètre HAAKE Roto Visco RV 1 (Thermo Electron Corporation) équipé d'une géométrie de mesure de cylindres co-axiaux Z 41 (hauteur : 55,000 mm, entrefer : 3,000 mm au fond, 1,980 mm sur les côtés), permettant ainsi l'obtention de meilleures mesures de viscosité en raison de valeurs proches de la viscosité de l'eau. Le protocole suivi est le même que pour l'analyse des émulsions au RS 600 mais en travaillant en vitesse de cisaillement imposée de 0 à 400 s^{-1} pendant 180 s.

2.4.5 Mesure de la tension interfaciale

Des mesures de tension interfaciale ont été réalisées à 25°C, à l'aide d'un tensiomètre à goutte (Drop Shape Analyzer DSA 100, Krüss) muni d'une aiguille de diamètre 1,827 mm. Les différents systèmes étudiés étaient : eau/huile, dispersion aqueuse β-lg à 0,5 %/huile et dispersion aqueuse GA à 0,5 %/huile, à pH 4,2 pour les deux dispersions.
Un tensiomètre à lame de Wilhelmy (Digital tensiometer K10ST, Krüss) a également été utilisé pour mesurer la tension interfaciale du système dispersion aqueuse β-lg : GA/huile, en fonction du temps, à la température de 23°C. La mesure du zéro a été effectuée par immersion totale de la lame de platine dans l'huile d'amande douce. 8 mL d'une dispersion de β-lg à 2,5 % (m/m) ont été placés dans un cristallisoir à bec. La lame a été happée par la surface du liquide et l'huile d'amande douce a ensuite été ajoutée délicatement au-dessus de façon à recouvrir totalement la lame (figure 2). La tension interfaciale a été enregistrée en continu à l'aide d'un enregistreur (Sefram Instrument Systems 8210). Lorsque la valeur de tension interfaciale s'est stabilisée (après environ 3 h), 660 µL d'une dispersion de GA à 30 % (m/m) ont été ajoutés à la phase aqueuse sans agitation, par le biais du bec du cristallisoir, en prenant garde à ce que la lame ne se décroche pas. Les mesures de tension interfaciale ont ensuite été enregistrées pendant 18 h.

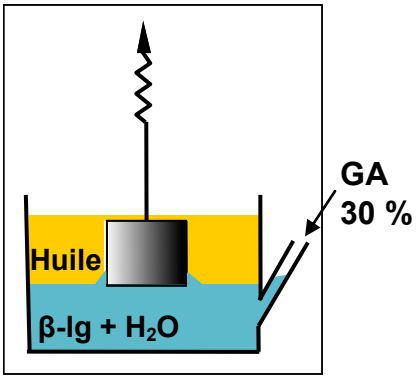


Figure 2 : Représentation schématique du système de tensiomètre à lame de Wilhelmy pour la mesure de la tension interfaciale du système β-lg : GA/huile d'amande douce

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Caractérisation des dispersions de biopolymères

Les valeurs de potentiel zêta obtenues pour les dispersions de β-lg, GA et les mélanges β-lg : GA aux ratios 2 : 1 et 1 : 2 sont respectivement d'environ + 20, - 25, - 16 et - 23 mV. Ces valeurs sont en accord avec le pI de la β-lg et le pKa de la GA.
Le potentiel zêta des solutions mixtes de β-lg et de GA est négatif et proche de la valeur de la dispersion de GA seule. Ceci montre une certaine prédominance de la GA sur la β-lg qui peut s'expliquer par la taille importante de la gomme et/ou par la façon dont la complexation s'effectue entre les biopolymères, entraînant une disposition de la gomme autour de la protéine [5]. Il est également à noter que le potentiel zêta est plus négatif lorsque le ratio est en faveur de la GA.

Les mesures rhéologiques réalisées sur ces dispersions ont montré un comportement newtonien, aussi bien pour les biopolymères seuls que pour les mélanges protéine-polysaccharide.

3.2 Caractérisation des émulsions

3.2.1 Emulsions stabilisées par de la β-lactoglobuline

Les émulsions stabilisées par la β-lg seule restent stables au-delà de 24 h (tableau I). La taille de leurs globules étant très faible, la mesure du diamètre moyen n'a pu être effectuée au granulomètre laser, en raison de la limite de résolution de cet appareil. La très faible valeur du rayon hydrodynamique déterminée par la technique de diffusion dynamique de la lumière laisse, quant à elle, planer le doute sur la nature des objets analysés (globules ou la protéine elle-même).
Comme la taille des globules et pour la même raison technique, le potentiel zêta des émulsions n'a pu être mesuré, mais il est supposé positif car la charge globale de la β-lg au pH étudié est théoriquement positive.
Les émulsions ont montré un comportement rhéologique newtonien avec une viscosité de l'ordre de 1 mPa.s comparable à celle des dispersions de β-lg (résultats non montrés).

3.2.2 Emulsions stabilisées par de la gomme arabique

La GA n'a pas permis d'obtenir des émulsions stables pendant au moins 24 h (tableau I). Le déphasage observé est probablement lié à des concentrations insuffisantes de GA. En effet, des émulsions stables ont pu être obtenues, mais avec des concentrations plus élevées de GA (2,5 et 5 %) dans la phase aqueuse (résultats non montrés). L'augmentation de la concentration en GA aurait pour

conséquence l'augmentation du nombre de molécules adsorbées à l'interface formant un film protecteur autour des globules [16].

3.2.3 Emulsions stabilisées par le mélange β-lactoglobuline et gomme arabique

Des dispersions de β-lg et de GA à 0,5 % et au pH 4,2 ont été utilisées pour la réalisation d'émulsions suivant les protocoles 1, 2 et 3.

Les protocoles 1 et 2 n'ont pas permis d'obtenir d'émulsion stable quel que soit le ratio β-lg : GA. Il est probable que dans le cas du protocole 1, le mélange préalable des dispersions avant la formulation de l'émulsion entraîne la formation de complexes peu efficaces pour former un film interfacial. Dans le cas du protocole 2, la première émulsion est réalisée avec la GA seule puis la β-lg est ajoutée. Or, dans l'expérience décrite au 3.2.2, la GA à 0,5 % n'a pas permis de stabiliser l'émulsion. Si elle s'adsorbe, sa concentration est insuffisante pour former un film efficace. La composition chimique de la gomme laisse cependant penser qu'elle pourrait s'adsorber partiellement à l'interface et formerait une barrière vis-à-vis de la β-lg, dont l'accès à l'interface serait alors limité, voire interdit. Comme l'agitation est faible, elle ne favoriserait pas la diffusion de la protéine vers l'interface, ni la désorganisation de la barrière de GA. Il est également possible que, comme dans le protocole 1, la β-lg se complexe à la GA non adsorbée et perde de son activité de surface. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en formulant des émulsions avec une concentration plus importante de GA puis en ajoutant la β-lg.

Le protocole 3, quant à lui, n'a permis d'obtenir une émulsion stable pendant plus de 24 h qu'avec le ratio β-lg : GA 2 : 1. Le ratio 1 : 2 n'apporte sans doute pas suffisamment de β-lg lors de la formation de l'émulsion initiale pour permettre la stabilisation de l'émulsion. Apparemment, l'ajout de GA n'a pas permis de compenser l'insuffisance de β-lg à l'interface.
L'émulsion stable obtenue avec le ratio 2 : 1 a été comparée à celle réalisée à l'aide de la β-lg seule (tableau I).
Le potentiel zêta de cette émulsion stabilisée par le mélange des 2 biopolymères est de - 32 mV, valeur bien plus négative que celle du mélange des dispersions dans des conditions identiques (- 16 mV). Or cette émulsion a tout d'abord été formée à l'aide de la β-lg, chargée positivement à pH 4,2. Le potentiel zêta de cette première émulsion (non mesurable) était donc vraisemblablement positif. La dilution de cette émulsion à l'aide de la GA a donc entraîné un changement radical du potentiel zêta vers des valeurs non seulement négatives, mais bien plus encore que celle de la dispersion de GA seule, alors que le ratio β-lg : GA, de 2 : 1 n'était pas en faveur de la GA. Cette observation inattendue montre que l'association des deux biopolymères, dans des conditions particulières, conduit à la formation d'un système nouveau, aux propriétés spécifiques.
L'analyse rhéologique de cette émulsion a mis en évidence un comportement rhéologique non newtonien. Le modèle de Bingham décrit par l'équation 1 a pu être utilisé pour évaluer la contrainte de cisaillement seuil et la viscosité plastique :

$$\tau = \tau_0 + \eta_p \dot{\gamma} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

où τ est la contrainte de cisaillement, τ_0 la contrainte de cisaillement seuil, η_p la viscosité plastique et $\dot{\gamma}$ la vitesse de cisaillement. La contrainte seuil obtenue est de l'ordre de 0,7 Pa et la viscosité plastique de l'ordre de 1,8 mPa.s.
Les dispersions de β-lg : GA et les émulsions stabilisées par la β-lg ayant un comportement newtonien (respectivement paragraphes 3.1 et 3.2.1), il y a probablement interaction des biopolymères avec l'interface des globules huileux entraînant une modification de la rhéologie.

Tableau I : Principaux résultats obtenus lors de la caractérisation des émulsions.

Caractérisation	**Emulsions**			
	β-lg (0,5 et 1 %)	**GA** (0,5 et 1 %)	**β-lg : GA Pr 1 et 2**	**β-lg : GA Pr 3** ratio 2 : 1 (0,5 %)
Stabilité	> 24 h	< 24 h	< 24 h	> 24 h
D_m (µm)	nd	nd	nd	~ 11 et 40 polydispersité
R_h (nm)	~ 4			~ 126
ζ (mV)	non mesurable			~ - 32
Rhéologie	newtonien η ~ 1 mPa.s			Bingham τ_0 ~ 0,7 Pa, η_p ~ 2 mPa.s

Pr : protocole
nd : non déterminé
τ_0 : contrainte de cisaillement seuil
η_p : viscosité plastique

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à la localisation de la GA dans l'émulsion (figure 3) : (a) libre dans la phase continue (hypothèse 1), (b) co-adsorbée à l'interface des gouttelettes en déplaçant ou non des molécules de β-lg (hypothèse 2), ou encore (c), liée par des interactions électrostatiques attractives, à la couche de β-lg elle-même adsorbée à l'interface huile/eau (hypothèse 3). Dans cette dernière hypothèse, la GA neutraliserait et inverserait probablement la charge de surface des globules comme cela a été observé dans le cas des émulsions stabilisées par des multicouches de polyélectrolytes [20].

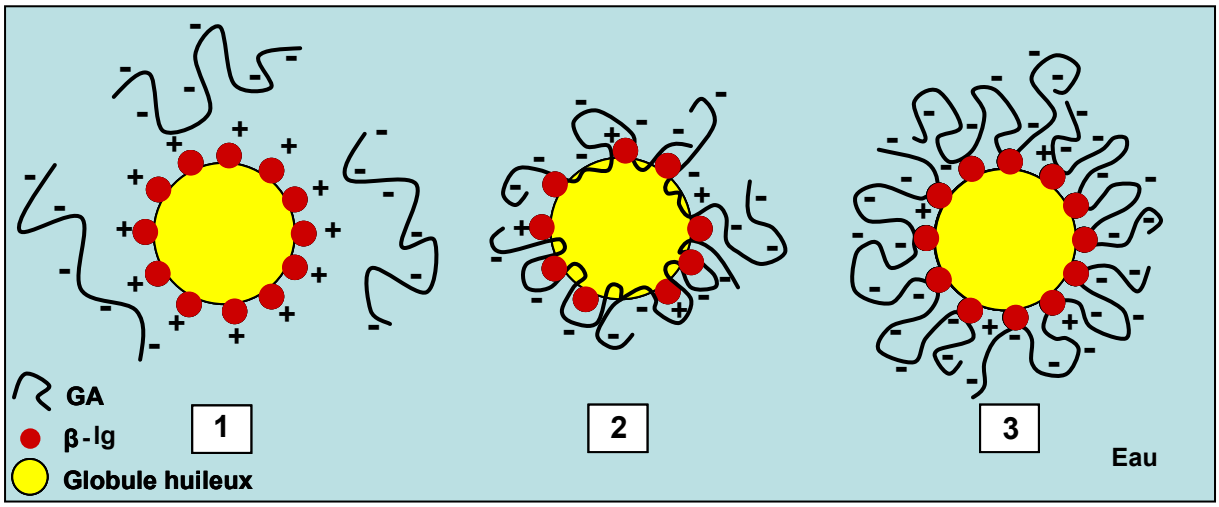


Figure 3 : Représentation schématique des 3 hypothèses de localisation de la GA, lorsqu'elle est additionnée dans la phase continue d'une émulsion formée initialement par la β-lg.

L'hypothèse 1 peut être éliminée en raison des interactions électrostatiques attractives qui se produisent certainement à pH 4,2 entre les deux biopolymères. Les deux autres hypothèses restent plausibles, quoique la faible stabilité de l'émulsion préparée avec le ratio 1 : 2 par le protocole 3 et celle des émulsions préparées par le protocole 1 laissent penser que la co-adsorption de GA et de β-lg à l'interface, par adsorption successive ou sous forme de complexe déjà formé, si elle a lieu, n'est pas très efficace. De plus, il faut considérer la présence possible dans la phase continue des biopolymères libres en excès et des complexes β-lg : GA.
La mesure de la tension interfaciale nous a permis d'obtenir des informations supplémentaires sur l'organisation interfaciale.

3.3 Mesures de tension interfaciale

La mesure de la tension interfaciale à l'aide du tensiomètre à goutte nous a permis de mettre en évidence que la β-lg abaisse nettement la tension interfaciale huile/eau (de 21 à 12 mN/m), alors que la GA est sans effet. Cependant, Dickinson et *al.* [21] ont montré que la GA est capable de s'adsorber à l'interface et que cette adsorption se fait plus particulièrement par la partie protéique de la fraction arabinogalactane-protéine (AGP) de la gomme. Le phénomène de coalescence est alors empêché par la partie hydrophile du polymère qui forme une barrière stérique autour des globules huileux. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la non-concordance des résultats. La première est liée à la composition de la gomme. En effet, la GA est un produit d'origine naturelle dont la composition et les caractéristiques sont variables, car elles dépendent de la méthode d'obtention du polysaccharide, de son origine géographique, de l'espèce dont il est extrait, etc. Il serait donc intéressant de caractériser la GA que nous avons utilisée, pour déterminer notamment la proportion de fraction AGP puisque c'est elle qui serait responsable de l'adsorption de la GA à l'interface. La seconde hypothèse est liée à la façon dont la tension interfaciale est mesurée. Si le tensiomètre à goutte semble à priori le plus adapté à l'étude de

l'interface huile/eau, les mesures réalisées immédiatement après formation des gouttes sont peut-être trop prématurées pour voir l'effet réel de la GA sur la tension interfaciale. En effet, la GA est un polymère de masse molaire élevée qui a besoin de temps pour diffuser vers l'interface et se réarranger de façon à stabiliser les émulsions. Pour caractériser son comportement interfacial, il serait préférable de réaliser des mesures sur une période plus longue.

Nous avons également utilisé un tensiomètre à lame de Wilhelmy dans des conditions correspondant au protocole 3. La tension interfaciale huile/eau en présence de β-lg seule est voisine de 10 mN/m au début de l'expérience et évolue au cours du temps vers des valeurs plus faibles. La figure 4 montre que l'ajout de GA au système, après 200 min, ne modifie pas l'aspect de la courbe d'évolution de la tension. Il ne fait apparemment pas varier la tension interfaciale, ce qui signifie que la gomme ne déplace vraisemblablement pas la β-lg de l'interface pour s'y adsorber, et ce même sur un temps de mesure de plus de 16 h. Ce résultat nous permet de réfuter l'hypothèse 2 émise au paragraphe 3.2.3. Ainsi, la troisième hypothèse semble être celle qui convient le mieux pour modéliser la manière dont la GA s'organise autour des globules.
Néanmoins, il serait intéressant de mesurer la tension superficielle des mélanges de biopolymères et de procéder à l'expérience inverse en ajoutant de la β-lg à la solution de GA, tout en mesurant la tension interfaciale en continu sur une longue période de temps.

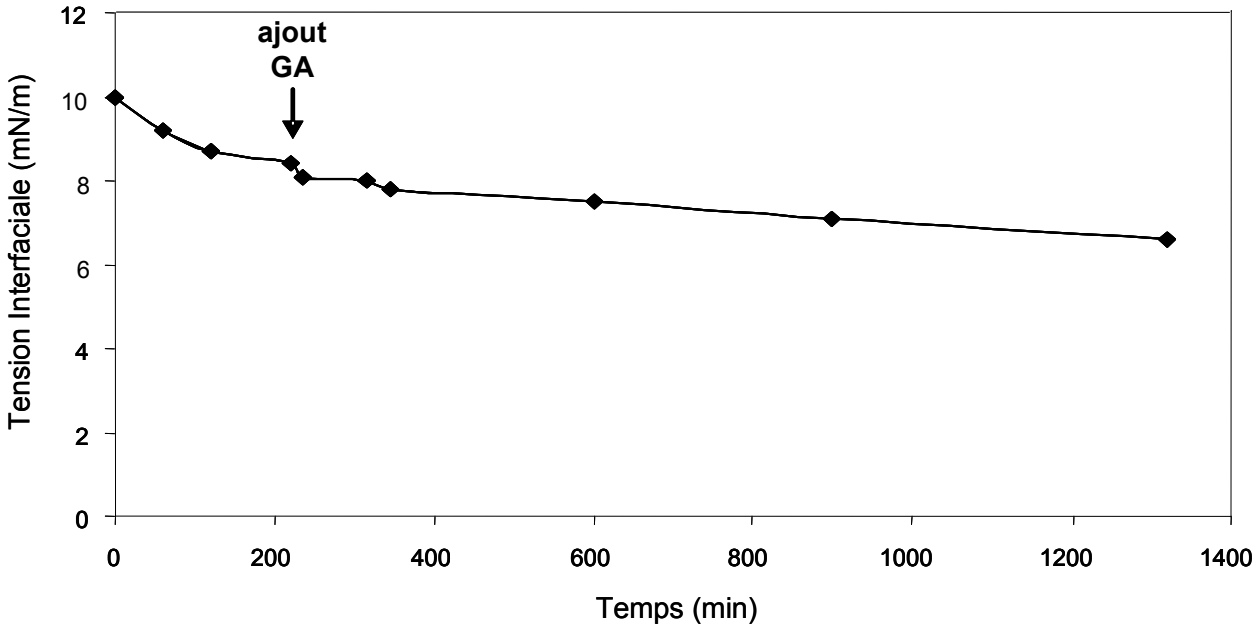


Figure 4 : Evolution de la tension interfaciale en fonction du temps pour le système eau β-lg 2,5 %/huile avant puis après l'ajout d'une dispersion de GA en phase aqueuse.

4. CONCLUSION

L'objectif de ce travail était de formuler et de caractériser des émulsions simples huile dans eau d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique stabilisées par de la β-lactoglobuline, de la gomme arabique ou des mélanges β-lg : GA.

Ce travail a permis de montrer tout d'abord qu'il n'a pas été possible d'obtenir d'émulsion stabilisée uniquement par la GA lorsque la concentration en biopolymère dans les dispersions aqueuses était de 0,5 et 1 %. Pour les concentrations de 2,5 et 5 %, les émulsions formulées n'ont pas déphasé.
Dans le cas de la β-lg, l'obtention d'émulsions stables a nécessité l'utilisation d'un homogénéisateur haute pression dont le rôle est de diminuer la taille des globules. Cette démarche nous a ainsi permis de stabiliser des émulsions avec de faibles concentrations de β-lg (0,5 et 1 %).
Enfin, nous avons tenté de réaliser des émulsions stabilisées par des mélanges de β-lg et de GA. L'objectif était d'améliorer la stabilité des émulsions par rapport à celles ne contenant qu'un seul biopolymère, en mettant à profit les interactions électrostatiques prévisibles à pH 4,2, pH auquel la protéine et le polysaccharide ont des charges globales opposées. Deux ratios massiques β-lg : GA ont été testés : 2 : 1 et 1 : 2. Trois protocoles de préparation de ces émulsions ont été évalués. L'émulsion la plus stable a été obtenue par ajout de GA à la phase continue d'une émulsion préalablement stabilisée par la β-lg selon un ratio 2 : 1 en faveur de la protéine. L'ensemble des analyses a permis de proposer un mécanisme de stabilisation de l'émulsion dans lequel seule la protéine est adsorbée à l'interface huile/eau et la GA se lie à la couche de β-lg par des interactions électrostatiques.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives quant à la possibilité de stabiliser des émulsions par un système couche par couche. La stabilisation des globules s'effectuerait alors grâce à des multicouches de polyélectrolytes qui permettraient une meilleure résistance aux stress environnementaux [20].

De nombreuses hypothèses ont été émises, et il serait intéressant de réaliser certaines études complémentaires afin de les confirmer ou non. Ainsi, la stabilité d'une émulsion réalisée suivant le protocole 2 avec une concentration plus importante de GA serait à évaluer. Des mesures supplémentaires de tensions superficielle et interfaciale seraient nécessaires pour caractériser les systèmes qui n'ont pu l'être lors de cette étude et étayer notre hypothèse de localisation des biopolymères aux interfaces. Enfin, des mesures de rhéologie interfaciale seraient intéressantes pour préciser le mécanisme de stabilisation de la GA.

5. REFERENCES

1. Canselier J.P. et Poux M., *Techniques de l'Ingénieur*, Paris, J2152 (2004)

2. Dickinson E., *Journal of Dairy Science*, **80** (1997) 2607-2619

3. Dickinson E., *Food Hydrocolloids*, **17** (2003) 25-39

4. Hambling S.G., Mc Alpine A.S., Sawyer L. dans Advanced Dairy Chemistry vol.1 : Proteins, Fox P.F. éd. Elsevier Science Publishers Ltd., pp. 141-190, Londres, 1992

5. Schmitt C., Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine (2000)

6. Sawyer L., Kontopidis G., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1482** (2000) 136-148

7. Garti N., *Journal of Dispersion Science and Technology,* **20** (1999) 327-355

8. Mc Namee B.F., O'Riordan E.D., O'Sullivan M., *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **46** (1998) 4551-4555

9. Sanchez C., Renard D., Robert P., Schmitt C., Lefebvre J., *Food Hydrocolloids*, **16** (2002) 257-267

10. Yadav M.P., Igartuburu J.M., Yan Y., Nothnagel E.A., *Food Hydrocolloids*, **21** (2007) 297-308

11. Buffo R.A., Reineccius G.A., Oehlert G.W., *Journal of Food Engineering*, **51** (2002) 341-345

12. Duvallet S., Fenyo J.C., Vandevelde M.C., *Polymer Bulletin*, **21** (1989) 517-521

13. Renard D., Lavenant-Gourgeon L., Ralet M.C., Sanchez C., *Biomacromolecules*, **7** (2006) 2637-2649

14. Islam, A.M., Phillips G.O., Sljivo A., Snowden M.J., Williams P.A., *Food Hydrocolloids*, **11** (1997) 493-505

15. Kravtchenko T. P. dans Food Ingredients Europe, Conference Proccedings, Miller Freeman éd., pp. 56-60, Maarssen (The Netherlands), 1997

16. Akiyama E., Kashimoto A., Fukuda K., Hotta H., Suzuki T., Kitsuki T., *Journal of Colloid and Interface science*, **282** (2005) 448-457

17. Mekhloufi G., Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine (2005)

18. Mekhloufi G., Sanchez C., Renard D., Guillemin S., Hardy L., *Langmuir* **21** (2005) 386

19. Hunter R.J. dans Foundations of Colloid Science, vol 1., Hunter R.J. éd., pp. 494-536, New York, 1986

20. Guzey D., McClements D.J., *Advances in Colloid and Interface Science,* **128-130** (2006) 227-248

21. Dickinson E., Elverson D.J., Murray B.S., *Food Hydrocolloids,* **3** (1989) 101-114

◆ RÉSUMÉ :

L'objectif de cette étude a été de formuler et de caractériser des émulsions simples huile/eau d'intérêt pharmaceutique stabilisées par de la β-lactoglobuline (β-lg), de la gomme arabique (GA), de la gomme xanthane (GX) et des mélanges β-lg : GA et β-lg : GX. Les stabilités des émulsions obtenues ont pu être classées par ordre croissant : GA 2,5 % < β-lg : GA 2,5 % < β-lg 2,5 % < GX 1 % = β-lg : GX 1 %. Plusieurs mécanismes de stabilisation ont été mis en évidence. La β-lg et la GA sont toutes deux capables de s'adsorber à l'interface des globules huileux alors que la GX augmente la viscosité de la phase continue aqueuse. L'association β-lg : GA conduit à la formation d'une double couche interfaciale stabilisante.

◆ MOTS CLÉS :

Emulsion, stabilisation, β-lactoglobuline, gomme arabique, gomme xanthane, complexes, adsorption couche par couche, tension interfaciale, rhéologie interfaciale, microscopie confocale à balayage laser.

◆ LABORATOIRE DE RATTACHEMENT :

Laboratoire de Physique Pharmaceutique (Equipe 3) - UMR CNRS 8612 Physico-chimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie. Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11 - 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex.

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex