



Microencapsulation par coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia

Delphine Ach

► To cite this version:

Delphine Ach. Microencapsulation par coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia. Génie chimique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10186 . tel-01127432

HAL Id: tel-01127432

<https://theses.hal.science/tel-01127432>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale de Chimie de Lyon

Pour l'obtention du
DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité Chimie

Soutenue publiquement le 6 octobre 2014

Par
Delphine ACH

Microencapsulation par coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia

Directeur de thèse : Monsieur Yves CHEVALIER

Jury : Professeur Marie-Alexandrine BOLZINGER
Professeur Stéphanie BRIANCON
Monsieur Guy BROZE
Professeur Odile CHAMBIN
Monsieur Yves CHEVALIER
Professeur Denis PONCELET

Présidente du jury
Co-directeur de thèse
Co-encadrant de thèse
Rapporteur
Directeur de thèse
Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ces trois années de thèse ont été l'occasion de nombreuses rencontres et collaborations, il convient donc de commencer ce manuscrit par des remerciements envers toutes les personnes ayant collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Ce travail de recherche s'est déroulé au sein du LAGEP. Je remercie donc son directeur, Hatem FESSI, pour m'avoir permis d'y effectuer ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes directeurs de thèse, Yves CHEVALIER et Stéphanie BRIANCON, pour leur encadrement durant ces trois années et quelques mois... Je les remercie pour m'avoir confié ce projet de recherche, pour leurs conseils expérimentaux et rédactionnels, ainsi que pour l'autonomie qu'ils m'ont laissée, me formant ainsi à la recherche.

Je remercie également Yves MOREELS, Directeur Technique, et Alain GERMEAU, Directeur de la Recherche & Développement pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ces travaux de recherche en collaboration avec Prayon. Je tiens à remercier tout particulièrement Guy BROZE, Chargé de Recherche Sénior et Responsable du projet Nutrition, pour avoir co-encadré ce projet de recherche.

Je remercie Mme Odile CHAMBIN et Mr Denis PONCELET, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, et Mme Marie-Alexandrine BOLZINGER, pour faire partie du jury de thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans diverses collaborations. J'exprime toute ma reconnaissance à Vincent DUGAS pour m'avoir initiée à l'électrophorèse capillaire ; Olivier MARCILLAT pour m'avoir fait revoir l'électrophorèse SDS-PAGE et pour m'avoir fait découvrir la fluorimétrie ; Alain RIVOIRE et Jean-Marc GALVAN pour la réalisation des suivis *in situ* avec la sonde vidéo; Sandra BALVAY pour les analyses sur lecteur de plaques, François PUEL pour ses précieux conseils concernant l'étude du procédé d'émulsification.

Un grand merci aussi aux stagiaires que j'ai encadré au cours de cette thèse : Aurélie, Yan-Siong, Séverine, Marine, Laure, Coraline, Elodie, Romy et Yali. Je les remercie pour le travail expérimental réalisé ainsi que pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à ce projet !

Je remercie chaleureusement tous les membres du LAGEP et plus particulièrement Nadia, Jean-Pierre et Jocelyne, pour leur bonne humeur, leur disponibilité et leur soutien. Je pense aussi à toutes les personnes rencontrées en salle conviviale avec qui j'ai passé d'agréables moments. Une pensée particulière pour les occupants du bureau G203 qui se sont succédés durant ma thèse : Sami, Basile, Audrey, Géraldine, Faïza, Jessica et Laure (les dernières qui auront subis le stress de la rédaction mais

qui ont réussi à maintenir une bonne humeur quotidienne dans le bureau!). Une pensée pour les collègues thésards qui n'ont pas encore terminé : Fabrice, Barth, Angèle... Un merci aussi à mes partenaires de footing du midi Vincent, Zig et Seb, qui m'ont permis de conserver un esprit sain dans un corps sain! Et enfin un gros merci à Manelle, ma binômette de TP, ma partenaire de course, pour avoir partagé les bons et les mauvais moments pendant 3 ans, que de souvenirs au labo et en dehors...

Je pense également aux personnes que j'ai côtoyées à l'ISA lors de mes expérimentations en électrophorèse capillaire, plus longues que prévues : Claire DEMESMAY, Racha et Audrey.

Je remercie aussi l'équipe Nutrition d'Engis : Carl SZÖCS, Anne-Cécile RIHON, Antoinette PRESTI, Audrey LERUITE et Adeline NAVARRO pour avoir participé à l'avancement de ce projet ainsi que pour leur accueil chaleureux lors de mes visites en Belgique. Une petite pensée pour Claire avec qui j'ai passé d'agréables soirées à Liège.

Enfin je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement mes parents et ma Riri, pour leur soutien sans faille durant ces longues années d'études. Même si vous avez plus ou moins compris ce que j'ai fait durant ces trois années, vous m'avez toujours encouragée, surtout dans la phase finale... Et merci à Sébastien, pour être à mes côtés, pour sa patience lors des moments de stress et de doutes, pour avoir essayé de me faciliter la vie durant ces derniers mois, et pour avoir spontanément proposé de me relire au cours de la rédaction. Cette thèse est un peu la vôtre !

Thèse industrielle, contrat CIFRE entre le LAGEP et Prayon

Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP)

Université Lyon 1 - LAGEP

43 Boulevard du 11 novembre 1918

Bâtiment CPE-308G

69622 Villeurbanne Cedex



Prayon

Rue J. Wauters 144

4480 Engis

Belgium



Résumé

Ce travail porte sur l'étude de la microencapsulation d'huile de lin par coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia. Il se focalise sur la coacervation des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia en milieu aqueux ainsi que sur les mécanismes impliqués dans la formation des microcapsules par coacervation complexe.

La coacervation complexe est un phénomène de séparation de phase associative induit par des interactions électrostatiques entre deux polymères. Le couple de polymères le plus utilisé en coacervation complexe est le système gélatine/gomme d'acacia. Cependant, pour des raisons sanitaires et religieuses, l'utilisation de la gélatine devient controversée pour les applications alimentaires. Un substituant intéressant à la gélatine est constitué par les protéines du lactosérum ainsi que leur composant majoritaire, la bêta-lactoglobuline. L'étude de la composition du coacervat du système protéines du lactosérum/gomme d'acacia a été réalisée lors de ce travail. L'électrophorèse capillaire sur gel a été employée afin de quantifier la bêta-lactoglobuline et l'alpha-lactalbumine dans le coacervat. L'influence du ratio protéine/polysaccharide et du pH sur la composition du coacervat a été étudiée.

Bien que le procédé d'encapsulation par coacervation complexe soit connu depuis de nombreuses années, les mécanismes conduisant à la formation des microcapsules restent peu décrits. Le procédé d'encapsulation par coacervation complexe conduisant à la formation des microcapsules est composé de plusieurs étapes nécessitant chacune d'être examinée. L'étape d'émulsification a lieu en régime d'écoulement intermédiaire. La modélisation en régime turbulent rend compte des résultats expérimentaux et pourrait être utilisée pour une transposition d'échelle.

Le suivi *in situ* du procédé d'encapsulation par coacervation complexe a été réalisé pour la première fois lors de cette étude. Il a été réalisé au moyen d'une sonde vidéo immergée dans le réacteur agité. Cette technique a permis de relever quatre étapes successives induites par l'abaissement du pH. Les influences des paramètres physico-chimiques (ratio protéine/polysaccharide et concentration totale en biopolymères) et des paramètres liés à l'étape de coacervation sur la formation des microcapsules ont aussi été étudiées au moyen de la sonde vidéo.

Mots clés

Coacervation complexe, encapsulation, protéines du lactosérum, électrophorèse capillaire, suivi *in situ*, émulsification.

Title

Microencapsulation by complex coacervation of whey protein and acacia gum

Abstract

This work deals with the study of linseed oil microencapsulation by complex coacervation of whey proteins and acacia gum. It focuses on the coacervation of whey proteins and acacia gum in aqueous medium as well as the mechanisms involved in the formation of microcapsules by complex coacervation.

Complex coacervation is an associative phase separation phenomenon induced by electrostatic interactions between two polymers. The most widely used pair of polymers in complex coacervation is the system gelatin / acacia gum. However, the use of gelatin is a matter of controversy for food applications. An interesting alternative to gelatin consists of whey proteins and their major component, beta-lactoglobulin. An investigation of the composition of the coacervate system whey protein / acacia gum was carried out during this work. Capillary gel electrophoresis was used to quantify beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin in the coacervate. The influence of protein / polysaccharide ratio and pH on the composition of the coacervate was studied.

Although the encapsulation process by complex coacervation has been known for many years, the mechanisms leading to the formation of microcapsules are not so much described. The encapsulation process by complex coacervation leading to the formation of microcapsules includes several stages that were examined. The emulsification step takes place in the intermediate flow regime. The modeling in turbulent regime accounted for experimental results and might be used for scaling-up the process.

In situ monitoring of the encapsulation process by complex coacervation was performed for the first time in this study. It was carried out using a video probe immersed in a stirred reactor. This technique identified four successive steps induced by lowering the pH: the emulsification of the oil, the formation of the coacervate, the adsorption of the coacervate on the oil droplets, the formation of an encapsulation shell. The influence of physico-chemical parameters (protein / polysaccharide ratio and total concentration of biopolymers) and parameters related to the coacervation step on the formation of microcapsules were also studied by using the video probe.

Key words

Complex coacervation, encapsulation, whey proteins, capillary electrophoresis, *in situ* monitoring, emulsification.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
RESUME	9
ABSTRACT	11
TABLE DES MATIERES	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS	15
FIGURES.....	15
TABLEAUX	17
INTRODUCTION GENERALE	21
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART	29
1. LA COACERVATION COMPLEXE	29
1.1. <i>Rappels sur les interactions protéines/polysaccharides</i>	29
1.2. <i>Le phénomène de coacervation complexe</i>	31
1.3. <i>Etude approfondie de la coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia</i>	38
2. LA MICROENCAPSULATION PAR COACERVATION COMPLEXE	45
2.1. <i>Généralités sur la microencapsulation</i>	45
2.2. <i>La microencapsulation par coacervation complexe</i>	48
2.3. <i>Problématiques actuelles</i>	57
3. LES MATIERES PREMIERES UTILISEES POUR CETTE ETUDE	61
3.1. <i>Les protéines laitières</i>	61
3.2 <i>La gomme d'acacia</i>	62
3.3 <i>L'huile de lin</i>	62
4. BILAN	64
4.1. <i>La coacervation complexe</i>	64
4.2. <i>La microencapsulation par coacervation complexe</i>	64
REFERENCES	66
CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'INFLUENCE DES PRINCIPAUX COMPOSANTS DES PROTEINES DU LACTOSERUM SUR LES MECANISMES DE COACERVATION COMPLEXE AVEC LA GOMME D'ACACIA	79
ABSTRACT	81
1. INTRODUCTION	82
2. MATERIAL AND METHODS	85
2.1. <i>Materials</i>	85
2.2. <i>Preparation of polymers solutions</i>	85
2.3. <i>SDS-PAGE</i>	85
2.4. <i>Capillary gel electrophoresis (CGE)</i>	86
2.5. <i>Elisa quantitative analysis of casein</i>	86
2.6. <i>Whey protein isolate composition</i>	86
2.7. <i>Whey protein isolate complex coacervation</i>	87
2.8. <i>β-lactoglobulin and α-lactalbumin complex coacervation</i>	87
3. RESULTS AND DISCUSSION	87
3.1. <i>Whey protein isolate composition</i>	87
3.2. <i>Complex coacervation of whey protein isolate</i>	91
3.3. <i>β-lactoglobulin complex coacervation</i>	96

3.4. <i>α-lactalbumin complex coacervation</i>	98
4. CONCLUSION	100
REFERENCES	101
CHAPITRE 3 : LE PROCEDE D'ENCAPSULATION PAR COACERVATION COMPLEXE : ETUDE APPROFONDIE DE L'ETAPE D'EMULSIFICATION	105
ABSTRACT	107
1. INTRODUCTION	108
2. MATERIALS AND METHODS	112
2.1. <i>Materials</i>	112
2.2. <i>Preparation of emulsions</i>	112
2.3. <i>Preparation of microcapsules</i>	112
2.4. <i>Particle size distribution analysis</i>	113
2.5. <i>Microscopic observations</i>	113
2.6. <i>Viscosity measurements</i>	114
2.7. <i>Interfacial tension measurements</i>	114
2.8. <i>In situ monitoring by video probe</i>	114
3. RESULTS AND DISCUSSION	116
3.1. <i>Influence of emulsion process parameters on o/w emulsion droplets mean diameter</i>	116
3.2. <i>Evidence of formation of polynuclear microcapsules</i>	123
3.3. <i>Evidence of coacervate deposition on oil droplets</i>	125
4. CONCLUSIONS	128
REFERENCES	129
CHAPITRE 4 : LE SUIVI <i>IN SITU</i> DU PROCEDE D'ENCAPSULATION PAR COACERVATION COMPLEXE	133
ABSTRACT	135
1. INTRODUCTION	136
2. MATERIALS AND METHODS	138
2.1. <i>Materials</i>	138
2.2. <i>Preparation of polymers solutions</i>	138
2.3. <i>Video probe characteristics</i>	139
2.4. <i>Preparation of microcapsules</i>	139
2.5. <i>Microscopic observations</i>	140
2.6. <i>Particle size distribution analysis</i>	140
3. RESULTS AND DISCUSSION	141
3.1. <i>Evidence of successive steps of microencapsulation by complex coacervation</i>	141
3.2. <i>Influence of the video probe</i>	143
3.3. <i>Influence of the purification of whey proteins isolate</i>	145
3.4. <i>Influence of protein:polysaccharide ratio</i>	146
3.5. <i>Influence of biopolymers concentration</i>	147
3.6. <i>Influence of coacervation conditions</i>	148
4. CONCLUSIONS	150
REFERENCES	151
CONCLUSION GENERALE	157
ANNEXE : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL	161

Table des illustrations

Figures

Figure 1.1: Représentation schématique des différentes situations de mélanges protéine-polysaccharide en milieu aqueux [d'après McClements 2006]	30
Figure 1.2 : Schéma représentant des complexes de gomme d'acacia (ruban blanc) et de bêta-lactoglobuline (sphères rouges). Le complexe est considéré comme une nouvelle entité colloïdale [d'après de Kruif et al. 2004].	34
Figure 1.3 : Influence du pH sur le rendement de coacervation complexe dans des mélanges gélatine/gomme d'acacia à une concentration totale en polymères de 1% (ronds : gélatine A, triangles : gélatine B, les gélatines A et B diffèrent par leurs points isoélectriques) [d'après Burgess et Carless 1984].	35
Figure 1.4 : Influence de la force ionique sur le rendement de coacervation complexe dans des mélanges gélatine/gomme d'acacia à un ratio protéine/polysaccharide 1:1 (ronds : gélatine A, triangles : gélatine B) [d'après Burgess et Carless 1984].	37
Figure 1.5 : Image de coacervat de bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia (1:1) obtenue par microscopie confocale à balayage laser [d'après Schmitt <i>et al.</i> 2001]. Mise en évidence de la structure vacuolisée. Barre d'échelle = 5 µm.	41
Figure 1.6 : Représentation schématique des deux types de microparticules.	47
Figure 1.7 : Représentation schématique du procédé d'encapsulation par coacervation complexe [d'après Richard et Benoît 2013].	50
Figure 1.8 : Représentation des trois types de capsules pouvant être obtenus par coacervation complexe [d'après Lemetter <i>et al.</i> 2009]. Photographies d'expérimentations réalisées durant la thèse.	52
Figure 1.9 : Particules d'alcool stéarique présentant une encapsulation incomplète par le coacervat gélatine/gomme d'acacia [d'après Madan <i>et al.</i> (1972)].....	53
Figure 1.10: Huile essentielle d'orange encapsulée par du coacervat complexe WP/GA (a : grosses gouttes (50-200 µm) obtenues par agitation magnétique ; b : petites gouttes (5-50 µm) obtenues avec un homogénéisateur rotor/stator [d'après Weinbreck <i>et al.</i> 2004f].	54
Figure 1.11 : Fraction polysaccharidique de la gomme d'acacia : représentation Wattle Blossom [d'après Thevenet 2009].	62
Figure 2.1: SDS-PAGE electrophoresis gel of whey protein isolate (β-Ig: β-lactoglobulin, α-lac: α-lactalbumin, BSA: bovine serum albumin, LF: lactoferrin).....	88
Figure 2.2 : WPI solution (5.5%) as a function of pH. Formation of precipitates between pH 5.2 and 4.1.	89
Figure 2.3: WPI electrophoregrams obtained by capillary gel electrophoresis (SDS-MW). Evidence of two peaks disappearance after acidic treatment.....	90
Figure 2.4: WPI electrophoregram obtained by capillary gel electrophoresis (SDS-MW). Identification of the peaks of β-Ig and α-lac.	91
Figure 2.5: WPI/AG complex coacervation as a function of the Pr:Ps ratio (1:1, 2:1 and 4:1) and pH (between 5 and around 2.5). The turbidity apparition is represented by x and the phase separation is represented by o.....	93

Figure 2.6: Protein concentration in the supernatant as a function of pH for the Pr:Ps ratio 1:1 (A), 2:1 (B) and 4:1 (C) [blue diamonds: β -lg concentration; red triangles: α -lac concentration; dashed lines: initial proteins concentrations]. pH values are presented in descending order because experimentations were performed by decreasing the pH upon addition of hydrochloric acid.....	95
Figure 2.7: β -lg (blue) and α -lac (red) concentrations in the supernatant as a function of pH for the Pr:Ps ratios (1:1: full line, 2:1: dashed line, 4:1: dotted line).....	96
Figure 2.8: Macroscopic observations of β -lg/AG complex coacervation. Solutions at 1% polymers with Pr:Ps ratio of 2:1, between pH 6.0 and pH 2.7, after 24h of phase separation.....	97
Figure 2.9: β -lg concentration in the supernatant, after 24 h of phase separation of β -lg/AG solutions, as a function of pH for the Pr:Ps ratio 2:1. The dashed line marks the full concentration of β -lg.	98
Figure 2.10: Macroscopic observations of α -lac/AG complex coacervation. Solutions at 1% polymers with Pr:Ps ratio of 1:1, between pH 6.0 and pH 2.7, after 24 h of phase separation.	99
Figure 2.11: α -lac concentration in the supernatant, after 24h of phase separation of α -lac/AG solutions, as a function of pH for a Pr:Ps ratio of 1:1. The dashed line marks the full concentration of α -lac.....	99
Figure 3.1: Experimental set-up for the microencapsulation by complex coacervation with the <i>in situ</i> video probe.	116
Figure 3.2: Size distributions of o/w emulsions droplets prepared with a three blades marine propeller at rotation rate of 800 rpm (A) and 1,200 rpm (B). Emulsification times of 15 min (blue diamonds), 30 min (green circles), and 45 min (red triangles) are given.	118
Figure 3.3: Evidence of polynuclear microcapsules formation. A: picture of washed polynuclear microcapsules (scale bar = 300 μ m); B: comparison between emulsion droplets and microcapsules mean diameters.....	124
Figure 3.4: Microcapsules formation by complex coacervation. A to D: photographs from the video (scale bar = 300 μ m); E to H: schematic representations. A/E: formation of the emulsion; B/F: formation of the coacervate in the aqueous phase; C/G: coacervate deposition around oil droplets; D/H: final microcapsules.	127
Figure 4.1: Experimental set-up for microcapsules formation by complex coacervation with <i>in situ</i> monitoring by a video probe.	141
Figure 4.2: Photographs extracted from videos illustrating the successive steps of the encapsulation process by complex coacervation as a function of pH. Emulsion t_0 : emulsion at 1 min, Emulsion t_1 : emulsion at 20 min.....	143
Figure 4.3: Microscopic observations of the morphology of microcapsules during their formation as a function of pH. Comparison between experiments with and without the video probe.	145
Figure 4.4: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate (with or without purification). Comparison of microcapsules aspect as a function of pH.....	146
Figure 4.5: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate at three different Pr:Ps ratios. Comparison of microcapsules formation as a function of pH.	147
Figure 4.6: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate. Microcapsules formation as a function of pH at different total biopolymers concentrations (0.5, 1 and 3 %).....	148

Figure 4.7: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate at pH 3.8 (A: Stirring speed during coacervation of 500 rpm, B: stirring speed during coacervation of 250 rpm).	150
Figure 4.8: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate at pH 3.8 (A: progressive addition of acid, B: rapid addition of acid).	150

Tableaux

Tableau 1.1 : Paramètres étudiés avec les systèmes protéines du lactosérum/gomme d'acacia et bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia.	39
Tableau 1.2 : Quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire.	46
Tableau 1.3 : Propriétés physiques des protéines du lactosérum (d'après Kinghorn <i>et al.</i> 1995).	61
Tableau 1.4: Composition en acides gras de l'huile de lin [d'après Zovi 2009].	63
Table 3.1: Physicochemical characteristics of linseed oil and 3%(w/w) gelatin solution at 55°C: density, viscosity, surface and interfacial tension.	117
Table 3.2. Parameters of the process modeling.	117

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'encapsulation trouve ses applications dans de nombreux domaines techniques, et en particulier le domaine alimentaire où elle permet une stabilisation des matières encapsulées. L'encapsulation combine deux disciplines de manière intime : la formulation et le génie des procédés. Le développement d'un procédé d'encapsulation requiert une démarche complexe qui consiste à choisir un type de procédé, définir les matières premières utilisables, étudier leur formulation et le procédé d'encapsulation. Le procédé d'encapsulation par coacervation complexe est très attrayant par certaines de ses caractéristiques : il fait appel à une large palette de matières premières dont certaines sont d'origine naturelle ; les conditions d'application du procédé sont plutôt douces (température ambiante ou modérée, pas de séchage) ; il n'implique pas de réactions chimiques en présence des matières actives à encapsuler.

L'encapsulation par coacervation complexe est une technique déjà employée dans l'industrie alimentaire afin de protéger des ingrédients fonctionnels tels que les probiotiques, les vitamines, les antioxydants et les acides gras [Champagne et Fustier 2007]. La coacervation complexe consiste en une séparation d'une solution de deux macromolécules en deux phases liquides. La phase la plus concentrée est la phase coacervée, l'autre phase étant la solution d'équilibre [Renard et Reddy 2007]. Le principe de cette méthode est basé sur la désolvatation partielle de deux colloïdes et leur agrégation par abaissement du pH. La coacervation complexe semble par ailleurs être une technique très intéressante de micro-encapsulation, permettant d'atteindre des taux d'encapsulation élevés [Gouin 2004].

L'huile de lin est une huile riche en acides gras polyinsaturés oméga-3, indispensables pour le fonctionnement de l'organisme qui ne peut les synthétiser. Les oméga-3 sont aussi connus pour leur effet anti-inflammatoire ainsi que leur effet positif sur le système cardio-vasculaire. L'huile de lin a donc un intérêt nutritionnel et pourrait être consommée comme complément alimentaire dans le cadre d'un régime à base d'oméga-3. De plus, il semblerait que dans la majorité des pays

développés il y ait une sous-consommation d'oméga-3 ; d'où l'intérêt d'en incorporer dans l'alimentation. Cependant cette huile est fortement oxydable car elle contient de nombreuses doubles liaisons. Elle doit donc être protégée par le biais de l'encapsulation afin de pouvoir profiter des bienfaits de ses oméga-3.

Le couple de polymères le plus utilisé par le procédé de coacervation complexe est le couple gélatine/gomme d'acacia. Ce couple de polymère a d'ailleurs déjà été utilisé pour l'encapsulation d'huile riche en acides gras polyinsaturés [Lamprecht *et al.* 2001]. Cependant l'utilisation de la gélatine, d'origine animale, pour des applications alimentaires devient controversée en raison de la transmission possible de maladies, dont l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine. Un substituant intéressant à la gélatine est constitué par les protéines du lactosérum ainsi que leur composant majoritaire, la bêta-lactoglobuline. Depuis la fin des années 1990, la coacervation complexe des protéines de lait et de la gomme d'acacia a commencé à être étudiée. Les systèmes bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia et protéines du lactosérum/gomme d'acacia ont été décrits par Schmitt *et al.* (1999, 2000, 2001 et 2005) et Weinbreck *et al.* (2003, 2004a, b, c). Dans ces études, les conditions optimales de coacervation ont été identifiées. La composition et la structure du coacervat ont également été étudiées. Enfin le mécanisme de séparation de phase a été expliqué et découpé en plusieurs étapes [Sanchez *et al.* 2006, Mekhloufi *et al.* 2005]. En revanche, l'influence de la composition des protéines laitières sur la coacervation avec la gomme d'acacia n'a été que peu étudié.

Le procédé d'encapsulation par coacervation complexe est connu depuis des dizaines d'années [Green et Schleicher 1956], cependant peu d'études ont été réalisées sur la compréhension de celui-ci. L'étude de Madan *et al.* (1972) suggère deux mécanismes d'encapsulation et tente d'expliquer l'impossibilité d'encapsuler des particules de taille supérieure à 335 µm. Plus récemment, Weinbreck *et al.* (2004d) ont suggéré un mécanisme d'encapsulation différent pour les petites et les grosses gouttes. L'influence des paramètres de procédé sur la morphologie et la taille des

microcapsules, a été décrite par Lemetter *et al.* (2009). Enfin, la revue bibliographique de Dardelle et Erni (2013) apporte des informations intéressantes sur les phénomènes de mouillage contrôlant la formation des capsules. Le mécanisme de formation des capsules est donc globalement connu, mais il reste de nombreuses questions ouvertes à propos des étapes du procédé conduisant à la formation des microcapsules. Il est donc utile d'approfondir les études sur les mécanismes.

Les objectifs de ce travail de recherche sont par conséquent :

- d'encapsuler l'huile de lin par le procédé de coacervation complexe en utilisant les protéines du lactosérum et la gomme d'acacia comme polymères d'encapsulation
- de mieux comprendre les mécanismes de coacervation des protéines du lactosérum
- et de mieux comprendre les mécanismes de formation des microcapsules par coacervation complexe.

Ce manuscrit se décompose ainsi en quatre chapitres.

Le **chapitre 1** fait une synthèse de l'état de l'art sur l'encapsulation par coacervation complexe. Dans un premier temps, le phénomène de coacervation complexe est présenté de manière générale, puis les exemples concernant la coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la bêta-lactoglobuline avec la gomme d'acacia sont décrits plus en détail. Dans un deuxième temps, le procédé d'encapsulation par coacervation complexe est présenté avec ses problématiques actuelles. Les matières premières utilisées pour ce travail sont enfin brièvement présentées.

Le **chapitre 2** (*sous forme de publication*) est une étude menée dans le but de mieux comprendre le phénomène de coacervation complexe au sein du couple de polymère protéines du lactosérum /gomme d'acacia. Les protéines du lactosérum utilisées ici sont un mélange commercial appelé Prolacta, composé notamment de bêta-lactoglobuline et d'alpha-lactalbumine. L'étude de la composition du coacervat du système protéines du lactosérum/gomme d'acacia a été réalisée. L'électrophorèse capillaire sur gel a été employée afin de quantifier la bêta-lactoglobuline et l'alpha-

lactalbumine dans le coacervat. L'influence du ratio protéine/polysaccharide et du pH sur la composition du coacervat a été étudiée.

Le **chapitre 3** (*sous forme de publication*) s'intéresse à la première étape du procédé d'encapsulation, qui est l'étape d'émulsification. Pour cette étude nous avons utilisé le système gélatine/gomme d'acacia, le plus utilisé en coacervation complexe. Des analyses granulométriques et microscopiques nous ont permis d'étudier la taille des gouttes d'huile puis celle des microcapsules en fonction des conditions d'émulsification. Il a été déterminé que cette étape d'émulsification se déroulait en régime d'écoulement intermédiaire. Cependant la modélisation en régime turbulent rend compte des résultats expérimentaux et pourrait être utilisée pour une transposition d'échelle.

Le **chapitre 4** (*sous forme de publication*) décrit pour la première fois le suivi *in situ* du procédé d'encapsulation par coacervation complexe. Il a été réalisé au moyen d'une sonde vidéo immergée dans le réacteur agité. Cette technique a permis de relever quatre étapes successives induites par l'abaissement du pH. Les influences des paramètres physico-chimiques (ratio protéine/polysaccharide et concentration totale en biopolymères) et des paramètres liés à l'étape de coacervation sur la formation des microcapsules ont aussi été étudiées au moyen de la sonde vidéo.

Enfin des conclusions et perspectives sont proposées à la fin de ce manuscrit.

Références

- Champagne C.P., Fustier P. (2007), Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190.
- Dardelle G. et Erni P. (2013). Three-phase interactions and interfacial transport phenomena in coacervate/oil/water systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 206: 79-91.
- Gouin S. (2004), Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 330-347.
- Green B. K. et Schleicher L. (1956). Brevet US2730456 A. Manifold record material.
- Lamprecht A. *et al.* (2001), Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for Ω – 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. *Journal of Microencapsulation*, 18:347-357.
- Lemetter C.Y.G. *et al.* (2009). Control of the Morphology and the Size of Complex Coacervate Microcapsules During Scale-up. *AIChE Journal*, 55 (6): 1487-1496.
- Madan P.L. *et al.* (1972). Factors Influencing Microencapsulation of a Waxy Solid by Complex Coacervation. *Journal of Pharmaceutical Science*, 61 (10): 1586-1588.
- Mekhloufi G. *et al.* (2005). pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β -Lactoglobulin and Acacia Gum. *Langmuir*, 21: 386-394.
- Renard D., Reddy T. (2007), Polymère d'origine biologique pour la microencapsulation, in *Microencapsulation—Des sciences aux technologies*, Vandamme T., Poncelet D. et Subra-Paternault P. (Eds), Paris: Tec & Doc Lavoisier, 2007, 175-188.
- Sanchez C. *et al.* (2006).Complex coacervation between β -lactoglobulin and Acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299: 867-873.
- Schmitt C. *et al.* (1999). Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13:483-496.
- Schmitt C. *et al.* (2000). Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14: 403-413.
- Schmitt C. *et al.* (2001). Study of β -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 20: 267-280.
- Schmitt C. *et al.* (2005). Effect of Time on the Interfacial and Foaming Properties of β -Lactoglobulin/Acacia Gum Electrostatic Complexes and Coacervates at pH 4.2. *Langmuir*, 21: 7786-7795.
- Weinbreck F.*et al.* (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic. *Biomacromolecules*, 4:293-303.
- Weinbreck F. *et al.* (2004a). Diffusivity of whey protein and gum Arabic in their coacervates. *Langmuir*, 20: 6389-6395.
- Weinbreck F. *et al.* (2004b). Rheological properties of whey protein/gum Arabic coacervates. *Journal of Rheology*, 48 (6): 1215-1228.
- Weinbreck F. *et al.* (2004c). Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates. *Biomacromolecules*, 5: 1437-1445.
- Weinbreck *et al.* (2004d). Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. *Journal of Microencapsulation*, 21 (6): 667-679.

CHAPITRE 1 :

Etat de l'art

CHAPITRE 1 : Etat de l'art

Ce chapitre est composé de trois parties. La première partie décrit le phénomène de coacervation complexe de manière générale dans un premier temps puis examine plus en détails les systèmes protéines du lactosérum/gomme d'acacia et bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia. La seconde partie présente le procédé de microencapsulation par coacervation complexe, les paramètres l'influençant et ses problématiques actuelles. Enfin, la dernière partie présente rapidement les matières premières utilisées pour cette étude.

1. La coacervation complexe

La coacervation complexe est une séparation de phase associative qui peut être observée dans un mélange de protéine et polysaccharide en milieux aqueux. Elle donne lieu à la formation de complexes électrostatiques protéine/polysaccharide : les coacervats.

1.1. Rappels sur les interactions protéines/polysaccharides

Les protéines et les polysaccharides sont des polymères d'origine naturelle largement utilisés dans l'industrie alimentaire, notamment pour les émulsions et l'encapsulation [Matalanis *et al.* 2011; Bouyer *et al.* 2011; Jones *et al.* 2010]. Ces polymères peuvent interagir par l'intermédiaire d'interactions attractives ou répulsives, et ainsi former des systèmes monophasiques ou bi-phasiques [McClements 2006]. Dans l'eau, le mélange de protéines et de polysaccharides peut conduire à quatre situations : la formation de complexes solubles, la coacervation ou précipitation, l'incompatibilité thermodynamique et la co-solubilité (Figure 1.1).

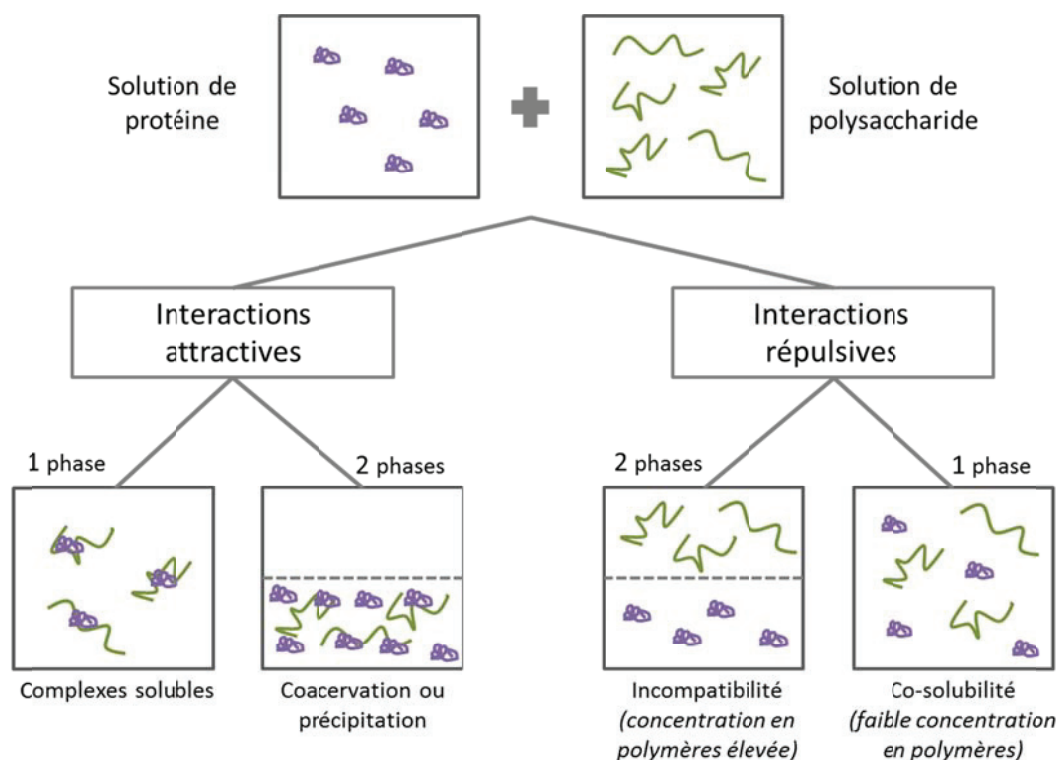


Figure 1.1: Représentation schématique des différentes situations de mélanges protéine-polysaccharide en milieu aqueux [d'après McClements 2006]

1.1.1. Les systèmes monophasiques

Deux types de systèmes monophasiques peuvent être obtenus dans un système protéine/polysaccharide. Dans le cas d'interactions attractives on peut observer la formation de complexes solubles dans la solution aqueuse. Ces complexes sont observés lorsque les deux polymères portent une charge globale négative. Le polysaccharide interagit alors avec des sites chargés positivement sur la protéine. Dans le cas d'interactions répulsives on peut observer la co-solubilité des deux biopolymères en solution aqueuse. Celle-ci apparaît généralement lorsque la concentration en protéine et en polysaccharide est faible [Dickinson 2003].

1.1.2. Les systèmes bi-phasiques

Les mélanges de biopolymères sont généralement soumis à la séparation de phase. Deux types de séparation de phase peuvent être observés : la séparation de phase ségrégative et la séparation de phase associative. La séparation de phase ségrégative intervient lorsqu'il y a une

répulsion entre la protéine et le polysaccharide. Dans ce cas la protéine et le polysaccharide sont thermodynamiquement incompatibles. Après la séparation de phase on observe une phase riche en protéine et une phase riche en polysaccharide. Les paramètres impliqués dans ce mécanisme sont le pH et la force ionique. La séparation de phase associative, ou coacervation complexe, intervient quant à elle lorsqu'il y a des interactions favorables entre une protéine et un polysaccharide de charge opposées. Ces interactions peuvent être des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes. Il se forme alors des complexes macromoléculaires solubles qui interagissent pour former des agrégats électriquement neutres, puis des gouttelettes de liquide instables ou des précipités qui sédimentent pour former la phase coacervée contenant les deux polymères. La deuxième phase est riche en solvant et pauvre en polymères [Mc Clements 2006, Turgeon *et al.* 2003, Doublier *et al.* 2000, Tolstoguzov 1997]. Ce mécanisme d'association entre protéine et polysaccharide est contrôlé par un mécanisme de régulation des charges [Da Silva et Jönsson 2009].

1.2. Le phénomène de coacervation complexe

1.2.1. Définition

La coacervation complexe est définie comme une séparation de phase liquide-liquide dans un système colloïdal, induite par des interactions électrostatiques entre deux polymères de charges opposées [IUPAC, 1997]. La phase la plus concentrée est le coacervat et l'autre phase est la solution d'équilibre. La désolvatation simultanée des deux polyélectrolytes hydrosolubles portant des charges opposées est le plus souvent provoquée par une modification de pH du milieu aqueux [Richard et Benoît 2013]. Le coacervat complexe est ainsi formé par précipitation de deux polymères de charges électriques opposées en interaction électrostatique.

Le phénomène de séparation de phase dans une solution contenant des polymères de charges opposées a été décrit pour la première fois en 1911 par Tiebackx. Puis Bungenberg de Jong (1949) a introduit le terme de coacervation complexe et a posé les bases théoriques et expérimentales du phénomène avec le système gélatine/gomme d'acacia.

1.2.2. Les modèles théoriques

Plusieurs modèles ont été proposés à partir des années 1950 pour tenter d'expliquer le phénomène de coacervation complexe.

La théorie de **Voorn et Overbeek (1957)** est basée sur les résultats expérimentaux de Bungenberg de Jong (1949) obtenus sur le système gélatine/gomme d'acacia [Overbeek et Voorn 1957]. La coacervation complexe entre la gélatine et la gomme d'acacia y est décrite comme un phénomène spontané. Ce phénomène résulte de la compétition entre les forces électrostatiques qui tendent à rapprocher les molécules chargées, et les effets entropiques qui tendent à les éloigner. Les polymères de charges opposées s'associent pour former le coacervat qui contient aussi des molécules de solvant (l'eau). La présence de solvant dans la phase coacervée contribue à augmenter l'entropie du système en favorisant les réarrangements moléculaires. Pour ces raisons le coacervat est de nature liquide et totalement réversible. Cette théorie est basée sur quelques postulats : (1) les molécules possèdent une chaîne désordonnée, (2) les interactions solvant/soluté sont négligeables, (3) la distribution des charges dans le mélange est homogène, (4) il n'y a pas d'association spécifique entre les polymères. Dans leur traitement théorique Voorn et Overbeek utilisent les équations de Debye et Hückel pour rendre compte des interactions électrostatiques et la théorie de Flory-Huggins pour ce qui concerne les effets entropiques [Overbeek et Voorn 1957]. Ainsi, dans un système binaire composé d'un solvant et d'un biopolymère, les conditions critiques de compatibilité sont atteintes lorsque $\sigma^3 r \geq 0,53$, donc lorsque la densité de charge σ et la masse moléculaire r du biopolymère sont suffisamment élevées [Schmitt *et al.* 2000a, Weinbreck *et al.* 2004a].

La théorie de **Veis et Aranyi (1960)** est fondée sur la coacervation de deux types de gélatine de charges opposées dans des conditions de faible densité de charge des biopolymères, où $\sigma^3 r < 0,53$, quand la théorie de Voorn et Overbeek n'est pas applicable [Veis et Aranyi 1960, Veis 1963, Veis *et al.* 1967]. Dans cette théorie la coacervation complexe est considérée comme un phénomène en deux étapes plutôt qu'un phénomène spontané en une seule étape. Dans un premier temps les

molécules de gélatine s'agrègent par des interactions électrostatiques pour former des agrégats neutres de faible entropie. Puis ces agrégats se réarrangent lentement afin de former la phase coacervée. Le mécanisme est conduit par l'augmentation d'entropie due à la formation du coacervat par interaction aléatoire des agrégats. De plus, le terme électrostatique de la théorie de Voorn et Overbeek est remplacé par un terme dépendant de la concentration et de la densité de charge des polymères [Schmitt *et al.* 2000a, Weinbreck *et al.* 2004a].

La théorie de **Nakajima et Sato (1972)** est basée sur la coacervation complexe entre des polymères d'alcool polyvinylique de charges opposées [Nakajima et Sato 1972]. Elle constitue une adaptation de la théorie de Voorn et Overbeek en incluant le terme d'interaction de Flory-Huggins entre les deux polymères. Les auteurs sont cependant en accord avec l'hypothèse de Voorn et Overbeek qui stipule que les charges sont réparties uniformément entre les phases diluée et concentrée [Schmitt *et al.* 2000a, Weinbreck *et al.* 2004a].

La théorie de **Tainaka (1979-1980)** est la plus récente développée pour la coacervation complexe. Elle constitue une adaptation du modèle de Veis et Aranyi. Selon Tainaka le moteur de la séparation de phase réside dans les interactions électrostatiques attractives qui sont favorisées par l'augmentation de la masse moléculaire des polymères et par l'augmentation de leur densité de charge [Tainaka 1979, 1980]. Cette théorie permet également d'expliquer le phénomène de suppression de la coacervation à forte concentration totale en biopolymères. La théorie de Tainaka est plus générale que les précédentes, elle est ainsi applicable aux systèmes à densité de charge faible et élevée. Ce modèle décrit correctement le phénomène de coacervation complexe pour un grand nombre de systèmes [Schmitt *et al.* 2000a, Weinbreck *et al.* 2004a].

1.2.3. Formation et propriétés du coacervat

La coacervation complexe est un phénomène de séparation de phase associative induit par des interactions électrostatiques entre au moins deux polymères, généralement une protéine et un polysaccharide portant des charges opposées [Cooper *et al.* 2005]. Mais d'autres interactions faibles,

telles que les liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes, peuvent contribuer à la formation de coacervats complexes [Turgeon *et al.* 2007].

Formation des complexes

La coacervation complexe se produit lorsqu'un déplacement du pH vers le point isoélectrique de l'un des deux polymères laisse les deux polymères avec des charges électriques opposées. Il se crée alors des interactions électrostatiques qui conduisent à la formation de complexes solubles neutres montrant une interaction attractive (Figure 1.2). L'association de ces complexes conduit à la formation de complexes insolubles qui forment alors des gouttes liquides composées des polymères et de molécules de solvant, le coacervat [De Kruif *et al.* 2004, Doublier *et al.* 2000, Schmitt *et al.* 1998, Tolstoguzov 1997]. D'après Arshady (1990), les gouttelettes de coacervat apparaissent tout d'abord sous forme de petites gouttes, puis ces gouttes grossissent et coalescent par la modification du pH.

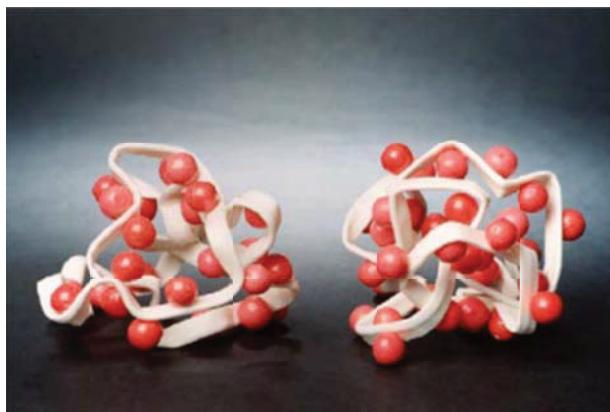


Figure 1.2 : Schéma représentant des complexes de gomme d'acacia (ruban blanc) et de bêta-lactoglobuline (sphères rouges). Le complexe est considéré comme une nouvelle entité colloïdale [d'après de Kruif *et al.* 2004].

Paramètres influençant la formation des coacervats

Plusieurs facteurs physico-chimiques interviennent dans la formation du coacervat, les principaux sont le pH, la force ionique, le ratio protéine/polysaccharide et la concentration en biopolymères.

Le pH est le principal paramètre influençant le phénomène de coacervation complexe. En effet, les interactions entre protéines et polysaccharides sont observées lorsque ces deux polymères portent des charges électriques opposées, c'est-à-dire lorsque le pH de la solution est inférieur au point isoélectrique (pI) de la protéine. L'influence du pH sur le volume de coacervat a été observée par Burgess et Carless (1984). Le volume maximal de coacervat a été observé sur une gamme de pH limitée (Figure 1.3), ce qui démontre la sensibilité de la coacervation complexe envers le pH. L'influence du pH sur la mobilité électrophorétique des coacervats gélatine/gomme d'acacia a également été étudiée par Burgess et Carless (1986). Le pH où la mobilité des mélanges de polymères est nulle correspond au pH d'équivalence électrique (EEP) des deux polymères, c'est-à-dire la valeur de pH pour laquelle les deux polymères portent une charge électrique égale mais de signe opposé.

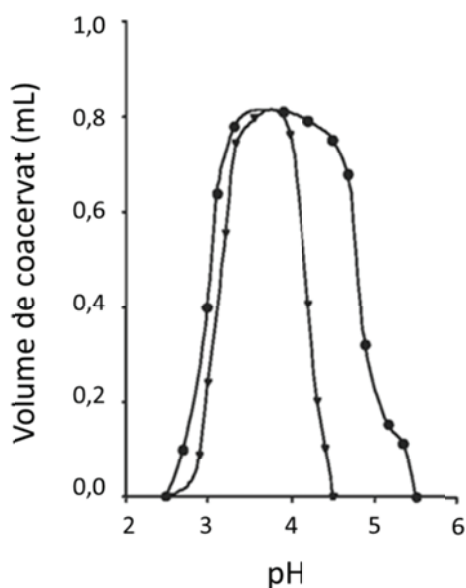


Figure 1.3 : Influence du pH sur le rendement de coacervation complexe dans des mélanges gélatine/gomme d'acacia à une concentration totale en polymères de 1% (ronds : gélatine A, triangles : gélatine B, les gélatines A et B diffèrent par leurs points isoélectriques) [d'après Burgess et Carless 1984].

D'après de Kruif *et al.* (2004), la formation du coacervat complexe peut être décomposée en plusieurs étapes dépendantes du pH. Par exemple, pour une protéine avec un pI d'environ 5, à pH 7 la solution contient les deux polymères solubles sans interactions. En abaissant le pH, la formation de complexes solubles est observée à $pH_c = pH_{critique}$ (pH 5,5). Puis, en abaissant davantage le pH, à $pH_{\phi 1}$

(pH 4,7), une séparation de phase est observée entre une phase diluée et une phase concentrée en polymères. Finalement, en abaissant encore le pH, à pH_{φ_2} (pH 2,5), les complexes sont supprimés en raison de la neutralisation du polysaccharide. Ces étapes ont également été décrites par Liu *et al.* (2010) pour le système protéine de pois/gomme d'acacia, par Weinbreck *et al.* (2003a) pour le système protéine de lactosérum/gomme d'acacia, et par Chai *et al.* (2014) pour le système albumine de sérum bovin/carraghénanes. Dans l'étude de Liu *et al.* (2010) la formation de complexes solubles est observée à $\text{pH}_c = 4,23$, suivie de la formation de complexes insolubles à $\text{pH}_{\varphi_1} = 3,77$. La quantité maximale de coacervat est observée à pH 3,60, et la disparition des complexes à pH 2,62 (pH_{φ_2}).

La force ionique a également un rôle important dans la formation du coacervat, car elle affecte la charge des polymères. Une force ionique très faible ou très élevée entraîne une suppression des interactions électrostatiques entre protéine et polysaccharide [de Kruif *et al.* 2004]. L'addition de sels entraîne la diffusion des charges à la surface des polymères, ce qui réduit l'attraction entre les deux polymères et ainsi la coacervation [Burgess et Carless 1984]. Lorsqu'une quantité suffisante de sel est ajoutée, la coacervation est complètement supprimée (Figure 1.4). La suppression de la coacervation complexe entre les protéines du lactosérum et la gomme d'acacia a également été reportée pour une concentration en sel de 70 mM [Weinbreck *et al.* 2003a]. L'étude de Chai *et al.* (2014) sur la coacervation complexe de l'albumine de sérum bovin et des carraghénanes a montré que l'addition de sel nécessite d'abaisser davantage le pH pour observer les interactions entre les biopolymères, conduisant à la coacervation. La force ionique influence par conséquent la formation des microcapsules [Jun-xia *et al.* 2011, Tsung et Burgess 1997].

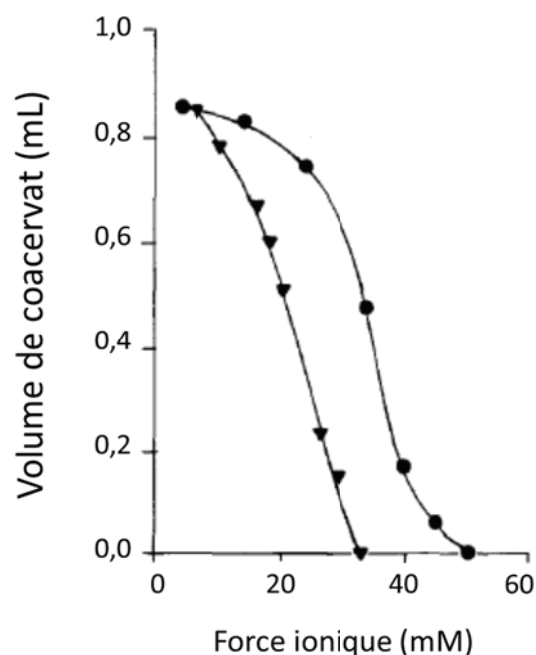


Figure 1.4 : Influence de la force ionique sur le rendement de coacervation complexe dans des mélanges gélatine/gomme d'acacia à un ratio protéine/polysaccharide 1:1 (ronds : gélatine A, triangles : gélatine B) [d'après Burgess et Carless 1984].

Le ratio protéine/polysaccharide est aussi un paramètre à prendre en compte dans le phénomène de coacervation complexe. En effet il existe un ratio protéine/polysaccharide optimal qui correspond à un équilibre des charges entre la protéine et le polysaccharide [Liu *et al.* 2009]. Dans le cas de systèmes où la neutralisation est obtenue pour des ratios 1:1 (par exemple le système albumine de sérum bovin/poly(dimethyldiallylammonium chlorure)), tout ratio supérieur ou inférieur entraîne une diminution de la formation de coacervat [Kaibara *et al.* 2000]. Dans le cas du système bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia, Schmitt *et al.* (2001) ont observé la formation de précipités plus gros et plus nombreux lorsque la protéine est en excès. En revanche Siow et Ong (2013) ont observé que, dans le cas du système gélatine/gomme d'acacia, lorsque l'un des polymères est en excès, la présence de charges non-neutralisées entraîne la formation de plus de complexes solubles que de coacervat. Il est à noter que l'effet du ratio protéine/polysaccharide sur la coacervation est pH dépendant [Weinbreck *et al.* 2004f, Jun-xia *et al.* 2011].

Enfin **la concentration en polymères** peut être un paramètre important de la coacervation complexe car une concentration optimale existe, où la coacervation complexe est maximale [Weinbreck *et al.* 2003a].

Le phénomène de coacervation complexe semble en revanche indépendant de la température [Kaibara *et al.* 2000, Weinbreck *et al.* 2004b].

Caractéristiques du coacervat

Le coacervat est une phase liquide où les protéines et polysaccharides diffusent indépendamment [Weinbreck *et al.* 2004c]. La structure des coacervats est dynamique, les interactions augmentent avec la densité de charge et diminuent par l'augmentation de la force ionique [de Kruif *et al.* 2004].

D'un point de vue rhéologique le coacervat se comporte plus comme une dispersion visqueuse de particules que comme une solution de polymères viscoélastiques concentrée [de Kruif *et al.* 2004].

La composition des coacervats est principalement déterminée par la densité de charge des deux polymères. La neutralité des charges est quasiment atteinte à un pH spécifique pour chaque ratio protéine/polysaccharide. De plus, même lorsqu'il y a un large excès de l'un des deux polymères, les complexes restent faiblement chargés [de Kruif *et al.* 2004]. Gummel *et al.* (2007) ont montré la stœchiométrie de charge à l'intérieur des gouttelettes de coacervat, grâce à une expérience spécifique de marquage.

1.3. Etude approfondie de la coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia

Le phénomène de coacervation complexe entre les protéines du lactosérum, ou la bêta-lactoglobuline, et la gomme d'acacia est étudié depuis plusieurs années. Le tableau 1.1 reprend les

paramètres étudiés avec ces deux systèmes. Il est à noter que les protéines du lactosérum sont majoritairement composées de bêta-lactoglobuline (détails plus loin dans ce chapitre).

Tableau 1.1 : Paramètres étudiés avec les systèmes protéines du lactosérum/gomme d'acacia et bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia.

Références	Système étudié	Méthodes d'études	Paramètres étudiés
Schmitt <i>et al.</i> 1999	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Mobilité électrophorétique, mesure de taille par diffusion laser, diagrammes de phase, dosages des polymères	Effet du pH, de la concentration totale en polymères, du ratio protéine/polysaccharide, composition des deux phases
Schmitt <i>et al.</i> 2000b	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Diagrammes de phase, mobilité électrophorétique, mesure de taille par diffusion laser, observations microscopiques	Caractérisation des agrégats de bêta-lactoglobuline (β -lg), effet des agrégats de β -lg sur la coacervation
Schmitt <i>et al.</i> 2001	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Observations macroscopiques, microscopie confocale à balayage laser, spectroscopie en onde diffusée	Structure du coacervat, stabilité des dispersions de coacervat
Sanchez <i>et al.</i> 2002	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Microscopie confocale à balayage laser, diffusion statique de la lumière aux petits angles	Effet du ratio protéine/polysaccharide sur la structure et la cinétique de formation du coacervat
Weinbreck <i>et al.</i> 2003a	Protéines du lactosérum (WPI)/gomme d'acacia	Turbidité, diffusion de la lumière (statique et dynamique), diagrammes de phase, conductivité	Effet du pH, effet de la force ionique, effet de la concentration totale en biopolymères, composition des WPI,
Weinbreck <i>et al.</i> 2004c	Protéines du lactosérum (WPI)/gomme d'acacia	RMN, fluorescence, spectroscopie en onde diffusée, spectrophotométrie à transmission	Structure du coacervat, diffusion des polymères dans le coacervat
Weinbreck <i>et al.</i> 2004e	Protéines du lactosérum (WPI)/gomme d'acacia	Observations macroscopiques, détermination de la quantité d'eau dans le coacervat, dosages des polymères par HPLC, diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS)	Effet du pH, de la force ionique et du ratio protéine/polysaccharide, cinétique de la séparation de phase, composition du coacervat

Tableau 1.1 (suite): Paramètres étudiés avec les systèmes protéines du lactosérum/gomme d'acacia et bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia.

Références	Système étudié	Méthodes d'études	Paramètres étudiés
Schmitt <i>et al.</i> 2005	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Titration calorimétrique, diffusion dynamique de la lumière, mesures de tensions interfaciales, formation de mousses	Effet du temps sur les propriétés interfaciales des coacervats, effet du temps sur la stabilité de mousse stabilisées par du coacervat
Mekhloufi <i>et al.</i> 2005	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Diffusion dynamique de la lumière, mobilité électrophorétique, turbidité, microscopie à contraste de phase, dichroïsme circulaire	Identification des transitions de pH, structure des coacervats
Sanchez <i>et al.</i> 2006	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Diffusion statique de la lumière aux petits angles	Identification des transitions de phase lors de l'acidification
Aberkane <i>et al.</i> 2010	Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia	Titration calorimétrique, diffusion dynamique de la lumière, mobilité électrophorétique, turbidité, microscopie optique	Etude des paramètres thermodynamiques
Klein <i>et al.</i> 2010	Protéines du lactosérum (WPI)/gomme d'acacia	Tension de surface, mobilité électrophorétique, conductivité électrique, microscopie confocale à balayage laser, analyse calorimétrique différentielle	Tension de surface et conductivité électrique en fonction du ratio Pr:Ps et de la concentration totale en polymères

1.3.1. Bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia

La coacervation complexe de la bêta-lactoglobuline et de la gomme d'acacia a été étudiée en détail par Schmitt *et al.* (1999, 2000b, 2001 et 2005) et quelques autres auteurs (Tableau 1.1).

Les influences du pH, du ratio protéine/polysaccharide, de la concentration totale en biopolymères et de la force ionique sur la coacervation complexe du système bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia ont été étudiées par Schmitt *et al.* (1999). Les interactions maximales entre protéine et polysaccharide ont été identifiées à pH 4,2 pour un ratio protéine/polysaccharide 2:1. Il a été observé que l'augmentation de la concentration totale en biopolymères réduit l'influence du pH et du ratio protéine/polysaccharide.

La présence d'agrégats protéiques lors de la coacervation complexe de la bêta-lactoglobuline et de la gomme d'acacia modifie la structure, la taille et les propriétés de surface des coacervats

[Schmitt *et al.* 2000b]. Ces agrégats protéiques entraînent l'apparition de dispersions hétérogènes où cohabitent des précipités et des coacervats [Schmitt *et al.* 2001].

L'étude de Sanchez *et al.* (2002) a montré que le niveau de neutralisation des charges entre la bêta-lactoglobuline et la gomme d'acacia contrôle la cinétique de séparation de phase ainsi que la structure des complexes. La neutralisation des charges est plus efficace avec le ratio 2:1 qu'avec le ratio 1:1. Lorsqu'il n'y a pas assez de bêta-lactoglobuline pour neutraliser les charges de la gomme d'acacia, une couche de molécules de gomme d'acacia stabilisent la surface des coacervats et empêchent leur interaction. Au contraire, lorsqu'il y a assez de bêta-lactoglobuline pour neutraliser la gomme d'acacia, le système devient très instable. L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser a permis de confirmer que de grands coacervats vacuolisés de bêta-lactoglobuline et gomme d'acacia sont obtenus à pH 4,2 pour des ratios protéine/polysaccharide de 2:1 et 1:1 (Figure 1.5) . Cette structure est obtenue par la coalescence de coacervats plus petits [Schmitt *et al.* 2001].

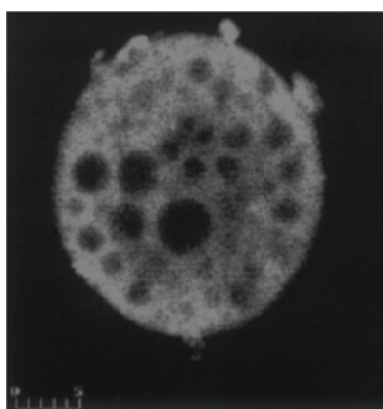


Figure 1.5 : Image de coacervat de bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia (1:1) obtenue par microscopie confocale à balayage laser [d'après Schmitt *et al.* 2001]. Mise en évidence de la structure vacuolisée. Barre d'échelle = 5 μ m.

Les propriétés interfaciales des complexes de bêta-lactoglobuline et de gomme d'acacia ont été étudiées par Schmitt *et al.* (2005). Ces propriétés évoluent au cours du temps. Lorsque les coacervats sont utilisés pour former une mousse, la stabilité de celle-ci est meilleure lorsque des

coacervats qui viennent d'être formés sont utilisés plutôt que des coacervats âgés de 24 h. En effet la structure des coacervats est plus dynamique à t_0 et plus rigide à $t_{24\text{ h}}$.

Les cinétiques d'organisation de phase au cours du phénomène de coacervation complexe du système bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia ont été étudiées par Sanchez *et al.* (2006). Leur étude conclut que le mécanisme de séparation de phase impliqué dans le phénomène de coacervation complexe du système bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia est un mécanisme de nucléation et croissance. Par ailleurs, six transitions structurales induites par le pH ont été mises en évidence lors du phénomène de coacervation entre la bêta-lactoglobuline et la gomme d'acacia au ratio 2:1. Ces phases sont les suivantes : l'initiation des interactions à pH 4,9, l'agrégation des complexes à pH 4,6, l'initiation de la séparation de phase à pH 4,4, la séparation de phase à pH 4,2, l'observation de gouttes de coacervats sphériques à pH 4, et la modification morphologique des coacervats à pH 3,8 [Sanchez *et al.* 2006, Mekhloufi *et al.* 2005]. Enfin les mécanismes thermodynamiques impliqués dans la formation des complexes de bêta-lactoglobuline et gomme d'acacia ont été étudiés à pH 4,2. Deux étapes ont été identifiées. La première est exothermique, régulée par l'enthalpie, et correspond aux interactions électrostatiques. La deuxième est endothermique, régulée par l'entropie, et indique les contributions hydrophobes à la formation des complexes [Aberkane *et al.* 2010].

1.3.2. Protéines du lactosérum/gomme d'acacia

Le phénomène de coacervation complexe au sein du système protéines du lactosérum/gomme d'acacia a été étudié à partir des années 2000 par Weinbreck *et al.* (2003a, 2004c,d,e).

De même que pour le système bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia, les effets du pH, de la force ionique, du ratio protéine/polysaccharide et de la concentration totale en biopolymères ont été étudiés sur la coacervation complexe du système protéines du lactosérum/gomme d'acacia [Weinbreck *et al.* 2003a, 2004e].

Les conditions de coacervation optimale du système protéines du lactosérum/gomme d'acacia ont été identifiées au ratio protéine/polysaccharide 2:1 et à pH 4, où la séparation de phase est la plus rapide et le volume de coacervat formé le plus grand. Dans ces conditions la phase coacervée est dense et très concentrée. La modification du ratio protéine/polysaccharide décale le pH optimal. Celui-ci est plus élevé lorsque le ratio est augmenté, et vice-versa. L'augmentation de la force ionique modifie la phase coacervée. Celle-ci devient moins concentrée, plus hétérogène et moins structurée [Weinbreck *et al.* 2004e]. Le ratio protéine/polysaccharide 3:1 a été étudié par Klein *et al.* (2010), sur le système protéines du lactosérum/gomme d'acacia à une concentration totale de 10 %. Dans cette étude la coacervation complexe a été observée entre pH 3 et pH 5. Des interactions faibles ont été identifiées entre pH 5 et pH 7.

La coacervation complexe des protéines du lactosérum avec la gomme d'acacia a été comparée à la coacervation complexe des composants majeurs des protéines du lactosérum avec la gomme d'acacia, à savoir la bêta-lactoglobuline et l'alpha-lactalbumine. D'après la turbidité des mélanges obtenus en fonction du pH, qui est similaire pour les systèmes bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia et protéines du lactosérum/gomme d'acacia, il est conclu que les interactions entre les protéines du lactosérum et la gomme d'acacia sont majoritairement dues aux interactions entre la bêta-lactoglobuline et la gomme d'acacia [Weinbreck *et al.* 2003a].

Trois principales étapes ont été identifiées dans la formation des coacervats complexes. La première correspond à la formation de complexes solubles. La deuxième étape est la séparation de phase. La dernière étape consiste à la suppression des interactions, et disparition des complexes [Weinbreck *et al.* 2003a].

La diffusion des polymères dans le coacervat de protéines du lactosérum/gomme d'acacia a été étudiée par Weinbreck *et al.* (2004c). Leur travail a montré que la diffusion des polymères était la plus lente au pH où les interactions électrostatiques étaient maximales. Ils ont aussi mis en évidence que la protéine et le polysaccharide se déplacent indépendamment dans la phase coacervée ; la

protéine plus rapidement que le polysaccharide. De plus, il semblerait que la phase coacervée se réarrange avec le temps pour former une phase plus homogène et transparente.

Les propriétés rhéologiques du coacervat ont été étudiées sur le système protéines du lactosérum/gomme d'acacia par Weinbreck *et al.* (2004d). Les effets des interactions électrostatiques ont été observés en comparant la viscosité de mélanges de polymères de même concentration à pH 7, où il n'y a pas d'interactions, et à pH 4 où on observe du coacervat. Les résultats ont montré que le pH joue un rôle majeur dans la viscosité du coacervat et que le coacervat à pH 4 est très visqueux comparé à la solution à pH 7. La viscosité du coacervat peut être directement reliée à la force des interactions électrostatiques.

2. La microencapsulation par coacervation complexe

L'encapsulation est une technique utilisée afin de protéger des composés fragiles, en particulier ceux sensibles à l'hydrolyse ou l'oxydation. Le procédé d'encapsulation par coacervation complexe consiste à provoquer le dépôt d'un coacervat, composé de deux polymères de charges opposées, à la surface des gouttelettes d'huile d'une émulsion de type huile dans eau.

2.1. Généralités sur la microencapsulation

2.1.1. A quoi sert l'encapsulation ?

L'encapsulation permet de transformer un liquide en solide, de masquer une odeur ou un goût désagréable, de protéger des substances sensibles des effets délétères de l'environnement extérieur, ainsi que d'obtenir une libération contrôlée et ciblée des principes actifs [Gouin 2004]. C'est une technique qui permet d'obtenir des produits à haute valeur ajoutée. On peut parler de nanoencapsulation pour les particules submicroniques (1 à 1000 nm) et de microencapsulation pour les particules micrométriques (1 à 1000 µm). Nous nous intéressons ici à la microencapsulation. Les microcapsules peuvent contenir des composés d'origines variées: principes actifs pharmaceutiques [Jizomoto *et al.* 1993], actifs cosmétiques [Junyaprasert *et al.* 2001, Ammala 2013], additifs alimentaires [Wang *et al.* 2014], produits phytosanitaires [Gu *et al.* 2010], arômes [Leclercq *et al.* 2009], cellules [Kang 2014], encres [Guo *et al.* 2005], micro-organismes, ou encore catalyseurs de réactions chimiques [Richard et Benoît 2013].

La microencapsulation est notamment utilisée dans le domaine alimentaire afin d'enrichir des aliments en arômes, vitamines, minéraux, probiotiques, acides gras et antioxydants [Champagne et Fustier 2007]. Par exemple, les bactéries probiotiques sont encapsulées afin d'améliorer leur viabilité au cours des procédés de fabrication des produits alimentaires et aussi pour permettre une libération ciblée au niveau du tractus gastro-intestinal [Anal et Singh 2007, Annan *et al.* 2008]. Les caroténoïdes (lutéine et lycopène) sont quant à eux encapsulés afin d'améliorer leur stabilité vis-à-vis de la lumière, de l'humidité et de la température [Qv *et al.* 2011, Rocha *et al.* 2012], tandis que les huiles riches en acides gras polyinsaturés (oméga 3), telles que l'huile de microalgue et l'huile de

thon, sont encapsulées afin d'augmenter la stabilité des acides gras vis-à-vis de l'oxydation [Zhang *et al.* 2012, Wang *et al.* 2014].

Tableau 1.2 : Quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire.

Composés encapsulés	Intérêts de l'encapsulation	Références
Acides gras – Oméga 3 (eicosapentaenoic acid ethyl ester, huile de thon, huile de poisson, huile de microalgue)	- Masquer le goût - Améliorer la dispersion en milieu aqueux - Retarder et minimiser les dégradations oxydatives - Permettre une libération contrôlée	Lamprecht <i>et al.</i> 2001 Klinkesorn <i>et al.</i> 2006 Anwar et Kunz 2011 Zhang <i>et al.</i> 2012 Wang <i>et al.</i> 2014
Antimicrobiens (Huile d'arbre à thé, Allyl isothiocyanate, Huile d'ail)	- Permettre une libération prolongée - Diminuer l'évaporation - Réduire l'oxydation - Masquer l'odeur	Zhang <i>et al.</i> 2011 Siow et Ong 2013 Pérez-Limiñana. <i>et al.</i> 2014
Antioxydants (Huile d'ail, polyphénols de thym)	- Permettre une libération prolongée - Diminuer l'évaporation - Réduire l'oxydation - Masquer l'odeur	Siow et Ong 2013 Comunian <i>et al.</i> 2013 Trifkovic <i>et al.</i> 2014
Arômes	- Transformer un liquide en solide - Protéger de l'oxydation et de l'évaporation - Permettre une libération contrôlée - Résister à la congélation	Weinbreck <i>et al.</i> 2004d Yeo <i>et al.</i> 2005 Leclercq <i>et al.</i> 2009
Caroténoïdes (Lutéine, Lycopène)	- Améliorer la stabilité envers l'oxygène, la lumière et la température - Permettre une dispersion en milieu aqueux	Qv <i>et al.</i> 2011 Rocha <i>et al.</i> 2012
Probiotiques	- Améliorer la viabilité au cours des procédés de fabrication des produits alimentaires - Améliorer la survie dans le tractus gastro-intestinal	Anal et Singh 2007 Annan <i>et al.</i> 2008

2.1.2. En quoi consiste la microencapsulation ?

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant/support contenant une matière active. Les microparticules présentent une taille comprise entre 1 µm et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90% (en masse) de matière active [Richard et Benoît 2013]. De nombreuses méthodes d'encapsulation ont été développées afin de s'adapter à divers types de substances actives et matériaux enrobants. Ces différentes méthodes permettent d'obtenir des particules aux caractéristiques variées (taille, épaisseur de la paroi, perméabilité) permettant de

moduler la libération de la substance active [Martins *et al.* 2014]. Deux types de morphologies de microparticules peuvent être obtenus : la microsphère et la microcapsule (Figure 1.6). Sur cette figure le mot polymère englobe tous les matériaux pouvant être utilisés pour la formation de la membrane ou de la matrice : macromolécules, protéines, lipides, polymères synthétiques... Les microcapsules sont des systèmes réservoirs constitués d'un cœur liquide ou solide contenant la substance active, entouré d'une enveloppe continue de matériau enrobant. Tandis que les microsphères sont des systèmes matriciels où la substance active est dispersée au sein d'un réseau de polymères. Le taux d'encapsulation (masse de matière active / masse de microparticules) est de l'ordre de 85 à 90 % dans les microcapsules, contre 20 à 35 % dans les microsphères. En termes de contenance le système microcapsule est donc plus intéressant que la microsphère. Les profils de relargage différent aussi entre microsphères et microcapsules. La morphologie des microparticules est ainsi déterminée en fonction de l'application recherchée. Pour les microsphères les profils de relargage sont généralement contrôlés par la diffusion avec un taux de relargage cinétiquement contrôlé par la taille des capsules, tandis que les microcapsules relarguent souvent la totalité de leur contenu lorsque l'enveloppe se brise [Boh 2007, Onesippe 2005].

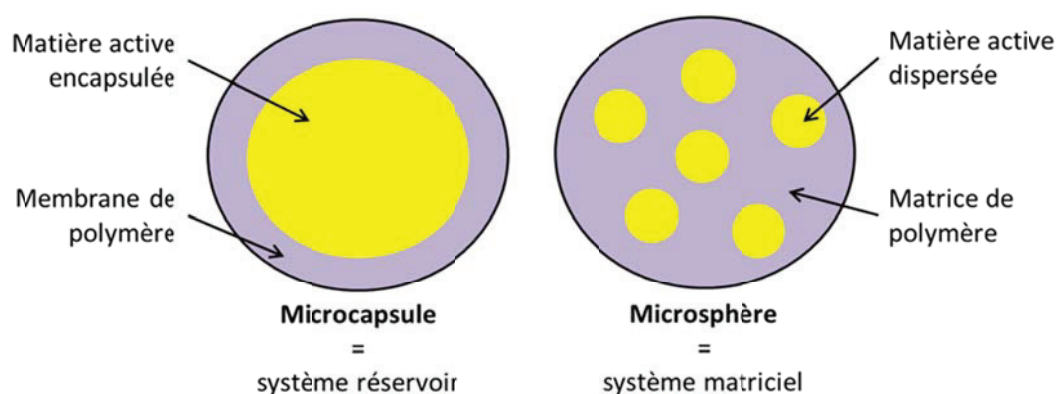


Figure 1.6 : Représentation schématique des deux types de microparticules.

Les procédés d'encapsulation sont variés et peuvent être classés en trois grands groupes :

- Les procédés physico-chimiques, tels que la séparation de phases ou coacervation (simple ou complexe), l'évaporation-extraction de solvant et la gélification thermique d'émulsions.

- Les procédés mécaniques, tels que la nébulisation/séchage (spray-drying), la gélification ou congélation de gouttes (prilling), l'enrobage en lit fluidisé (spray-coating) et l'extrusion/sphéronisation.
- Les procédés chimiques, tels que la polycondensation interfaciale, la polymérisation interfaciale et la polymérisation en milieux dispersé (émulsion, miniémulsion, microsuspension...) par voie radicalaire ou anionique.

De nombreux polymères sont utilisés comme matériaux enrobants, principalement dans le cas des procédés d'encapsulation physico-chimiques et mécaniques, tels que le chitosan, l'alginate, la carboxyméthylcellulose, les carraghénanes, la gélatine, la pectine et les protéines de lait [Richard et Benoît 2013].

2.2. La microencapsulation par coacervation complexe

2.2.1. Généralités

La première application de microcapsules formées par coacervation complexe fut la fabrication de papier autocopiant en 1953 [Green et Schleicher 1956]. Les microcapsules étaient réalisées par coacervation complexe de gélatine et de gomme d'acacia. Cependant la formation de microcapsules par coacervation complexe avait été observée pour la première fois par Bungenberg de Jong en 1949. De nos jours la microencapsulation par coacervation complexe est utilisée dans des domaines variés : pharmaceutique [Burgess et Carless 1986, Huang *et al.* 2007], cosmétique [Magill 1990], textile [Liu *et al.* 2013], phytosanitaire [Gu *et al.* 2010], et alimentaire [Zhang et Mutilangi 2013, Wang *et al.* 2014].

Les particules obtenues par coacervation complexe sont des microcapsules, de tailles comprises entre 5 et 200 μm , avec une distribution granulométrique plus ou moins large. Le taux d'encapsulation de ces microcapsules est compris entre 70 et 90%. Ces microparticules permettent une libération prolongée, par diffusion à travers la membrane, et/ou une libération déclenchée (effet de pH, effet mécanique, dissolution, attaque enzymatique) [Richard et Benoît 2013].

Les polymères utilisés comme matériaux enrobants peuvent être d'origines variées : naturelle, synthétique et semi-synthétique. Le couple de polymères le plus étudié et le mieux compris est le système gélatine/gomme d'acacia [Madan *et al.* 1972, Junyaprasert *et al.* 2001, Lemetter *et al.* 2009, Dong *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012, Lv *et al.* 2012]. Cependant de nombreux autres couples de polyélectrolytes ont aussi été étudiés tels que pectine/caséine [Baracat *et al.* 2012], pectine/gélatine, alginate/gélatine [Saravanan et Rao 2010], alginate/chitosan [Lucinda-Silva *et al.* 2010], gomme xanthane/chitosan [Argin-Soysal *et al.* 2009], protéine de soja/pectine [Mendanha *et al.* 2009], protéines de soja/gomme d'acacia [Jun-xia *et al.* 2011], protéines du lactosérum/gomme d'acacia [Weinbreck *et al.* 2004d], héparine/gélatine [Tsung et Burgess 1997], hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)/sodium dodecyl sulfate (SDS)/sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) [Sovilj *et al.* 2010], gélatine/SDS/NaCMC [Li *et al.* 2009], hydrolysats de collagène/chitosan [Ocak 2012], etc...

L'encapsulation par coacervation complexe est typiquement utilisée pour protéger les huiles aromatiques, mais peut aussi être utilisée pour les huiles de poisson, les vitamines, les conservateurs et les enzymes [Gouin 2004]. Bien que cette méthode soit essentiellement employée pour l'encapsulation de composés lipophiles, elle peut aussi être utilisée pour l'encapsulation de composés hydrophiles. L'encapsulation d'acide ascorbique a ainsi été réalisée avec succès en utilisant la technique de la double émulsion [Comunian *et al.* 2013].

2.2.2. Formation des microcapsules

Le procédé de microencapsulation par coacervation complexe peut être décomposé en quatre étapes [Madan *et al.* 1972, Gouin 2004]. La première étape du procédé de microencapsulation par coacervation complexe consiste à former une émulsion (ou dispersion) dans laquelle la substance à encapsuler constitue la phase dispersée, et les matériaux d'encapsulation (hydrocolloïdes), en solution dans l'eau, forment la phase continue (Figure 1.7 [1]). Puis la séparation de phase des hydrocolloïdes de la phase continue est induite par modification chimique du milieu, le plus souvent une modification du pH (Figure 1.7 [2]). Le phénomène de coacervation complexe a été

décrit plus en détails dans la partie sur la coacervation complexe. Les gouttelettes de coacervat se déposent alors autour de la substance à encapsuler (Figure 1.7 [3]). On peut ajouter une étape de gélification (Figure 1.7 [4]) si la gélatine est utilisée comme matériel enrobant [Junyaprasert *et al.* 2001, Li *et al.* 2009]. Enfin l'enveloppe composée du coacervat d'hydrocolloïdes peut être réticulée par le biais d'un agent réticulant chimique ou enzymatique (Figure 1.7 [5]).

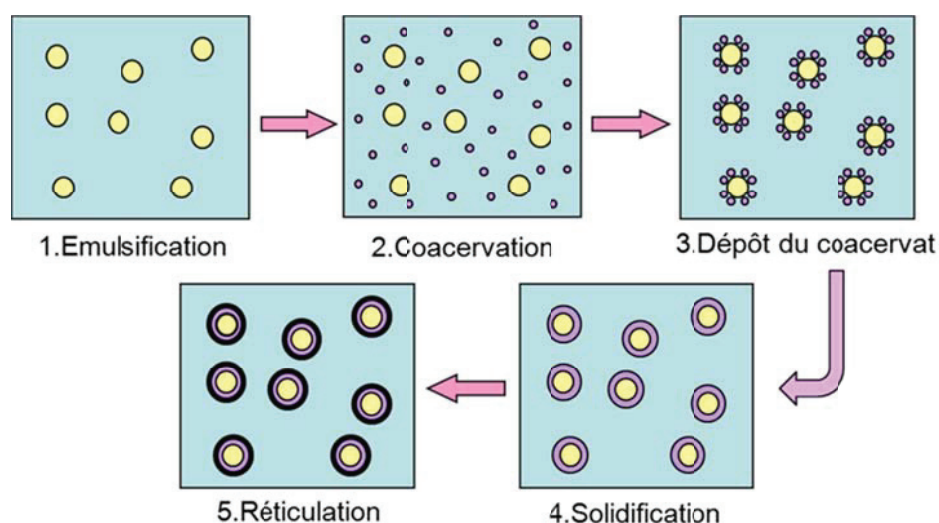


Figure 1.7 : Représentation schématique du procédé d'encapsulation par coacervation complexe [d'après Richard et Benoît 2013].

Deux mécanismes de formation des capsules ont été proposés par Madan *et al.* (1972). Le premier consiste à l'inclusion dans une seule goutte de coacervat d'une ou plusieurs gouttes de matière à encapsuler. Le deuxième mécanisme possible est l'adsorption et la coalescence de plusieurs gouttelettes de coacervat autour des gouttes de matière à encapsuler. Les observations microscopiques effectuées au cours de son étude confirment que la majorité des particules ou gouttes encapsulées le sont par ce deuxième mécanisme, même les plus petites.

Il a aussi été observé que les complexes de polymères ne forment pas un film homogène à la surface des gouttes d'huile. En effet l'enveloppe de polymères autour des gouttes d'huile peut être divisée en deux couches : la première est majoritairement composée de protéine, tandis que la seconde est composée de complexes protéine/polysaccharide. Les différences dans les structures

des couches de biopolymères sont dépendantes des conditions d'adsorption (séquentielle ou simultanée) ainsi que de la charge des particules de coacervat (neutre ou de charge négative) [Dickinson 2011, Rodriguez Patino et Pilosof 2011].

Trois types de microcapsules peuvent être obtenus par coacervation complexe en fonction des paramètres de procédé mis en place: les capsules mononucléées, les capsules polynucléées et les agrégats de capsules mononucléées (Figure 1.8). Chaque type de capsules est formé selon des conditions spécifiques. La taille des capsules mononucléées est fonction de la taille des gouttes d'huile, qui est contrôlée par l'étape d'émulsification, et de l'épaisseur de l'enveloppe de coacervat. La formation de capsules polynucléées est contrôlée par la vitesse d'agitation durant l'étape de coacervation ; quand la vitesse augmente le phénomène de polynucléation diminue. Tandis que la formation d'agrégats de capsules mononucléées semble être influencée par la température et la durée de l'étape de gélification ; lorsque la température n'est pas assez diminuée ($> 14^{\circ}\text{C}$) des agrégats se forment ; l'agitation doit être maintenue jusqu'à ce que la température atteigne 14°C afin d'éviter l'agrégation des capsules [Lemetter *et al.* 2009].

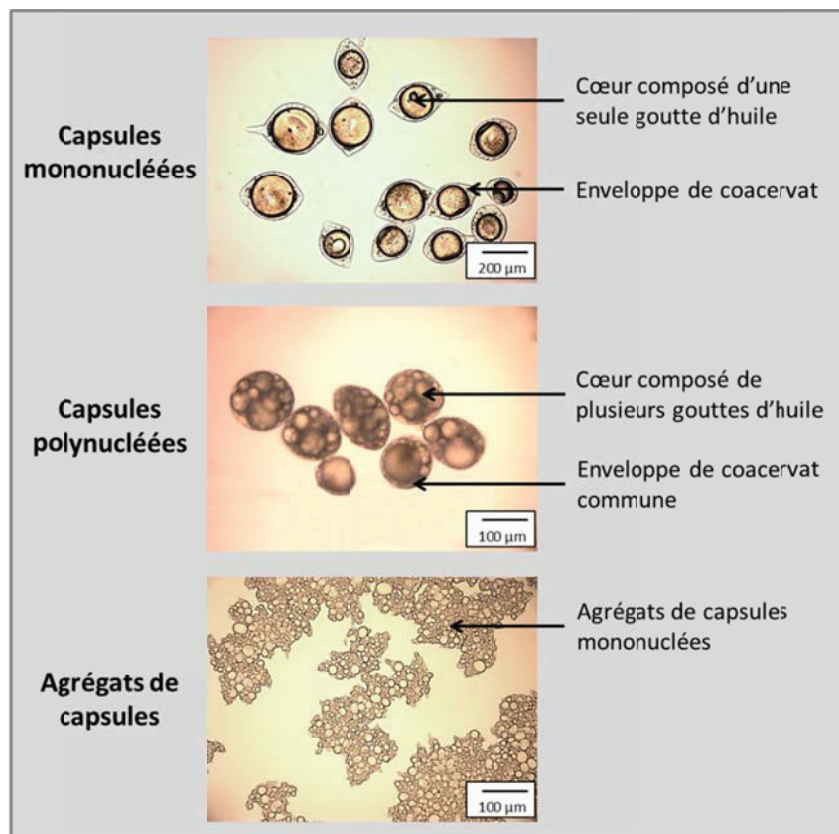


Figure 1.8 : Représentation des trois types de capsules pouvant être obtenus par coacervation complexe [d'après Lemetter *et al.* 2009]. Photographies d'expérimentations réalisées durant la thèse.

Une méthode simplifiée pour l'optimisation de la préparation de microcapsules par coacervation complexe a été proposée par Lv *et al.* (2012). Des mesures de potentiel zêta des solutions de protéines et polysaccharides ont été réalisées en fonction du pH afin d'établir les ratios de polymères enrobants permettant d'équilibrer les charges. Des mesures de turbidité sur les mélanges de polymères en solution à différents pH ont été effectuées afin de déterminer le pH correspondant à la turbidité la plus élevée, qui coïncide avec la quantité maximale de coacervat formée. Le ratio et le pH déterminés à partir de ces études préliminaires sont utilisés pour former des microcapsules.

2.2.3. Paramètres influençant les caractéristiques des microcapsules

La formation des microcapsules à partir des gouttelettes de coacervat dispersées en phase aqueuse dépend de l'équilibre de l'énergie interfaciale entre les trois phases (huile/eau/coacervat).

La relation entre les énergies interfaciales doit être telle que le coacervat mouille au moins partiellement l'interface huile/eau. Comme la tension interfaciale entre le coacervat et la phase continue (phase aqueuse) est faible en général (de l'ordre de 0,1 à 0,5 mN.m⁻¹), il suffit que la tension interfaciale huile/eau soit supérieure à la tension interfaciale huile/coacervat pour que le coacervat enrobe les gouttes d'huile afin de former des microcapsules [Dardelle et Erni 2013, Richard et Benoît 2013]. La formation de l'enveloppe des microcapsules est réalisée par le dépôt et la fusion de gouttelettes de coacervat.

La formation et les caractéristiques finales des microcapsules sont dépendantes de nombreux paramètres physico-chimiques ainsi que de paramètres de formulation et de procédés, tels que l'agitation, la taille des gouttes ou particules de matière à encapsuler, le pH, la concentration en polymères... Ces facteurs sont décrits plus en détails ci-dessous.

- La taille initiale des gouttes d'huile ou particules solides à encapsuler

L'influence de la taille des gouttes (ou particules) à encapsuler sur la formation des capsules a été décrite par Madan *et al.* (1972). Selon leur étude sur le système gélatine/gomme d'acacia, les particules d'alcool stéarique de taille supérieure à 335µm ne peuvent pas être encapsulées. En effet on observe que les grosses particules ne sont que partiellement encapsulées telle que celle présentée en Figure 1.9.

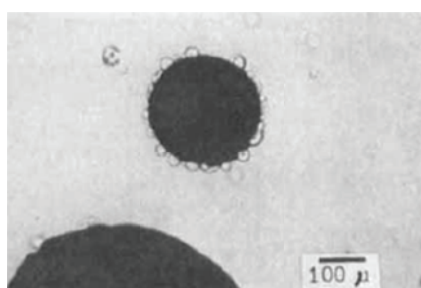


Figure 1.9 : Particules d'alcool stéarique présentant une encapsulation incomplète par le coacervat gélatine/gomme d'acacia [d'après Madan *et al.* 1972].

L'influence de la taille des gouttes (ou particules) à encapsuler sur la formation des capsules a aussi été décrite par Weinbreck *et al.* (2004f). Selon leur étude les petites gouttes (5 à 50 µm) sont plus

facilement encapsulées que les grosses (50 à 200 μm). Les grosses gouttes sont entourées par une fine couche de coacervat tandis que les petites gouttes sont encapsulées dans une matrice de coacervat (Figure 1.10). Cette différence au niveau de l'aspect des capsules a été attribuée à un mécanisme d'encapsulation différent pour les petites et les grosses gouttes. L'encapsulation de grosses gouttes nécessite l'agrégation et la coalescence partielle d'un grand nombre de gouttelettes de coacervat, tandis que l'encapsulation de petites gouttes peut se faire par piégeage d'une goutte d'huile dans une goutte de coacervat.

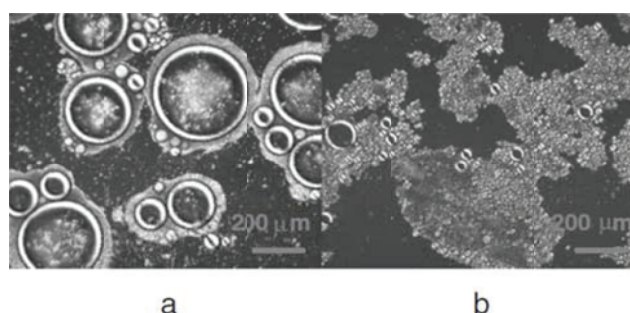


Figure 1.10: Huile essentielle d'orange encapsulée par du coacervat complexe WP/GA (a : grosses gouttes (50-200 μm) obtenues par agitation magnétique ; b : petites gouttes (5-50 μm) obtenues avec un homogénéisateur rotor/stator [d'après Weinbreck *et al.* 2004f].

La taille des gouttes à encapsuler dépend des conditions d'émulsification [Weinbreck *et al.* 2004f]. L'influence du type d'équipement utilisé lors de l'étape d'émulsification sur le diamètre moyen des gouttes d'huile a donc été étudiée. Lemetter *et al.* (2009) ont ainsi comparé la cuve agitée avec une turbine Rushton, le rotor-stator et l'homogénéiseur haute pression, tandis que Lamprecht *et al.* (2001) ont comparé l'agitation magnétique, la cuve agitée avec une hélice à quatre pales et le rotor-stator. Dans ces deux études le rotor-stator a été retenu pour l'étape d'émulsification car il a permis d'obtenir des émulsions possédant les caractéristiques demandées pour permettre la formation de microcapsules de la taille désirée [Lemetter *et al.* 2009] et d'obtenir les meilleurs taux d'encapsulation [Lamprecht *et al.* 2001]. Il a aussi été mis en évidence que la vitesse et la durée d'agitation influencent la structure des capsules. Des temps d'agitation courts et des vitesses faibles permettent la formation de structures cœur/enveloppe, tandis que des temps d'agitation plus longs

et des vitesses élevées peuvent conduire à la formation de structures matricielles [Lamprecht *et al.* 2001, Yeo *et al.* 2005].

- Le pH

Le phénomène de coacervation complexe est fortement affecté par le pH. Celui-ci influence donc la formation des microcapsules [Jun-xia *et al.* 2011]. Dans l'étude de Weinbreck *et al.* (2004f), sur le système protéines du lactosérum / gomme d'acacia, les meilleures capsules ont été formées à pH 4 où la viscosité du coacervat était la plus élevée et où la majorité des polymères étaient présents dans le coacervat. Le rendement d'encapsulation peut être fortement diminué lorsque que le pH est en dessous ou au-dessus du pH optimum [Siow et Ong 2013]. Daniels et Mittermaier (1995) ont quant à eux mis en évidence que le pH utilisé pour la formation des capsules peut influencer le taux de libération de la substance encapsulée. Cependant les profils de dissolution des microcapsules ne semblent pas modifiés par le type d'acide utilisé pour l'ajustement du pH.

- La concentration en polymères

Le diamètre des microcapsules est directement proportionnel à la concentration en polymères [Arshady 1990]. D'après Weinbreck *et al.* (2004f) une concentration en polymères comprise entre 0,5 et 1% semble suffisante pour encapsuler 5% d'huile. De plus, Yeo *et al.* (2005) ont observé que lorsque la concentration en polymères est faible, l'enveloppe entourant les gouttes d'huile est fine et la taille des agrégats de capsules augmente.

- Le ratio matière active/matériaux enrobant

La quantité de matière active incorporée au système affecte l'efficacité d'encapsulation et le rendement d'encapsulation [Jun-xia *et al.* 2011]. Lorsque le ratio matière active/matériaux enrobant est insuffisant le rendement d'encapsulation est faible car les polymères en excès restent en solution [Siow et Ong 2013]. D'après Lamprecht *et al.* (2001), l'augmentation du ratio matière active/matériaux enrobant entraîne une diminution du taux d'encapsulation. Il a été montré que l'augmentation du ratio matière active/matériaux enrobant affecte la morphologie des microcapsules, augmente leur taille et leur charge. L'augmentation de la charge des microcapsules

entraîne une diminution de l'épaisseur de la membrane, ce qui augmente la vitesse de libération de la matière encapsulée [Dong *et al.* 2011].

- La vitesse d'agitation pendant la coacervation

La vitesse d'agitation pendant la coacervation influence la formation des microcapsules. Une vitesse d'agitation minimale est nécessaire pour contrôler le phénomène de polynucléation et une vitesse d'agitation maximale ne doit pas être dépassée pour éviter la formation de mousse [Lemetter *et al.* 2009]. Ces vitesses dépendent des propriétés du système d'agitation, telles que les géométries du réacteur et de l'agitateur utilisé.

- La présence d'agent tensioactif

Les tensioactifs sont en général peu utilisés dans les procédés d'encapsulation par coacervation complexe, les protéines utilisées pour la formation du coacervat possédant généralement des propriétés tensioactives. Cependant quelques études se sont intéressées à l'influence de l'ajout d'un agent tensioactif sur la formation et les caractéristiques des microcapsules formées par coacervation complexe. Mayya *et al.* (2003) ont montré que l'ajout de tensioactif permet d'augmenter le rendement d'encapsulation. Ils ont aussi observé que le tensioactif interagit avec le polymère de charge opposée afin de former une première enveloppe autour des gouttes d'huile, qui est recouverte par une seconde enveloppe composée des complexes de polyélectrolytes. D'après Guo *et al.* (2005), la présence de SDS, tensioactif anionique, pourrait favoriser le dépôt du coacervat gélatine/gomme d'acacia à la surface des gouttes d'huile. En effet, l'absorption du SDS à la surface des gouttelettes d'huile les charge négativement et permettrait ainsi à la gélatine chargée positivement de coacerver plus facilement autour des gouttes d'huile. La présence de SDS dans la solution entraîne aussi une diminution de la taille des gouttes, ainsi qu'une distribution plus étroite de la taille des gouttes. La taille des microcapsules passe ainsi de 50 μm , pour une solution à 0.005% de SDS, à 28 μm , pour une solution à 0.012% de SDS.

2.3. Problématiques actuelles

Le couple de polymères le plus utilisé pour le procédé de coacervation complexe est le couple gélatine/gomme d'acacia. Cependant l'utilisation de la gélatine, d'origine animale (porc et bœuf), pour des applications alimentaires devient controversée pour des raisons religieuses et sanitaires (transmission possible de maladies, dont l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine). Un autre inconvénient des gélatines de porc et de bœuf est qu'elles doivent être chauffées entre 40°C et 50°C pour être solubilisées. Le procédé d'encapsulation est donc réalisé à température élevée ce qui rend difficile l'encapsulation de composés volatiles et sensibles à la chaleur. De plus une étape de réticulation de l'enveloppe des microcapsules est nécessaire à la fin du procédé d'encapsulation afin de prévenir leur éclatement. Or l'agent réticulant le plus utilisé à ce jour, car le plus efficace, est le glutaraldéhyde, qui est un composé présentant un risque toxicologique (irritant local et respiratoire). Deux défis actuels concernant l'encapsulation par coacervation complexe sont donc le remplacement de la gélatine par un autre polymère cationique, moins controversé, et la recherche d'une alternative efficace et non toxique au glutaraldéhyde.

2.3.1. Remplacement de la gélatine par d'autres protéines

La gélatine de poisson a été identifiée depuis quelques années comme une alternative possible à la gélatine de porc ou de bœuf. Son utilisation peut apporter de nombreux avantages au procédé d'encapsulation par coacervation complexe. Son point de gélification (8-25°C et 11-28°C pour les gélatines de poisson d'eau froide et d'eau chaude respectivement) permet d'effectuer le procédé de microencapsulation à température ambiante ou légèrement plus élevée, ce qui est très intéressant pour l'encapsulation de composés volatils ou très sensibles à la chaleur. La gélatine de poisson d'eau froide et la gomme d'acacia ont été utilisées pour encapsuler de l'huile de tournesol à température ambiante par coacervation complexe [Piacentini *et al.* 2013]. La gélatine de poisson d'eau chaude a elle aussi été associée à la gomme d'acacia pour encapsuler des nutriments et des arômes par coacervation complexe. Le procédé d'encapsulation décrit dans ce cas est réalisé entre 33 et 35°C [Soper 1997].

Les protéines laitières, et plus précisément les protéines du lactosérum et la bêta-lactoglobuline, sont également utilisées comme polymère cationique pour l'encapsulation par coacervation complexe. L'utilisation de ces protéines permet d'économiser de l'énergie, car elles n'ont pas besoin d'être chauffées (procédé à température ambiante), et d'encapsuler des composés volatiles ou thermosensibles. Leur inconvénient est qu'elles sont allergènes [Wal 2002], ce qui peut limiter leurs applications. La bêta-lactoglobuline a été associée à la gomme d'acacia pour former des microcapsules contenant de l'huile de poisson par coacervation complexe [Zhang et Mutilangi 2013]. Les protéines du lactosérum ont elles aussi été associées à la gomme d'acacia afin d'encapsuler de l'huile de tournesol par coacervation complexe. Des microcapsules ont de même été réalisées par coacervation complexe entre les protéines du lactosérum et la pectine, ou encore la carboxyméthylcellulose [Weinbreck *et al.* 2003b].

Les protéines végétales constituent également une alternative aux protéines animales pour l'encapsulation par coacervation complexe, car ce sont des polymères naturels biodégradables et biocompatibles. De plus, les protéines végétales sont connues pour être moins allergènes que les protéines animales, ce qui est un avantage pour les applications alimentaires [Li *et al.* 2012]. Leur inconvénient est qu'elles présentent des problèmes de solubilité du fait de la présence de plusieurs fractions [Nesterenko *et al.* 2013]. Cependant certaines protéines végétales ont pu être utilisées dans des procédés d'encapsulation par coacervation complexe depuis une dizaine d'année. La protéine de soja a permis d'obtenir des microcapsules par coacervation complexe, en association avec la gomme d'acacia [Jun-xia *et al.* 2011, Costa de Conto *et al.* 2013], ou avec la pectine [Mendanha *et al.* 2009, Nori *et al.* 2010]. La protéine de pois a quant à elle été associée à la gomme d'acacia, à la carboxyméthylcellulose ou encore à l'alginate de sodium pour former des microcapsules par coacervation complexe [Ducel *et al.* 2004].

2.3.2. Recherche d'alternatives au glutaraldéhyde

A la fin du procédé d'encapsulation, les microcapsules formées sont peu résistantes en raison de la nature ionique des interactions entre les polymères. Elles sont donc généralement

réticulées par l'ajout d'un agent chimique tel que le glutaraldéhyde. Cependant la toxicité de celui-ci limite son usage pour les applications alimentaires et pharmaceutiques. De nombreuses études ont ainsi été réalisées sur de potentiels agents réticulant non toxiques tels que les enzymes, les tannins, la génipine et les polyphénols.

Les enzymes étudiées pour la réticulation des microcapsules sont la transglutaminase et la laccase. La transglutaminase a été employée par Prata *et al.* (2008) pour réticuler des microcapsules dont l'enveloppe était composée de gélatine et gomme d'acacia. La comparaison entre la réticulation à la transglutaminase et celle au glutaraldéhyde a montré que la réticulation à la transglutaminase renforçait la paroi des capsules mais que la réticulation chimique donnait des particules plus résistantes. L'influence du temps de réticulation sur la stabilité des microcapsules réticulées à la transglutaminase a été mise en évidence [Dong *et al.* 2008]. Zhang *et al.* (2012) ont montré que les paramètres de l'étape de réticulation tels que la durée, le pH, la température et la concentration en transglutaminase permettent de réguler la libération de l'huile encapsulée. Par exemple, ils ont mis en évidence qu'une augmentation de la concentration en transglutaminase entraîne une diminution de la vitesse de libération de l'huile encapsulée. Un procédé de microencapsulation par coacervation complexe avec une réticulation à la transglutaminase a par ailleurs été breveté [Soper et Thomas 2000]. La laccase a également été utilisée pour réticuler du coacervat complexe de protéines du lactosérum et pectine [Chen *et al.* 2012].

Les tannins et l'acide tannique permettent la réticulation de films de gélatine [Pena *et al.* 2010] mais aussi de microparticules dont l'enveloppe est composée de coacervat complexe de gélatine et gomme d'acacia [Zhang *et al.* 2011]. Ces microparticules ont montré des propriétés de libération améliorées, une désintégration ralentie des microsphères, en utilisant plus d'acide tannique sans perte dans l'efficacité d'encapsulation. Cependant aucune étude ne compare l'efficacité des tannins à celle du glutaraldéhyde sur la réticulation des capsules.

La génipine est également un agent réticulant non toxique d'origine naturelle qui peut être utilisé pour la réticulation de microcapsules obtenues par coacervation complexe. Elle a notamment

été utilisée pour réticuler des microcapsules dont l'enveloppe était composée de chitosan et gélatine [Hussain et Maji 2008], ou encore de gélatine et carraghénanes [Devi et Maji 2010]. L'augmentation de la concentration en génipine a montré une diminution du taux de libération de la substance encapsulée ainsi qu'une augmentation de l'efficacité d'encapsulation. Aucune comparaison d'efficacité n'a pour le moment été réalisée avec le glutaraldéhyde.

Les polyphénols dérivés de plantes, tels que le café et le jus de raisin, peuvent aussi constituer une alternative d'agent réticulant. Les microparticules de gélatine et pectine réticulées par des polyphénols ont montré une bonne résistance aux dégradations thermiques [Strauss et Gibson 2004]. Mais la résistance de ces capsules n'a pas été comparée à celle de capsules réticulées par du glutaraldéhyde.

3. Les matières premières utilisées pour cette étude

Les polymères utilisés dans cette étude sont les protéines laitières et la gomme d'acacia. Ces polymères sont utilisés pour former du coacervat complexes en vue d'encapsuler de l'huile de lin.

3.1. Les protéines laitières

Les protéines laitières sont composées de caséines (80 %), qui sont insolubles à leur point isoélectrique (pH 4,6), et de protéines sériques solubles (20 %), aussi appelées protéines du lactosérum [de Jong *et al.* 1993]. Nous nous intéressons ici aux protéines du lactosérum, qui compose le Prolacta (produit commercial utilisé pour notre étude).

Les protéines solubles englobent toutes les protéines solubles à pH 4,6. Elles se présentent sous forme d'une chaîne enroulée très serrée en pelote, naturellement non dénaturée. La bêta-lactoglobuline (β -Lg), l'alpha-lactalbumine (α -Lac), la sérumalbumine bovine (BSA) et les immunoglobulines (IgG) sont les protéines majoritaires du lactosérum (Tableau 1.3). Ce sont majoritairement des protéines globulaires présentant une grande sensibilité aux traitements thermiques. La solubilité des protéines sériques est minimale (60%) autour de leur point isoélectrique (pH5) [Snappe *et al.* 2010].

Tableau 1.3 : Propriétés physiques des protéines du lactosérum [d'après Kinghorn *et al.* 1995].

Protéines majeures du lactosérum	Masse molaire	pI	Concentration dans le lactosérum (mg/ml)	% des protéines totales du lactosérum
β -Lg	18 300	5.4	2.0 – 3.0	50
α -Lac	14 200	4.4	0.6 – 1.7	12
BSA	66 000	5.1	0.2 – 0.4	5
IgG	150 000	5.5 -8.3	0.5 – 1.8	10

Les solutions de protéines du lactosérum sont obtenues à partir de poudre de lait remise en solution et précipitation des caséines à pH 4,6 suivi d'une centrifugation de la solution à 10 000g 10 min [Block *et al.* 1998].

3.2 La gomme d'acacia

La gomme d'acacia est un exsudat provenant de l'arbre *Acacia Senegal* [Randall *et al.* 1989]. C'est un polysaccharide de type arabinogalactane fortement ramifié, de haut poids moléculaire et ne développant qu'une faible viscosité dans l'eau [Thevenet 2009]. Son point isoélectrique est à pH 2 [Kravtchenko 1997]. La gomme d'acacia contient une petite fraction de protéine, responsable des propriétés de surface, qui est décrite par le modèle « wattle-blossom ». Dans ce modèle, les fractions polysaccharidiques sont supposées en conformation sphérique (Figure 1.11). La gomme d'acacia est un polymère largement utilisé dans les industries alimentaire et pharmaceutique pour ses propriétés émulsifiantes et son intérêt pour l'encapsulation [McNamee *et al.* 1998; Ali *et al.* 2009, Bouyer *et al.* 2011].

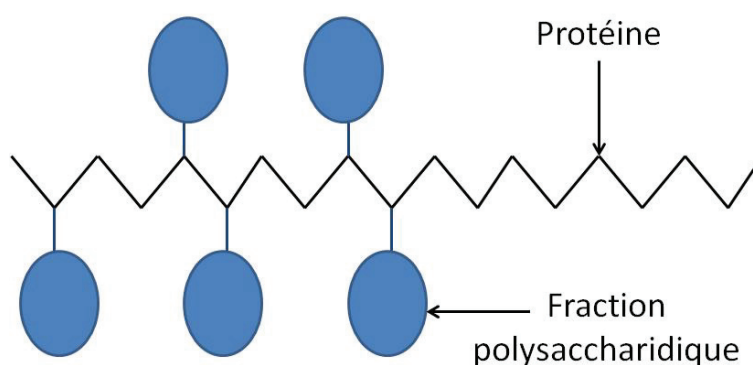


Figure 1.11 : Fraction polysaccharidique de la gomme d'acacia : représentation Wattle Blossom [d'après Thevenet 2009].

3.3 L'huile de lin

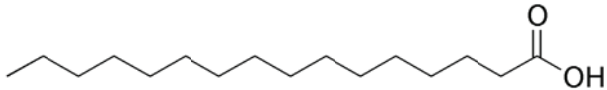
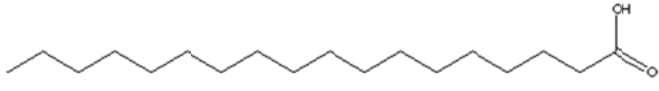
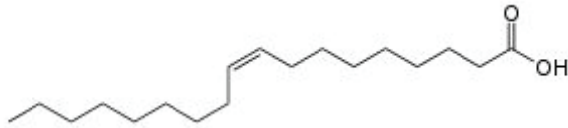
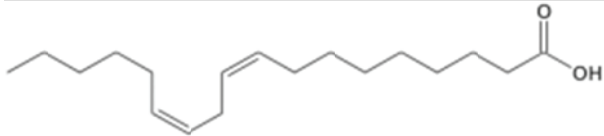
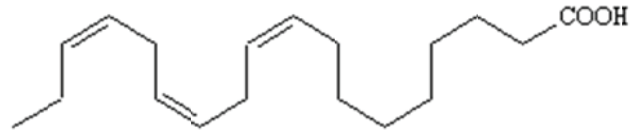
La composition en acide gras de l'huile de lin la rend intéressante pour une utilisation alimentaire. En effet cette huile contient une large proportion d'acide α -linolénique. Mais la quantité élevée d'acides gras polyinsaturés dans l'huile de lin la rend susceptible à l'oxydation [Nykter *et al.* 2006]. Les triglycérides de l'huile de lin sont composés de 5 acides gras :

- Deux saturés : l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0)

- Trois insaturés : l'acide oléique (C18 :1), l'acide linoléique (C18 :2) et l'acide linoléique (C18 :3)

La part de chacun de ces acides gras dans la composition de l'huile de lin est donnée dans le tableau 1.4 [Zovi 2009].

Tableau 1.4: Composition en acides gras de l'huile de lin [d'après Zovi 2009].

Acide palmitique		5-7%
Acide stéarique		4-7%
Acide oléique		17-22%
Acide linoléique		13-18%
Acide linoléique		48-58%

4. Bilan

4.1. La coacervation complexe

Le phénomène de coacervation complexe est étudié depuis de nombreuses années. Ce phénomène a été découvert sur le système gélatine/gomme d'acacia [Bungenberg de Jong 1949] et a suscité l'élaboration de plusieurs modèles théoriques [Overbeek et Voorn 1957, Veis et Aranyi 1960, Nakajima et Sato 1972, Tainaka 1979, 1980].

Depuis la fin des années 1990 la coacervation complexe des protéines de lait et de la gomme d'acacia a commencé à être étudiée. Les systèmes bêta-lactoglobuline/gomme d'acacia et protéines du lactosérum/gomme d'acacia ont été décrits en détail par Schmitt *et al.* (1999, 2000b, 2001 et 2005) et Weinbreck *et al.* (2003a, 2004c,d,e). Dans ces études les conditions optimales de coacervation ont été identifiées. La composition et la structure du coacervat ont également été étudiées. Enfin le mécanisme de séparation de phase a été expliqué comme une succession de plusieurs étapes [Sanchez *et al.* 2006, Mekhloufi *et al.* 2005]. En revanche, l'influence de la composition des protéines laitières sur la coacervation avec la gomme d'acacia n'a été que peu étudié.

Ce système présente un intérêt pour notre étude, où nous ne souhaitons pas utiliser la gélatine. Les conditions générales de coacervation sont connues, mais l'influence de la composition des protéines du lactosérum sur la composition du coacervat doit être étudiée.

4.2. La microencapsulation par coacervation complexe

Bien que le procédé d'encapsulation par coacervation complexe soit connu depuis des dizaines d'années [Green et Schleicher 1956], peu d'études ont été réalisées sur la compréhension de celui-ci. Parmi les études à retenir, on peut citer Madan *et al.* (1972) qui suggère deux mécanismes d'encapsulation et tente d'expliquer l'impossibilité d'encapsuler des particules de taille supérieure à 335 μm . Plus récemment, Weinbreck *et al.* (2004f) ont suggéré un mécanisme d'encapsulation différent pour les petites et les grosses gouttes. L'étude de Lemetter *et al.* (2009) décrit quant à elle l'influence des paramètres de procédés sur la morphologie et la taille des microcapsules. Enfin, la

revue bibliographique de Dardelle et Erni (2013) apporte des informations intéressantes sur les phénomènes de mouillage contrôlant la formation des capsules. Le mécanisme de formation des capsules est donc globalement connu, mais il reste des incertitudes concernant des étapes du procédé conduisant à la formation des capsules. Il est donc utile d'approfondir les études sur les mécanismes.

De plus, la majorité des études et des applications sont basées sur la gélatine alors que son utilisation est rendue plus complexe par la nécessité de chauffer le système. Cette utilisation intensive de la gélatine est probablement due au fait que le phénomène de coacervation complexe a été découvert sur le système gélatine/gomme d'acacia. Ce système fonctionnant très bien, il est resté le système modèle pour beaucoup d'études [Lemetter *et al.* 2009]. Cependant le système protéines du lactosérum/gomme d'acacia a commencé à être utilisé il y a quelques années [Weinbreck *et al.* 2004f] car il présente l'intérêt de pouvoir être utilisé à température ambiante. Il convient donc de développer les études du procédé d'encapsulation sur ce système.

Références

Aberkane L., Jasniewski J., Gaiani C., Scher J., Sanchez C. (2010). Thermodynamic Characterization of Acacia Gum- β -Lactoglobulin Complex Coacervation. *Langmuir*, 26 (15): 12523-12533.

Ali B.H., Ziada A., Blunden G. (2009). Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1-8.

Ammala A. (2013). Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets. *Internal Journal of Cosmetic Science*, 35(2):113-124.

Anal A.K. et Singh H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Food Science & Technology*, 18: 240-251.

Annan N.T., Borza A.D., Truelstrup Hansen L. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 41, 184-193.

Anwar S.H. et Kunz B. (2011). The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105 (2), 367-378.

Argin-Soysal S., Kofinas P., Martin Lo Y. (2009). Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*, 23: 202-209.

Arshady R. (1990). Microspheres and Microcapsules, a Survey of Manufacturing Techniques Part II : Coacervation. *Polymer Engineering and Science*, 30 (75) : 905-914.

Baracat M.M., Nakagawa A.M., Casagrande R., Georgetti S.R., Verri Jr W.A., de Freitas O. (2012). Preparation and Characterization of Microcapsules Based on Biodegradable Polymers : Pectin/Casein Complex for Controlled Drug Release Systems. *AAPS PharmSciTech*, DOI: 10.1208/s12249-012-9752-0.

Block J.D., Merchiers M., Renterghem R.V. (1998). Capillary electrophoresis of the whey protein fraction of milk powders. A possible method for monitoring storage conditions. *Int. Dairy Journal*, 8, 787-792.

Boh B. (2007). Développements et applications industrielles des microcapsules, *Microencapsulation : des sciences aux technologies*, Vandamme T.F., Poncelet D., Subra-Paternault P., Editions TEC & DOC, Lavoisier, 2007.

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

Bungenberg de Jong H.G. (1949). Crystallisation-coacervation-flocculation. Complex colloid systems. H.R. Kruyt (Ed.), Colloid Science, Vol. II, Elsevier, Amsterdam.

Burgess D.J. et Carless J.E. (1986). Microelectrophoretic Studies of Gelatin and Acacia for the Prediction of Complex Coacervation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 98 (1): 1-8.

Burgess D.J. et Carless J.E. (1986). Microelectrophoretic behaviour of gelatin and acacia complex coacervates and indomethacin microcapsules. *International journal of pharmaceutics*, 32: 207-212.

Chai C., Lee J., Huang Q. (2014). The effect of ionic strength on the rheology of pH-induced bovine serum albumin/k-carrageenan coacervates. *LWT-Food Science and Technology*, 59 (1): 356-360.

Champagne C.P. et Fustier P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190.

Chen B., Li H., Ding Y., Suo H. (2012). Formation and microstructural characterization of whey protein isolate/beet pectin coacervations by laccase catalyzed cross-linking. *LWT - Food Science and Technology*, 47: 31-38.

Comunian T.A., Thomazini M., Gouvea Alves A.J., de Matos Junior F.E., de Carvalho Balieiro J.C., Favaro-Trindade C.S. (2013). Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Research International*, 52: 373-379.

Cooper C.L., Dublin P.L., Kayitmazer A.B, Turksen S. (2005). Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10: 52-78.

Costa de Conto L., Ferreira Grosso C.R., Guaraldo Gonçalves L.A. (2013). Chemometry as applied to the production of omega-3 microcapsules by complex coacervation with soy protein isolate and gum Arabic. *LWT - Food Science and Technology*, 53: 218-224.

Da Silva F.L.B. and Jönsson B. (2009). Polyelectrolyte-protein complexation driven by charge regulation. *Soft Matter*, 5, 2862-2868.

Daniels R. et Mittermaier E.M. (1995). Influence of pH adjustment on microcapsules obtained from complex coacervation of gelatin and acacia. *Journal of Microencapsulation*, 12 (6): 591-599.

Dardelle G. et Erni P. (2013). Three-phase interactions and interfacial transport phenomena in coacervate/oil/water systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 206: 79-91.

de Jong N., Visser S. and Olieman C. (1993). Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 652, 207-213.

de Kruif C.G., Weinbreck F., de Vries R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9: 340-349.

Devi N. et Maji T.K. (2010). Genipin crosslinked microcapsules of gelatin A and j-carrageenan polyelectrolyte complex for encapsulation of Neem (*Azadirachta Indica* A.Juss.) seed oil. *Polymer Bulletin*, 65:347–362.

Dickinson E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17: 25-39.

Dickinson E. (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25: 1966-1983.

Dong Z-J., Xia S-Q., Hua S., Hayat K., Zhang X-M., Xu S-Y. (2008). Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63: 41–47.

Dong Z., Ma Y., Hayat K., Jia C., Xia S., Zhang X. (2011). Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering*, 104: 455-460.

Doublier J.-L., Garnier C., Renard D., Sanchez C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 202-214.

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

Gouin S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.

Green B. K. et Schleicher L. (1956). Brevet US2730456 A. Manifold record material.

Gu X-L., Zhu X., Kong X-Z., Tan Y. (2010). Comparisons of simple and complex coacervations for preparation of sprayable insect sex pheromone microcapsules and release control of the encapsulated pheromone molecule. *Journal of Microencapsulation*, 27 (4): 355-364.

Gummel J., Cousin F., Boué F. (2007). Counterions Release from Electrostatic Complexes of Polyelectrolytes and Proteins of Opposite Charge: A Direct Measurement. *Journal of the American Chemical Society*, 129: 5806-5807.

Guo H.L., Zhao X.P. et Wang J.P. (2005). The relation between narrow –dispersed microcapsules and surfactants. *Journal of Microencapsulation*, 22 (8): 853-862.

Huang Y-I., Cheng Y-H., Yu C-C., Tsai T-R., Cham T-M. (2007). Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin–acacia coacervation method: A formaldehyde-free approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58 (2): 290-297.

Hussain M.R. et Maji T.K. (2008). Preparation of genipin cross-linked chitosan-gelatin microcapsules for encapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) using salting-out method. *Journal of Microencapsulation*, 25(6): 414–420.

IUPAC Compendium of Chemical Technology, 1997.

Jizomoto H., Kanaoka E., Sugita K., Hirano K. (1993). Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and gastrointestinal tract. *Pharmaceutical Research*, 10 (8): 1115-1122.

Jones O., Decker E.A., McClements J. (2010). Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids*, 24 (2-3), 239-248.

Jun-xia X., Hai-yan Y., Jian Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125: 1267-1272.

Junyaprasert V.B., Mitrevej A., Sinchaipanid N., Boonme P., Wurster D.E. (2001). Effect of Process Variables on the Microencapsulation of Vitamin A Palmitate by Gelatin-Acacia Coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(6), 561–566.

Kaibara K., Okazaki T., Bohidar H.B., Dubin P.L. (2000). pH-induced coacervation in complexes of bovine serum albumin and cationic polyelectrolytes. *Biomacromolecules*, 1: 100-107.

Kang AR. Park JS, Ju J., Jeong G.S. Lee S-H. (2014). Cell encapsulation via microtechnologies. *Biomaterials*, 35 (9): 2651-2663.

Kinghorn N.M., Norris C.S., Paterson G.R., Otter D.E. (1995). Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analyse bovine whey proteins. *Journal of Chromatography A*, 700, 111-123.

Klein M., Aserin A., Ben Ishai P., Garti N. (2010). Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79: 377-383.

Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., Decker E.A., McClements D.J. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39: 449-457.

Krvtchenko T.P. (1997). Application of acacia gum as a natural source of soluble dietary fibre. *Food Ingredients Europe, Conference Proceedings*, Miller Freeman Plc, Maarssen, Netherlands, 56–60.

Lamprecht A., Schäfer U., Lehr C-M. (2001). Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for Ω -3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. *Journal of Microencapsulation*, 18 (3): 347-357.

Leclercq S., Milo C., Reineccius G.A. (2009). Effects of cross-linking, capsule wall thickness, and compound hydrophobicity on aroma release from complex coacervate microcapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1426-1432.

Lemetter C.Y.G., Meeuse F.M., Zuidam N.J. (2009). Control of the Morphology and the Size of Complex Coacervate Microcapsules During Scale-up. *AIChE Journal*, 55 (6): 1487-1496.

Li W., Wu G., Chen H., Wang M. (2009). Preparation and characterization of gelatin/SDS/NaCMC microcapsules with compact wall structure by complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 333: 133-137.

Li H., Zhu K., Zhou H., Peng W. (2012). Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. *Food Chemistry*, 132: 808–814.

Liu S., Low N.H., Nickerson M.T. (2009). Effect of pH, Salt, Biopolymer Ratio on the Formation of Pea Protein Isolate–Gum Arabic Complexes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4357: 1521–1526.

Liu S., Elmer C., Low N.H., Nickerson M.T. (2010). Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes, *Food Research International*, 43: 489–495.

Liu J., Liu C., Liu Y., Chen M., Hu Y., Yang Z. (2013). Study on the grafting of chitosan–gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109: 103-108.

Lucinda-Silva R.M., Nunes Salgado H.R., Evangelista R.C. (2010). Alginate-chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers*, 81: 260-268.

Lv Y., Zhang X., Abbas S., Karangwa E. (2012). Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. *Journal of Food Engineering*, 111: 225-233.

Madan P.L., Luzzi L.A., Price J.C. (1972). Factors Influencing Microencapsulation of a Waxy Solid by Complex Coacervation. *Journal of Pharmaceutical Science*, 61 (10): 1586-1588.

Magill M. (1990). Microencapsulation for the personal care industry. *Cosmetics and toiletries*, 105 (6): 59-62.

Martins I.M., Barreiro M.F., Coelho M., Rodrigues A.E. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245: 191-200.

Matalanis A., Jones O.G., McClements J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 1865-1880.

Mayya K.S., Bhattacharyya A., Argillier J.F. (2003). Micro-encapsulation by complex coacervation: influence of surfactant. *Polymer International*, 52: 644 – 647.

McClements D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 621–625.

McNamee B.F., O’Riordan E.D., O’Sullivan M. (1998). Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (11), 4551–4555.

Mekhloufi G., Sanchez C., Renard D., Guillemin S., Hardy J. (2005). pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β -Lactoglobulin and Acacia Gum. *Langmuir*, 21: 386-394.

Mendanha D.V., Molina Ortiz S.E., Favaro-Trindade C.S., Mauri A., Monterrey-Quintero E.S., Thomazini M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42: 1099-1104.

Nakajima A. et Sato H. (1972). Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. *Biopolymers*, 10, 1345-1355.

Nesterenko A., Alric I., Silvestre F., Durrieu V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42: 469–479.

Nori M.P., Favaro-Trindade C.S., Alencar S.M., Thomazini S.M., Balieiro J.C.C. (2010). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *Food Science and Technology*, 44: 429–435.

Nykter M., Kymäläinen H-R., Gates F., Sjöberg A-M. (2006). Quality characteristics of edible linseed oil. *Agricultural and Food Science*, 15: 402-413.

Ocak B. (2012). Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. *Journal of Environmental Management*, 100: 22-28.

Onesippe C. (2005). Etude des systèmes polyelectrolyte / tensioactif en phase aqueuse et à l’interface liquide / gaz. Thèse de Doctorat.

Overbeek, J. T. J. et Voorn, M. J. (1957). Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49, 7-26.

Pena C., de la Caba K., Eceiza A., Ruseckaite R., Mondragon I. (2010). Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresource Technology* 101: 6836–6842.

Pérez-Limiñana M.A., Paya-Nohales F.J., Aran-Ais F., Orgilés-Barcelo C. (2014). Effect of the shell-forming polymer ratio on the encapsulation of tea tree oil by complex coacervation as a natural biocide. *Journal of Microencapsulation*, 31 (2): 176-183.

Piacentini E., Giorno L., Dragosavac M.M., Vladislavljjevic G.T., Holdich R.G. (2013). Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatin/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. *Food Research International*, 53 (1): 362-372.

Prata A.S., Zanin M.H.A., Ré M.I., Grosso C.R.F. (2008). Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67: 171–178.

Qu X-Y., Zeng Z-P., Jiang J-G. (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, 25: 1596-1603.

Randall R.C., Phillips G.O., Williams P.A. (1989). Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. *Food Hydrocolloids*, 3, 65-75.

Richard J. et Benoît J.P. (2013). Microencapsulation, *Techniques de l'Ingénieur, traité de Génie des procédés*.

Rocha G.A., Favaro-Trindade C.S., Grosso C.R.F. (2012). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90 (1): 37-42.

Rodriguez Patino J.M. et Pilosof A.M.R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25: 1925-1937.

Sanchez C., Mekhloufi G., Schmitt C., Renard D., Robert P., Lehr C-M., Lamprecht A., Hardy J. (2002). Self-Assembly of β -lactoglobulin and *Acacia Gum* in Aqueous Solvent: Structure and Phase-Ordering Kinetics. *Langmuir*, 18: 10323-10333.

Sanchez C., Mekhloufi G., Renard D. (2006). Complex coacervation between β -lactoglobulin and *Acacia gum*: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299: 867-873.

Saravanan M. et Rao K.P. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 80: 808-816.

Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., Hardy J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Crit Rev Food Sci Nut*, 38: 689-753.

Schmitt C., Sanchez C., Thomas F., Hardy J. (1999). Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13: 483-496.

Schmitt C. (2000a). Etude de la coacervation complexe entre la β -lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. Thèse de doctorat.

Schmitt C., Sanchez C., Despond S., Renard D., Thomas F., Hardy J. (2000b). Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14: 403-413.

Schmitt C., Sanchez C., Lamprecht A., Renard D., Lehr C-M., de Kruif C.G., Hardy J. (2001). Study of β -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 20: 267-280.

Schmitt C., Palma da Silva T., Bovay C., Rami-Shojaei S., Frossard P., Kolodziejczyk, Leser M.E. (2005). Effect of Time on the Interfacial and Foaming Properties of β -Lactoglobulin/Acacia Gum Electrostatic Complexes and Coacervates at pH 4.2. *Langmuir*, 21: 7786-7795.

Siow L-F. et Ong C-S. (2013). Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation. *Food Processing & Technology*, 4 (1).

Snappe J-J., Lepoudere A., Sredzinski N. (2010). Protéines laitières. *Techniques de l'Ingénieur*.

Soper J.C. (1997). US 5603952 A. Method of encapsulating food or flavour particles using warm water fish gelatin, and capsules produced therefrom.

Soper J. C. et Thomas M.T. (2000). US6039901 A. Enzymatically protein encapsulating oil particles by complex coacervation.

Sovilj V.J., Milanovic J.L., Katona J.M., Petrovic L.B. (2010). Preparation of microcapsules containing different contents of different kinds of oils by a segregative coacervation method and their characterization. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75 (5): 615-627.

Strauss G. et Gibson S.M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids* 18: 81–89.

Tainaka, K-I. (1979). Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt Free Systems. *Journal of the Physical Society of Japan* , 46, 1899-1906.

Tainaka, K-I. (1980). Effect of counterions on complex coacervation. *Biopolymers*, 19, 1289-1298.

Thevenet F. (2009). Gomme d'acacia, hydrocolloïde multifonctionnel et nutritionnel. Technique de l'Ingénieur.

Tolstoguzov V.B. (1997). Food proteins and their applications, Marcel Dekker, New York, p. 171.

Trifkovic K.T., Milasinovic N.Z., Djordjevic V.B., Kalagasidis Krusic M.T., Knezevic-Jugovic Z.D., Nedovic V.A., Bugarski B.M. (2014). Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 111: 901-907.

Tsung M. et Burgess D.J. (1997). Preparation and Stabilization of Heparin/Gelatin Complex Coacervate Microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (5): 603-607.

Turgeon S.L., Beaulieu M., Schmitt C., Sanchez C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8, 401-414.

Turgeon S.L., Schmitt C., Sanchez C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12: 166-178.

Veis A. et Aranyi C. (1960). Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *Journal of Physical Chemistry*, 64, 1203-1210.

Veis A. (1963). Phase Separation in Polyelectrolyte Systems. III. Effect of Aggregation and Molecular Weight Heterogeneity. *Journal of Chemical Physics*, 67, 1960-1965.

Veis A., Bodor E. et Mussell S. (1967). Molecular Weight Fractionation and the Self- Suppression of Complex Coacervation. *Biopolymers*, 5, 37-59.

Wal J.M. (2002). Cow's milk proteins/allergens. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 89(6): 3-10.

Wang B., Adhikari B., Barrow C.J. (2014). Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin-sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, 158: 358-365.

Weinbreck, F., De Vries, R., Schrooyen, P., De Kruif, C. G. (2003a). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4(2): 293-303.

Weinbreck F., De Kruif C.G., Schrooyen P. (2003b). WO03106014A1. Complex coacervates containing whey proteins.

Weinbreck F. (2004a). Whey proteins/gum Arabic coacervates: structure and dynamics. Thèse de doctorat.

Weinbreck F., Nieuwenhuijse H., Roijn G.W., de Kruif C.G. (2004b) Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3550-3555.

Weinbreck F., Rollema H.S., Tromp R.H. (2004c). Diffusivity of whey protein and gum Arabic in their coacervates. *Langmuir*, 20: 6389-6395.

Weinbreck F., Wientjes R.H.W., Nieuwenhuijse H., Roijn G.W., de Kruif C.G. (2004d). Rheological properties of whey protein/gum Arabic coacervates. *Journal of Rheology*, 48 (6): 1215-1228.

Weinbreck F., Tromp R.H., de Kruif C.G. (2004e). Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates. *Biomacromolecules*, 5: 1437-1445.

Weinbreck F., Minor M., De Kruif C.G. (2004f). Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates. *Journal of Microencapsulation*, 21 (6): 667-679.

Yeo Y., Bellas E., Firestone W., Langer R., Kohane D.S. (2005). Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7518-7525.

Zhang N. et Mutilangi W. (2013). US13175451. Coacervates complexes, methods and food products.

Zhang K., Zhang H., Hu X., Bao S., Huang H. (2012). Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89: 61-66.

Zhang Z-Q., Pan C-H., Chung D. (2011). Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic coacervate microspheres for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and in vitro release study. *Food Research International*, 44 (4): 1000-1007.

Zovi O. (2009). Fonctionnalisation et photopolymérisation de l'huile de lin en vue de l'élaboration de nouveaux matériaux sans émissions de composés organiques volatiles (COV). Thèse de doctorat.

CHAPITRE 2 :

**Etude de l'influence des principaux
composants des protéines du
lactosérum sur les mécanismes de
coacervation complexe avec la gomme
d'acacia**

CHAPITRE 2 : Etude de l'influence des principaux composants des protéines du lactosérum sur les mécanismes de coacervation complexe avec la gomme d'acacia

L'objectif de ce travail est de déterminer les conditions optimales de coacervation du système protéines du lactosérum/gomme d'acacia, dans le but de l'utiliser dans un procédé d'encapsulation d'huile.

La première étape de cette étude consiste en l'identification des composants du Prolacta (nom commercial des protéines du lactosérum utilisées pour cette étude) par plusieurs méthodes analytiques complémentaires. Puis la coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia a été étudiée en fonction du ratio protéine/polysaccharide (1:1 – 4:1) et du pH (2,0 – 5,5) à une concentration totale en biopolymères constante (1 %).

L'étude de la composition des protéines du lactosérum a permis d'identifier les composants majoritaires qui sont la bêta-lactoglobuline (5,67 mg/mL) et l'alpha-lactalbumine (1,12 mg/mL). L'apparition du coacervat a été observée macroscopiquement. La composition du coacervat a été analysée par électrophorèse capillaire sur gel, cette technique permettant une bonne séparation des protéines du lactosérum. Cette composition dépend du ratio protéine/polysaccharide et du pH. Pour chaque ratio un pH optimum est trouvé. Le pH optimum correspond au pH où on obtient la quantité maximale de coacervat. Ce pH optimum augmente lorsque le ratio protéine/polysaccharide augmente : pH 3,5 pour le ratio 1:1, pH 4 pour le ratio 2:1 et pH 4,5 pour le ratio 4:1.

Ce travail est présenté sous forme de publication, qui doit être soumise au journal Food Hydrocolloids.

Influence of main Whey protein components on the mechanism of complex coacervation with Acacia gum

Delphine Ach^a, Stéphanie Briançon^a, Vincent Dugas^b, Jocelyne Pelletier^a, Guy Broze^c, Yves Chevalier^a

^a *Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, UMR 5007 CNRS, 43 bd du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France*

^b *Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, Institut des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5280, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France*

^c *Prayon, rue J. Wauters 144, 4480 Engis, Belgium*

Abstract

Complex coacervation between whey protein isolate (WPI) and acacia gum was investigated in order to disclose the roles and the contributions of each component of WPI to the formation of the complex coacervate. The main aim was to establish the balance of the main components of WPI, β -lactoglobulin and α -lactalbumin, during the phase separation of complex coacervate particles. The complex coacervation of acacia gum and pure β -lactoglobulin, pure α -lactalbumin, and WPI have been investigated and compared together for that purpose by means of macroscopic observations and capillary gel electrophoresis analyses performed along pH scans from basic to acidic medium. Coacervate composition was influenced by the protein/polysaccharide (Pr:Ps) ratio and pH. An optimum pH for best coacervation yield was found for each Pr:Ps ratio. Non-negligible concentrations of β -lactoglobulin and α -lactalbumin remain in solution in most instances. β -lactoglobulin undergoes complex coacervation stronger than α -lactalbumin in their competitive coacervation of WPI and acacia gum.

Keywords: complex coacervation, phase separation, capillary electrophoresis, whey protein isolate

1. Introduction

Proteins and polysaccharides are widely used polymers in the food industry especially in emulsions and encapsulation based products (Matalanis, Jones & McClements, 2011; Bouyer *et al.*, 2011; Jones, Decker & McClements, 2010). Two different biopolymers mixed together may either form a one-phase or a two-phase system. Biopolymers mixtures often undergo a phase separation. Two types of phase separation can be observed in biopolymers mixtures: the segregative phase separation and the associative phase separation. The segregative phase separation occurs when the protein and the polysaccharide are repelling each other because of their thermodynamic incompatibility, whereas the associative phase separation occurs in case of attractive interaction between a protein and a polysaccharide (Mc Clements, 2006; Turgeon, Beaulieu, Schmitt & Sanchez, 2003; Doublier, Garnier, Renard & Sanchez, 2000). An associative phase separation of electrostatic origin between the two polyelectrolytes of opposite electrical charges takes place in the case of complex coacervation. The complexation of protein and polyelectrolytes is driven by a charge regulation control, as described in Da Silva & Jönsson (2009); this phenomenon is named complex coacervation.

The main origin of complex coacervation is an associative phase separation phenomenon induced by electrostatic interactions between at least two macromolecules, typically a protein and a polysaccharide of opposites charges (Cooper, Dublin, Kayitmazer & Turksen, 2005). But other weak interactions, such as hydrogen bonding and hydrophobic interactions, can contribute to the formation of complex coacervates (Turgeon, Schmitt & Sanchez, 2007). The associative phase separation induces the formation of neutral soluble complexes which exhibit an attractive interaction (de Kruif, Weinbreck & de Vries, 2004). Such complexes undergo precipitation into liquid droplets that possibly settle to form the coacervated phase (Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon & Hardy, 1998). Though complex coacervation is a phase separation that can be considered as a precipitation, the complex coacervate particles are extensively swollen by water and better look like microgel particles in suspension in water. After complexation each biopolymer can be found both in the coacervates

and to a small extent, in solution in the aqueous phase (Veis, 2011). Gelatin/acacia gum polymer pair is one of the first and most widely used complex coacervation system (Jizomoto, 1985; Burgess & Carless, 1984). Gelatin/acacia gum coacervates exhibit a wide range of useful functionalities for the development of food products such as thickening, gelling, foaming and emulsifying abilities (Schmitt & Turgeon, 2011). Coacervates are also used for nano- or microencapsulation of various lipophilic compounds, food ingredients and pharmaceuticals (Turgeon, Schmitt & Sanchez, 2007; Mellema, 2004; Junyaprasert *et al.*, 2001; Jizomoto, 1984).

Whey proteins isolate/acacia gum (WPI/AG) is another biopolymer system used for complex coacervation, where WPI is used to replace gelatin. It was previously shown that the interaction between WPI and AG is mainly driven by the interaction of β -lactoglobulin (β -lg) with acacia gum. Indeed β -lg is the major component of WPI on the one hand; the second major component is α -lactalbumin (α -lac). In addition, the higher isoelectric point of β -lg (pH = 5.2) compared to α -lac (pH = 4.1) leads to the formation of β -lg/AG complexes earlier than the α -lac/AG complexes as the pH is lowered from above the isoelectric point (Weinbreck, de Vries, Schrooyen & de Kruif, 2003).

The effect of pH, protein to polysaccharide ratio (Pr:Ps), ionic strength and total biopolymer concentration on complex coacervates formation has been studied in WPI/AG and β -lg/AG systems. For the WPI:AG system, complex coacervation has been observed in a pH range from 3 to 5 for mixtures of 10 wt% biopolymers and a 3:1 Pr:Ps ratio. Only very weak interactions were observed between the two polymers at higher pH (between pH 5 and 7) (Klein, Aserin, Ben Ishai & Garti, 2010). The optimum pH of complex coacervation was found at 4.0 for a 2:1 Pr:Ps ratio. At this pH, phase separation occurred the fastest and the final coacervate volume was the largest. Varying the protein to polysaccharide ratio (Pr:Ps) shifted the optimum pH to higher values when Pr:Ps was increased. Such shift of optimum pH was probably due to variations of the concentrations of residual soluble species as the Pr:Ps ratio was varied. It was also shown that increasing the ionic strength led to a less concentrated and poorly structured coacervate phase, induced by the screening of the electrostatic

interactions (Weinbreck, Tromp & de Kruif, 2004). The electrostatic nature of the interactions between β -lg and acacia gum has also been pointed out according to the pH dependence of the phase separation, together with the influence of the protein to polysaccharide ratio and the total biopolymer concentration (Schmitt, Sanchez, Thomas & Hardy, 1999). Finally, changes in β -lg/AG complex coacervation were observed in the presence of β -lg aggregates. The simultaneous formation of spherical vesicular coacervates and precipitates were observed when the β -lg solution contained aggregates, whereas only coacervates were observed in aggregate-free β -lg solution. Removal of protein aggregates can be performed by centrifugation ($RCF = 10,000g$ for 1 h at pH 4.75) (Schmitt et al., 2000).

In WPI/AG complex coacervation system three transitions have been observed in pH scan down to acidic medium. The formation of soluble complexes was observed first, thereafter phase separation took place in a second stage, and the last event was the dissociation of the complexes as the isoelectric point of acacia gum is approached (Weinbreck, de Vries, Schrooyen & de Kruif, 2003). A more detailed picture of complex coacervation has been obtained with the β -lg/AG system. It is described as a nucleation and growth type process where the phase separation is delayed with respect to the formation of the insoluble complexes because a high enough supersaturation is required for nucleation to operate (Sanchez, Mekhloufi & Renard, 2006). Evidence of six pH-induced structural transitions has been given during complex coacervation between β -lg and acacia gum at a 2:1 ratio. Characteristic stages are the initiation of the interactions at pH 4.9, the aggregation of complexes at pH 4.6, the nucleation of phase separation at pH 4.4, the massive phase separation at pH 4.2, the observation of large spherical coacervates by optical microscopy at pH 4.0 and morphological changes of coacervates at pH 3.8 (Mekhloufi *et al.*, 2005). The thermodynamic mechanisms of β -lg/AG binding processes at pH 4.2 include two different binding steps, a first exothermic step enthalpically-driven and a second endothermic step entropically-driven (Aberkane *et al.*, 2010).

The main objective of the present work was to gain a deeper understanding of complex coacervation between the several components of WPI and acacia gum. Commercial WPI was mainly composed of β -lg and α -lac. The precise composition of the commercial WPI used for this study was firstly determined. Then the formation of complex coacervates in WPI/AG, β -lg/AG and α -lac/AG systems was investigated. The fraction of β -lg and α -lac involved in WPI/AG complex coacervates as a function of pH and biopolymer ratio was determined by capillary electrophoresis.

2. Material and methods

2.1. Materials

Whey protein isolate (Prolacta® 95) was a gift from Lactalis Ingredients (Bourgbarré, France). The powder contained 95% protein with respect to full dry matter. Acacia gum (AG), β -lactoglobulin (β -lg), α -lactalbumin (α -lac), and hydrochloric acid were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water of 18 M Ω .cm was used.

2.2. Preparation of polymers solutions

Whey proteins isolate (WPI), β -lg, α -lac and acacia gum were dispersed in deionized water and mixed under gentle stirring at room temperature until complete dissolution. The concentrations of WPI solutions were 10 mg.mL⁻¹ for capillary electrophoresis assays and 100 mg.mL⁻¹ for SDS-PAGE analyses. Complex coacervation studies were carried out with polymer solutions at 10 mg.mL⁻¹.

2.3. SDS-PAGE

The identification of β -lg in WPI was carried out by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS). 5 samples of 1 to 3 μ L of WPI solution were deposited in five wells and 10 μ L of bromophenol blue were added to each samples. Molecular weights were estimated using Fermentas electrophoresis protein standard (PageRuler™ Unstained Protein Ladder). The stacking gel and the separation gel were 10% acrylamide. After electrophoresis, gels were fixed

for 30 min, destaining was carried out overnight until the background color has completely disappeared, and images of the destained gels were taken.

2.4. Capillary gel electrophoresis (CGE)

Capillary gel electrophoresis was performed using the Agilent HP CE 3D system equipped with a diode array detector and computer controlled via the Agilent 3D-CE ChemStation software. Buffers were from ProteomeLab SDS-MW Analysis Kit (Beckman Coulter). A fused-silica capillary (35 cm total length with a detection window at 8.5 cm and 50 μm I.D.) was used with a SDS-Gel Separation Buffer. Samples were diluted in SDS Sample Buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0/1% SDS) and then injected electrokinetically (-8 kV, 20 s). The separation voltage was -17.5 kV with U.V. detection at 220 nm. Analyses were performed at 20°C. The measurement uncertainty was 4% ($n = 6$).

2.5. Elisa quantitative analysis of casein

A microtiter plate coated with anti-casein antibodies was used. A solution of WPI was prepared at 1% in deionized water. Half of the solution was purified as described in the next paragraph. Purified and not purified solutions of WPI were diluted to 1/1000 before analysis following the assay procedure given in the test instruction (Test Instruction – Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of bovine Casein in Food, Libios). The absorbance at 450 nm was measured with a microplate reader (TECAN Infinite 200 PRO). Casein Standards (0, 0.2, 0.6, 2, 6 ppm of casein) were prepared and analyzed simultaneously to the samples to obtain a standard curve, which logarithm regression was $y = 0.348 \ln(x) + 0.7788$ ($R^2 = 0.9511$). The limit of detection of the casein was 0.04 ppm and the limit of quantification was 0.2 ppm.

2.6. Whey protein isolate composition

WPI composition was studied by four different techniques: SDS-PAGE electrophoresis, capillary electrophoresis, casein ELISA quantitative analysis and macroscopic observations. Analyses were performed on two kinds of samples. One sample consisted in a solution of WPI as described in section 2.2. The other sample was acidified at pH 4.75 with hydrochloric acid, centrifuged at

7830 rpm for 30 min, as described in Weinbreck *et al.* (2003) to remove whey protein aggregates. The supernatant was recovered and analyzed. Solutions of β -lg and α -lac were analyzed by capillary electrophoresis to compare their electrophoregrams to those of whey protein isolate. Standard solutions of β -lg and α -lac (between 2 and 10 mg.mL⁻¹) were used to determine the β -lg and α -lac concentrations in WPI sample.

2.7. Whey protein isolate complex coacervation

WPI solution was acidified at pH 4.75 and centrifuged at 7830 rpm for 30 min. The supernatant was recovered and mixed with acacia gum at Pr:Ps ratios 4:1, 2:1, and 1:1. Then pH was progressively lowered from 5.5 to 2.0 by addition of hydrochloric acid under moderate magnetic stirring. Samples were aged at room temperature for 24 h to ensure full phase separation and sedimentation of complex coacervates. Pictures were taken at this stage. Supernatants were recovered (cloudy samples were centrifuged) and analyzed for β -lg and α -lac.

2.8. β -lactoglobulin and α -lactalbumin complex coacervation

β -lg was mixed at a ratio of 2:1 with acacia gum, and the pH was lowered from 5.5 to 3.0 by addition of hydrochloric acid under moderate magnetic stirring. Thereafter the same protocol as for WPI was applied. α -lac was mixed at a ratio of 1:1 with acacia gum, and the pH was lowered from 7.0 to 2.0 by addition of hydrochloric acid under moderate magnetic stirring. Thereafter the same protocol as for WPI was applied.

3. Results and discussion

3.1. Whey protein isolate composition

3.1.1. SDS-PAGE

SDS-PAGE patterns of WPI solutions of three different concentrations are shown in Fig. 2.1. The results indicate the presence of two broad bands between 10 and 20 kDa which can be identified as β -lg (18 kDa) and α -lac (14 kDa). These molar masses were previously determined by Léonil *et al.* (1995). Capillary electrophoresis was performed to separate these proteins and to determine their

concentrations as reported in section 3.1.3. A band corresponding to a molar mass around 20 kDa seemed to correspond to caseins which molar masses determined by Léonil *et al.* (1995) were between 19 and 25 kDa. Such proteins were not presumed being present in the WPI according to the supplier's information. Quantitative ELISA analysis of casein was performed to confirm the presence of casein in the samples as reported in section 3.1.4. At least two bands were isolated between 60 and 80 kDa, which were identified as bovine serum albumin (66 kDa) and lactoferrin (80 kDa) according to Alomirah & Alli (2004) and Lönnnerdal & Iyer (1995).

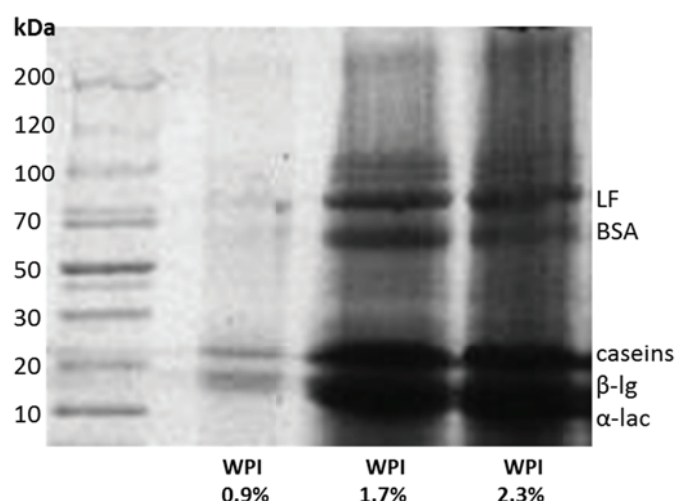


Figure 2.1: SDS-PAGE electrophoresis gel of whey protein isolate (β -lg: β -lactoglobulin, α -lac: α -lactalbumin, BSA: bovine serum albumin, LF: lactoferrin).

3.1.2. Macroscopic observations

As the WPI solution was acidified from pH 6.5 to pH 3.1, it became cloudy at pH 5.4 and this turbid aspect lasted until pH 3.6 (Fig. 2.2). Moreover a white precipitate was observed between pH 5.2 and pH 4.1. The turbidity and the precipitation were pH-dependent. These phase transitions were reversible, as the turbidity and the precipitate disappeared if the pH was increased again. The first appearance of the precipitate matched with the pH of caseins's precipitation which occurs at pH 4.6 according to Léonil *et al.* (1995). Moreover according to Stading & Hermansson (1990), protein aggregates are formed in β -lg solutions between pH 4 and pH 6. The solubility curve of β -lg revealed

that it was less soluble around its isoelectric point. The lowest solubility of β -lg was obtained at pH 4.75 and protein aggregates were observed in the solution at this pH (Schmitt et al., 2000). Thus, in order to remove protein aggregates from the WPI solution, the pH was decreased until 4.75 to precipitate insoluble materials, which were then removed by centrifugation at 7,830 rpm for 30 min at 25°C.

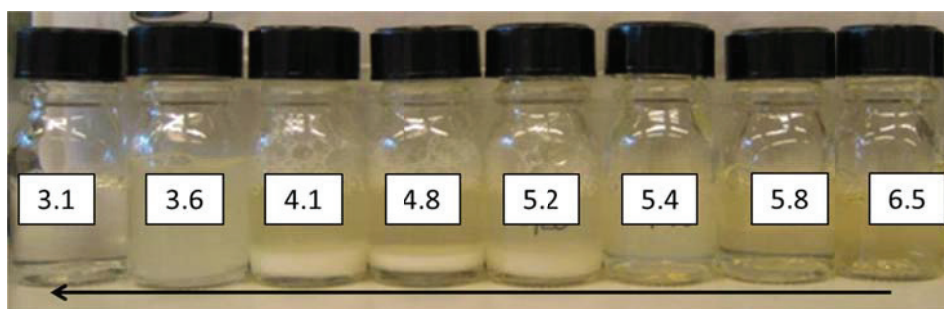


Figure 2.2 : WPI solution (5.5%) as a function of pH. Formation of precipitates between pH 5.2 and 4.1.

3.1.3. Capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis was performed on WPI, β -lg and α -lac. Analysis of WPI solutions before and after removal of precipitate was performed in order to disclose the composition of the precipitate. Electrophoregrams of these analyses (Fig. 2.3.) showed the disappearance of two peaks after the removal of precipitate. The locations of such peaks corresponded to molar masses between 20 and 35 kDa. Accordingly, two hypotheses could be put forward. These two peaks could either correspond to the dimeric form of β -lg or to casein. The dimeric form of β -lg is only present in solution between pH 5.1 and pH 8.0 (Stading & Hermansson, 1990). However the pH of the sample buffer being 9.0, only monomeric form should be present in the sample. Therefore these two peaks probably revealed the presence of casein considering that casein precipitation occurs at pH 4.6 (Léonil *et al.*, 1995). Casein aggregates have been removed by the acidic treatment followed by centrifugation. This later point has been confirmed by the quantitative analysis of casein (section 3.1.4).

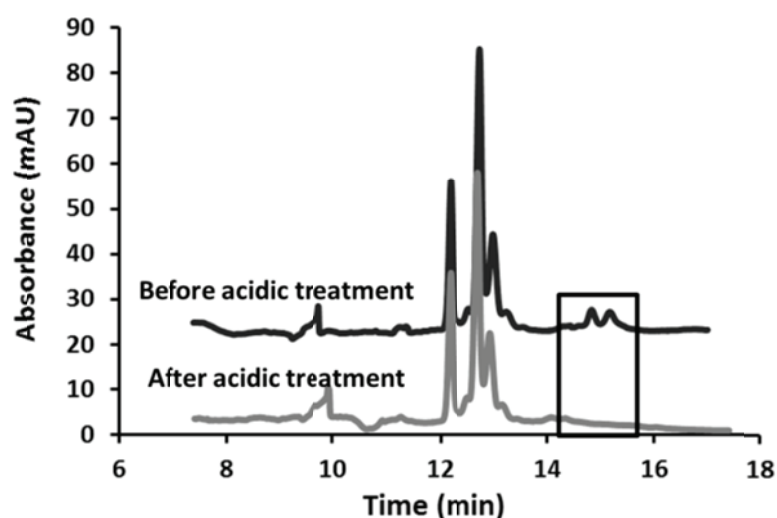


Figure 2.3: WPI electrophoregrams obtained by capillary gel electrophoresis (SDS-MW). Evidence of two peaks disappearance after acidic treatment.

Capillary gel electrophoresis was also used to identify β -lg and α -lac in the WPI sample (Fig. 2.4). These proteins were identified properly after the analysis of pure samples of β -lg and α -lac. Standard solutions of β -lg and α -lac (between 2 and 10 mg.mL⁻¹) were analyzed and standard curves were established by plotting the mean peak areas versus concentrations in mg.mL⁻¹. Linear regression of β -lg and α -lac standard curves are $y = 1164.1 \times (R^2 = 0.9914)$ and $y = 1710 \times (R^2 = 0.9934)$ respectively. Areas under β -lg and α -lac peaks were measured on WPI samples before and after acidic treatment. So it was determined that a WPI solution of Prolacta at 10 mg.mL⁻¹ concentration contained 5.67 mg.mL⁻¹ of β -lg (56.7%) and 1.12 mg.mL⁻¹ of α -lac (11.2%). The concentration of β -lg decreased to 5.35 mg.mL⁻¹ after the acidic treatment, while the concentration of α -lac remained constant. A slight decrease of the β -lg concentration was noticed after acidic treatment, which could be explained by the formation of some β -lg oligomers at pH 4.75 and their elimination by centrifugation (Schmitt et al., 2000) together with casein.

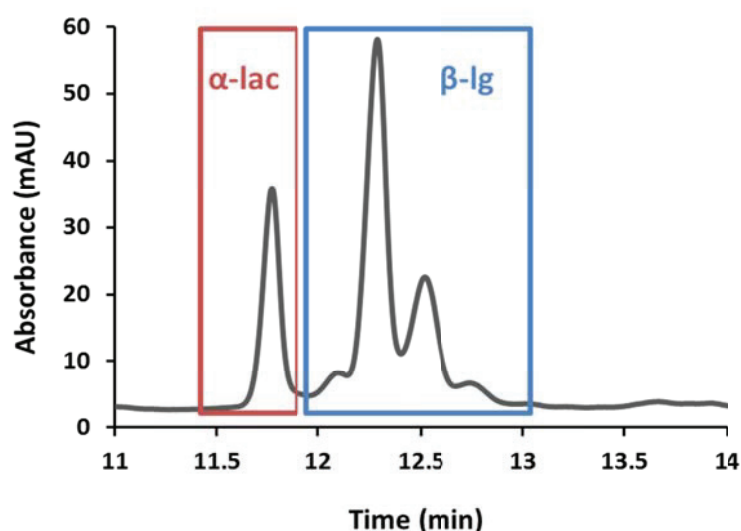


Figure 2.4: WPI electrophoregram obtained by capillary gel electrophoresis (SDS-MW). Identification of the peaks of β -lg and α -lac.

3.1.4. Quantitative Elisa analysis of casein

This analysis was performed on WPI before and after the acidic treatment. The mean absorbances at 450 nm of WPI before and after the acidic treatment were 0.52 and 0.14 respectively, corresponding to concentrations of 0.48 mg.mL^{-1} and 0 mg.mL^{-1} of casein respectively, according to the calibration curve. Indeed there is a 0.14 background absorbance of the kit. So it can be concluded that the WPI samples contained casein that was totally removed by the acidic treatment followed by centrifugation. The precipitate that was removed contained the full casein content of WPI and a small fraction of β -lg.

3.2. Complex coacervation of whey protein isolate

3.2.1. Macroscopic observations

After ageing at room temperature for 24 h, samples of WPI/AG solutions were observed macroscopically (Fig. 2.5). Complex coacervate formed with each of the three Pr:Ps ratios studied. The turbidity appeared in the solutions at a pH depending on the Pr:Ps ratio, pH 5.0 (x on Fig. 2.5) for 4:1 ratio and pH 4.5 (x on Fig. 2.5) for 1:1 and 2:1 ratios. The raising turbidity could correspond to the formation of soluble complexes, which made the solutions cloudy without any precipitation. Indeed

solutions stayed cloudy after 24 h ageing while little or no sedimentation occurred. These complexes are presumed electrically neutral, the pH being close to the isoelectric point (*iep*) of whey proteins (isoelectric points are: α -lac *iep* = 4.1, and β -lg *iep* = 5.2). Phase separation of a coacervate phase settled to the bottom of the vials was clearly observed between pH 3.4 and 3.1 (○ on Fig. 2.5) for a Pr:Ps ratio 1:1, and between pH 4.0 and pH 3.1 (○ on Fig. 2.5) for Pr:Ps ratios 2:1 and 4:1. Interactions between whey proteins and acacia gum were previously observed between pH 3 and pH 5 (Klein, Aserin, Ben Ishai & Garti, 2010). Three phases have been identified by Weinbreck *et al.* (2003): soluble polymers, soluble complexes, and association of complexes. The formation of soluble complexes was observed at pH 5.3 and the association of complexes, driving to phase separation was observed at pH 4.8, with a total concentration of biopolymers of 1 mg.mL⁻¹ and a Pr:Ps ratio of 2:1. The coacervated phase decreased in volume and finally vanished at the most acidic pH (below pH 3.1). This was probably due to the decrease of electrostatic interactions because the negative charges of acacia gum decrease when pH is approaching the *iep* of acacia gum at pH 2. Acacia gum is negatively charged above pH 2 (Kravtchenko, 1997). The pH for coacervate phase appearance increased with the Pr:Ps ratio. This observation is in accordance with the results of Weinbreck *et al.* (2004), who showed that increasing the Pr:Ps shifted the optimum pH to higher values. The authors explained this phenomenon by the requirement for a higher positive charge of the protein (lower pH) to balance the higher amount of negatively charged acacia gum at low Pr:Ps ratio.

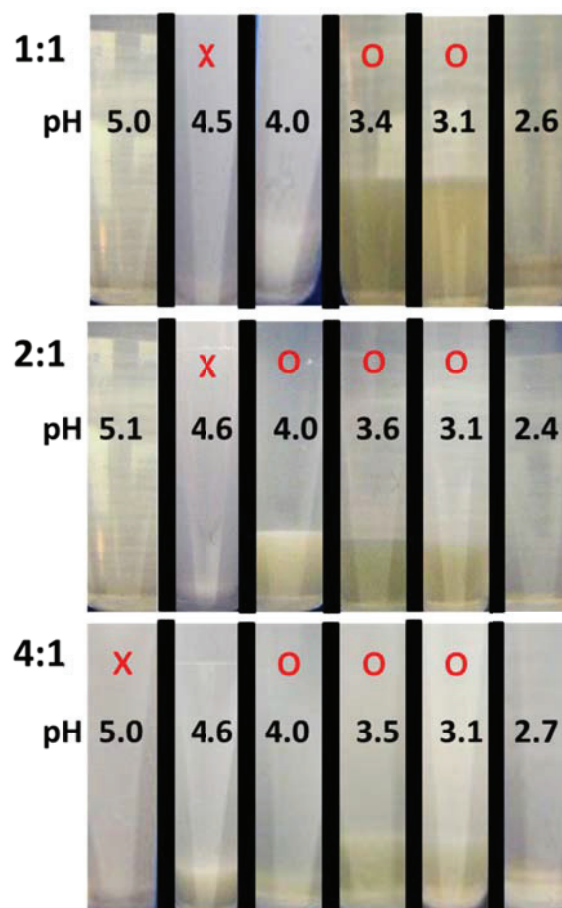


Figure 2.5: WPI/AG complex coacervation as a function of the Pr:Ps ratio (1:1, 2:1 and 4:1) and pH (between 5 and around 2.5). The turbidity apparition is represented by x and the phase separation is represented by o.

3.2.2. Capillary electrophoresis

β -lg and α -lac were quantified by capillary gel electrophoresis in the WPI/AG solutions coexisting with the coacervate for Pr:Ps ratio of 4:1, 2:1 and 1:1 after solution ageing at room temperature for 24 h (Fig. 2.6). For the Pr:Ps ratio of 1:1 (Fig. 2.6A), concentrations of β -lg and α -lac were close to the initial concentrations of each protein in the mixture (2.6 and 0.54 mg.mL⁻¹ respectively) when the pH was varied from 4.9 to pH 4.5. Upon a further decrease of pH to 3.5, the concentration of both proteins progressively decreased. Indeed the complexation of the proteins with acacia gum precipitated and formed a pellet, so that the protein concentration remaining in the supernatant decreased. Minimum β -lg and α -lac concentrations were 0.5 and 0.07 mg.mL⁻¹ respectively. They were observed at pH 3.5 which corresponded to the maximum yield of complex coacervation. Finally

the protein concentrations increased again below pH 2.3. At this pH β -lg and α -lac concentrations were 1.5 mg.mL^{-1} and 0.4 mg.mL^{-1} respectively. The increase of the protein content in the supernatant at acidic pH proved the dissociation of the complexes. Similar trends were observed for the 2:1 ratio (Fig. 2.6B). The behavior was the same for the 4:1 Pr:Ps ratio (Fig. 2.6C); but the decrease of protein concentration appeared at a higher pH, i.e. at pH 4.5. These results showed that complex coacervation occurred at a pH value depending on the Pr:Ps ratio, as previously pointed out by Weinbreck *et al.* (2004). In their study the optimum conditions for coacervation were reached at pH 3.5 for a Pr:Ps ratio of 1:1, at pH 4 for a Pr:Ps ratio of 2:1, and at pH 4.5 for a Pr:Ps ratio of 8:1. The decrease of β -lg concentration as a function of pH was stronger than that of α -lac (Fig. 2.6). β -lg was the predominant protein in the complex coacervation phenomenon observed between WPI and acacia gum as already highlighted by Weinbreck *et al.* (2003). The concentration decrease of α -lac was more important at the pH of optimum coacervation when the Pr:Ps ratio was low (Fig. 2.7). Decreasing the Pr:Ps ratio resulted in more free acacia gum molecules available for association with α -lac molecules. The presence of a larger amount of free acacia gum molecules after complexation with β -lg at low Pr:Ps ratio promoted their association with α -lac as the pH approached its isoelectric point. The variation of proteins concentrations in the supernatant against pH (Fig. 2.7) gave evidence of a shift in the pH value inducing the decrease of protein concentrations when the Pr:Ps ratio increased. Such shift toward lower pH values was observed for both proteins (β -lg and α -lac) and illustrated that the pH of complex coacervation depended on the Pr:Ps ratio. These results were in accordance with the macroscopic observations.

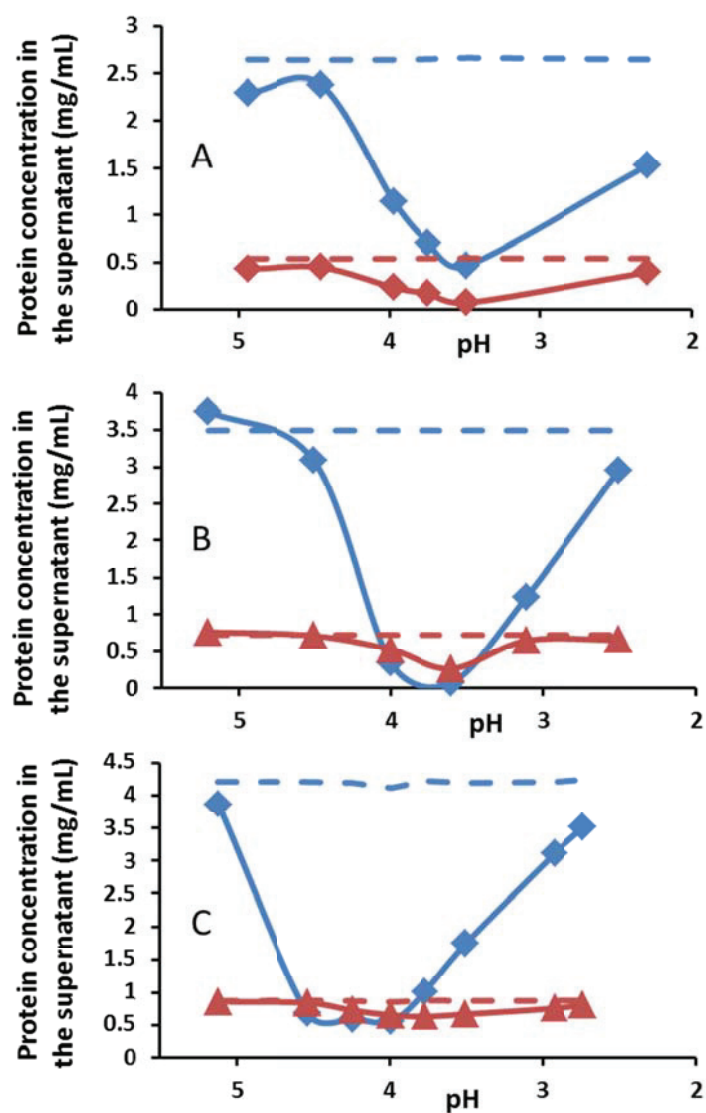


Figure 2.6: Protein concentration in the supernatant as a function of pH for the Pr:Ps ratio 1:1 (A), 2:1 (B) and 4:1 (C) [blue diamonds: β -lg concentration; red triangles: α -lac concentration; dashed lines: initial proteins concentrations]. pH values are presented in descending order because experimentations were performed by decreasing the pH upon addition of hydrochloric acid.

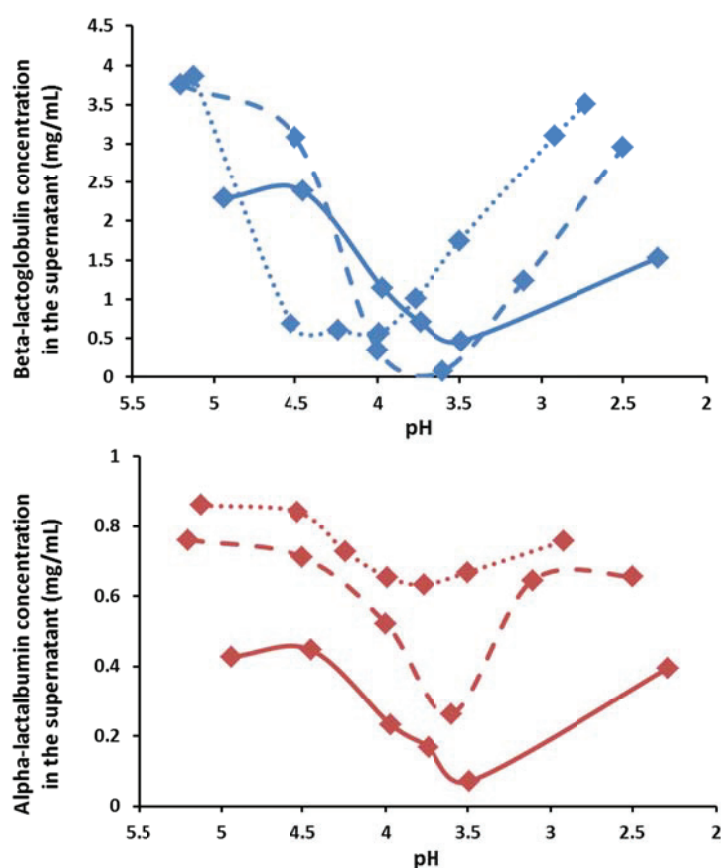


Figure 2.7: β -lg (blue) and α -lac (red) concentrations in the supernatant as a function of pH for the Pr:Ps ratios (1:1: full line, 2:1: dashed line, 4:1: dotted line).

3.3. β -lactoglobulin complex coacervation

3.3.1. Macroscopic observations

Macroscopic changes observed in β -lg/AG mixed solutions were induced by acidification followed by ageing at room temperature for 24 h (Fig. 2.8). No changes were observed at pH 6.0 where both β -lg and AG were negatively charged. The solution turned turbid at pH 4.8 for Pr:Ps ratio of 2:1; this was followed by phase separation between pH 4.1 and pH 3.4. Turbidity corresponded to the formation of soluble complexes. As the pH decreased further, the complexes formed aggregates that grew and settled. The initiation of interactions and the formation of coacervates between β -lg and AG have previously been described at pH 4.90 and pH 4.24 (Sanchez, Mekhloufi & Renard, 2006; Mekhloufi *et al.*, 2005). Redissolution took place at pH 2.7 as in the case of the WPI/AG system. Complex

coacervate formation has also been observed in solutions with a β -lg/AG ratio of 1:1 between pH 4.6 and pH 2.7 (data not shown).

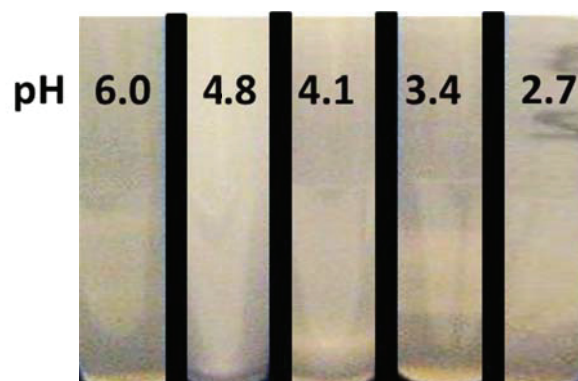


Figure 2.8: Macroscopic observations of β -lg/AG complex coacervation. Solutions at 1% polymers with Pr:Ps ratio of 2:1, between pH 6.0 and pH 2.7, after 24h of phase separation.

3.3.2. Capillary electrophoresis

Quantification of β -lg in solution was performed by capillary gel electrophoresis as a function of pH after acid addition and 24 h ageing (Fig. 2.9). The concentration of β -lg was close to initial concentration (6.7 mg.mL^{-1}) at pH 5.4, as previously described with WPI. Then a decrease of the β -lg concentration, down to 1 mg.mL^{-1} , was observed in the supernatant of mixtures between pH 4.9 and pH 3.7. The decrease of the concentration of β -lg in the supernatant matched the formation of complex coacervates between β -lg and acacia gum. Complex coacervates sedimented after 24 h ageing, so that the protein concentrations which were measured in the supernatant corresponded to proteins which have not formed complexes with acacia gum. When pH was further decreased to 3.0, β -lg concentration increased and finally reached 4 mg.mL^{-1} . This increase of β -lg concentration in the supernatant corresponded to the dissociation of polymer complexes.

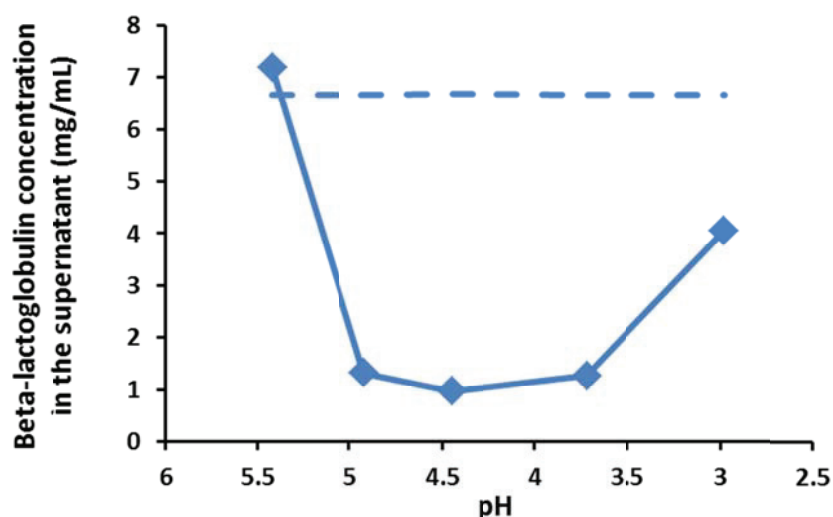


Figure 2.9: β -lg concentration in the supernatant, after 24 h of phase separation of β -lg/AG solutions, as a function of pH for the Pr:Ps ratio 2:1. The dashed line marks the full concentration of β -lg.

3.4. α -lactalbumin complex coacervation

3.4.1. Macroscopic observations

The behavior of α -lac and the corresponding macroscopic observations (Fig. 2.10) were fully similar to that of β -lg, but shifted along the pH range. For Pr:Ps ratio of 1:1 according to the same protocols as for β -lg and WPI, no change was observed between pH 5.0 and 4.1, turbidity appeared at pH 3.5 followed by phase separation between pH 2.8 and pH 2.3. Such changes corresponded to the formation of soluble complexes at pH 3.5 followed by the association of complexes, leading to sedimentation between pH 2.8 and pH 2.3. Phase separation disappeared at pH 1.6. Formation of complex coacervates appeared at lower pH with α -lac than with β -lg. Such pH shift was due to the more acidic isoelectric point of α -lac. Complex coacervate formation has also been observed in solutions with an α -lac/AG ratio of 1:2 between pH 2.8 and pH 2.0 (data not shown).

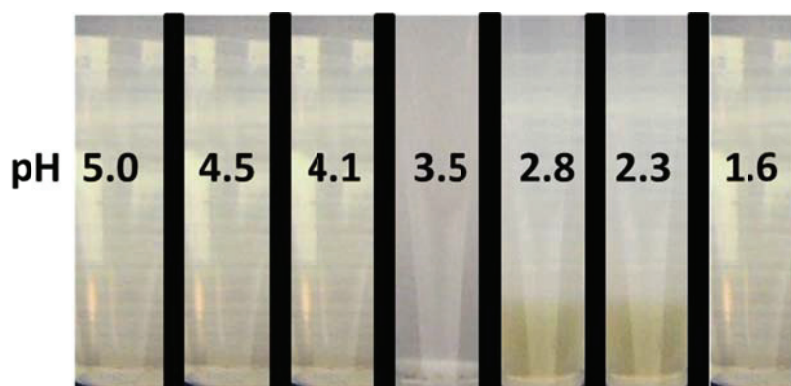


Figure 2.10: Macroscopic observations of α -lac/AG complex coacervation. Solutions at 1% polymers with Pr:Ps ratio of 1:1, between pH 6.0 and pH 2.7, after 24 h of phase separation.

3.4.2. Capillary electrophoresis

Quantitative analysis of α -lac by capillary gel electrophoresis was also performed as for β -lg and WPI. The results were in full accordance with the macroscopic observations and similar to that of β -lg but shifted with respect to pH (Fig. 2.11). Starting with a concentrations of α -lac of 5 mg.mL^{-1} mixed with acacia gum at a Pr:Ps ratio of 1:1, this concentration was observed at pH 4.7, 4.3 and 2.1. A decrease of α -lac concentration down to a minimum of 2 mg.mL^{-1} was observed in the supernatant of mixtures between pH 3.9 and pH 3.0.

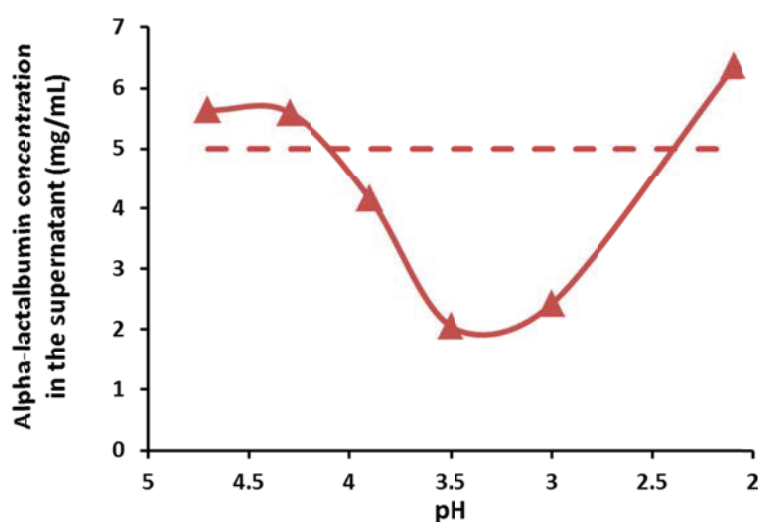


Figure 2.11: α -lac concentration in the supernatant, after 24h of phase separation of α -lac/AG solutions, as a function of pH for a Pr:Ps ratio of 1:1. The dashed line marks the full concentration of α -lac.

4. Conclusion

A full balance of the chemical composition of the coexisting complex coacervates and solution phases was achieved during the complex coacervation of WPI and acacia gum by means of lowering the pH. Indeed WPI is a complex mixture of several components. Its analysis showed that the two main components were β -lactoglobulin (56.7%) and α -lactalbumin (11.2%). The presence of casein caused the formation of a precipitate that disturbed the complex coacervation process. Therefore it is wise to perform a purification of the WPI solution by precipitation of casein before used. Macroscopic observations coupled with capillary electrophoresis analyses allowed reaching an improved view over the balance of β -lg and α -lac during the course of the complex coacervation process. The chemical composition of the coacervates depends on the Pr:Ps ratio and pH. An optimum coacervation pH was determined for each Pr:Ps ratio. Residual soluble species are present in aqueous solution in most cases; full phase separation of either β -lg or α -lac took place in very scarce instances. Pure β -lg and α -lac species are able to form complex coacervates with acacia gum. In the WPI mixture, β -lg is more involved than α -lac in the complex coacervation phenomenon because β -lg is the main species of WPI and mainly because the isoelectric point of β -lg is higher than that of α -lac. But this observation depends on the Pr:Ps ratio. As an outcome, the present results could be used for a better control over the encapsulation process by complex coacervation.

Acknowledgments

Thanks to Prayon S.A. for the financial support to present work.

We are grateful to Mr. Olivier Marcillat (Université Lyon 1, ICBMS – UMR 5246) for his efficient assistance in SDS-PAGE experimentations and Mrs. Sandra Balvay (Université Lyon 1, MATEIS – UMR 5510) for her help in microplate reading.

References

- Aberkane L., Jasniowski J., Gaiani C., Scher J., Sanchez C. (2010). Thermodynamic characterization of Acacia gum- β -lactoglobulin complex coacervation. *Langmuir*, 26 (15), 12523-12533.
- Alomirah H.F. and Alli I. (2004). Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations. *International Dairy Journal*, 14, 411-419.
- Bouyer E., Mekhloufi G., Le Potier I., du Fou de Kerdaniel T., Grossiord J.-L., Rosilio V., Agnely F. (2011). Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by β -lactoglobulin and gum arabic. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354, 467-477.
- Burgess D.J. and Carless J.E. (1984). Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 98 (1), 1-8.
- Cooper C.L., Dublin P.L., Kayitmazer A.B., Turksen S. (2005). Polyelectrolyte-protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, 52-78.
- da Silva F.L.B. and Jönsson B. (2009). Polyelectrolyte-protein complexation driven by charge regulation. *Soft Matter*, 5, 2862-2868.
- de Kruif C.G., Weinbreck F., de Vries R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 340-349.
- Doublier J.-L., Garnier C., Renard D., Sanchez C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 202-214.
- Jizomoto H. (1984). Phase separation induced in gelatin-base coacervation systems by addition of water-soluble nonionic polymers I: Microencapsulation. *Journal of Pharmaceutical Science*, 73 (7), 879-882.
- Jizomoto H. (1985). Phase separation induced in gelatin-base coacervation systems by addition of water-soluble nonionic polymers II: Effect of molecular weight. *Journal of Pharmaceutical Science*, 74 (4), 469-472.
- Jones O., Decker E.A., McClements J. (2010). Thermal analysis of β -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles. *Food Hydrocolloids*, 24 (2-3), 239-248.
- Junyaprasert V.B., Mitrevej A., Sinchaipanid N., Boonme P., Wurster D.A. (2001). Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27 (6), 561-566.
- Klein M., Aserin A., Ben Ishai P., Garti N. (2010). Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 377-383.
- Kravtchenko T.P. (1997). Application of acacia gum as a natural source of soluble dietary fibre. Food Ingredients Europe, Conference Proceedings, Miller Freeman Plc, Maarssen, Netherlands, 56-60.
- Léonil J., Mollé D., Gaucheron F., Arpino P., Guénou P., Maubois J.L. (1995). Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Lait*, 75, 193-210.
- Lönnerdal B. and Iyer S. (1995). Lactoferrin: Molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*, 15, 93-110.

- Matalanis A., Jones O.G., McClements J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 1865-1880.
- Mc Clements D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 621–625.
- Mekhloufi G., Sanchez C., Renard D., Guillemin S., Hardy J. (2005). pH-induced structural transitions during complexation and coacervation of β -lactoglobulin and acacia gum. *Langmuir*, 21, 386-394.
- Mellema M. (2004). Complex coacervate encapsulate comprising lipophilic core. PCT Int. Appl. WO 2004054702 A1 20040701.
- Sanchez C., Mekhloufi G., Renard D. (2006). Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299, 867-873.
- Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., Hardy J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689-753.
- Schmitt C., Sanchez C., Thomas F., Hardy J. (1999). Complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 13, 483-496.
- Schmitt C., Sanchez C., Despond S., Renard D., Thomas F., Hardy J. (2000). Effect of proteins aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, 14, 403-413.
- Schmitt C., Turgeon S.L. (2011). Protein/Polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, 63-70.
- Stading M. and Hermansson A.M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4 (2), 121-135.
- Turgeon S.L., Beaulieu M., Schmitt C., Sanchez C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8, 401-414.
- Turgeon S.L., Schmitt C., Sanchez C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 166-178.
- Veis A. (2011). A review of the early development of the thermodynamics of the complex coacervation phase separation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167, 2-11.
- Weinbreck F., de Vries R., Schrooyen P., de Kruif C.G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Weinbreck F., Tromp R.H., de Kruif C.G. (2004). Composition and structure of whey protein/gum Arabic coacervates. *Biomacromolecules*, 5, 1437-1445.

CHAPITRE 3 :

**Le procédé d'encapsulation
par coacervation complexe :
étude approfondie de l'étape
d'émulsification**

CHAPITRE 3 : Le procédé d'encapsulation par coacervation complexe : étude approfondie de l'étape d'émulsification

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre l'influence de l'étape d'émulsification, première étape du procédé d'encapsulation, sur la formation et les caractéristiques des microcapsules obtenues.

Dans un premier temps, l'influence des paramètres d'émulsification sur le diamètre moyen des gouttes d'huile a été étudiée, au moyen de mesures granulométriques et d'analyse d'images. Les émulsions ont été réalisées en cuve agitée, l'hélice marine a été comparée à la turbine Rushton. Les caractéristiques physico-chimiques des deux phases de l'émulsion ont été mesurées (densité, viscosité, tension de surface). Le nombre de Reynolds a été calculé pour les différentes conditions étudiées. Puis la morphologie des microcapsules obtenues a été étudiée par microscopie optique. Et enfin le suivi *in situ* du procédé d'encapsulation a permis de mettre en évidence le dépôt du coacervat à la surface des gouttes d'huile.

Les conditions d'émulsification étudiées sont le type d'agitateur (hélice marine ou turbine Rushton), la vitesse d'agitation (800 à 1200 rpm) et la durée d'émulsification (15 à 45 min). Il a été observé que les tailles de gouttes de l'émulsion sont similaires avec l'hélice marine et la turbine Rushton. Il a été mis en évidence que le régime d'écoulement de l'étape d'émulsification est le régime intermédiaire. Cependant l'utilisation d'un modèle de régime turbulent rend bien compte des résultats expérimentaux et pourrait être utilisée pour une transposition d'échelle. Il a également été mis en évidence que la taille des microcapsules est contrôlée par la taille des gouttes d'émulsion, et que des microcapsules polynucléées peuvent être formées en fonction des conditions d'agitation lors de la phase de coacervation. L'installation d'une sonde vidéo dans le réacteur a permis de suivre *in situ* les différentes étapes du procédé d'encapsulation.

Ce travail a été présenté en communication orale au congrès SFGP2013 et accepté pour publication dans le Canadian Journal of Chemical Engineering.

Formation of microcapsules by complex coacervation

*Delphine Ach^a, Stéphanie Briançon^a, Guy Broze^b, François Puel^a, Alain Rivoire^a, Jean-Marc Galvan^c,
Yves Chevalier^a*

*^a Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, UMR 5007 CNRS, 43 bd du
11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France*

^b Prayon, rue J. Wauters 144, 4480 Engis, Belgium

^c Université Lyon 1, INL UMR5270, CPE-Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

Abstract

The process of encapsulation by complex coacervation includes several steps that have been investigated in order to reach a better control over the whole process. This has been carried out for the encapsulation of linseed oil by the classical gelatin/acacia gum pair of coacervating polymers. Fabrication of an oil-in-water emulsion is the first step that has been studied so as to reach a definite picture of the emulsification process under intermediate flow regime in a stirred unbaffled vessel. The classical scheme of oil droplet break-up by turbulent eddies in the turbulent inertial regime gave a fair agreement with the experiments and can be used as a possible framework for a process scale-up. Polynuclear microcapsules containing several oil droplets have been obtained during the deposition of the coacervate onto the surface of oil droplets. According to the emulsification conditions and microparticles growth caused by multiple droplets encapsulation, microcapsules of $\sim 130\ \mu\text{m}$ were produced. A video probe immersed in the stirred vessel allowed an *in situ* monitoring of the successive events taking place as acid was added into the medium. This technique allows dynamic observations of microcapsules formation. These observations confirmed the deposition of coacervate droplets around oil drops and clearly showed that the formation of coacervate particles and their deposition onto oil droplets were successive events.

Keywords: Microencapsulation, Complex coacervation, In situ optical probe.

1. Introduction

Microencapsulation is widely used in the food industry in order to achieve various goals: protect sensitive ingredients from oxidation or hydrolysis, mask unpleasant taste, transform liquid droplets into solid particles, and allow controlled release of food additives.^[1,2] Indeed many functional food components would benefit from being encapsulated, such as vitamins, antioxidants, flavors, phytosterols, carotenoids and fatty acids.^[3-8] Microcapsules are mostly made of an internal liquid core containing either the pure active ingredient or its solution in oil, and a shell made of polymer. It is required that the polymer shell is thick and rigid in order to ensure an efficient separation of the inner core and the surrounding medium, slow down the diffusion of the active ingredient to the external medium, and build a mechanically rigid layer that provide a powder consistency to the dry microcapsules. It is also expected that the mass ratio of the active ingredient to the polymer wall is large for the encapsulation rate is high. An obvious geometrical consequence is that microcapsules should be large; typical particle diameters of microcapsules are in the 100 μm range.^[9,10]

Microencapsulation most often relies on building a polymer wall around oil droplets of an emulsion. Chemical processes (interfacial polymerization) and physicochemical processes (coacervation) can be used for that purpose.^[9,10] Encapsulation by complex coacervation consists in the precipitation of an insoluble material, a coacervate, and its deposition at the surface of oil droplets so as to build a wall of polymer material. Complex coacervation is a phase separation phenomenon induced by electrostatic interactions between polymers of opposite electrical charge, most often biopolymers such as proteins and polysaccharides. Complex coacervation takes place in the mixed solution of two polymers when a shift of the pH across the isoelectric point of one polymeric partner leaves the two polymers with opposite electrical charges. The association of the macromolecules induces the formation of insoluble complexes that undergo an associative phase separation into liquid droplets made of water-swollen complex species.^[11-13] Gelatin/acacia gum system is the most widely used pair of biopolymers for the microencapsulation by the complex coacervation process.^[14-16]

Microencapsulation by the complex coacervation process relies on the phase separation of "complex coacervate" particles and their subsequent deposition onto the surface of emulsified oil droplets or particles of an active ingredient.^[1,9,10] The process of microencapsulation by complex coacervation of the classical pair gelatin/acacia gum is starting with an aqueous solution of gelatin and acacia gum at a pH 6-7 above both their isoelectric point and at 50-60°C, above the denaturation temperature of gelatin. At this stage both gelatin and acacia gum are negatively charged; acacia gum is fully soluble in water and denaturated gelatin is partly soluble and partly present as a fine suspension of hydrocolloid. The process consists in five steps: (1) dispersion of the active ingredient as o/w droplets in the hydrocolloids aqueous solution; (2) phase separation of the hydrocolloids induced by a shift of pH below the isoelectric point of gelatin (pH 4.5); (3) deposition of coacervate particles around the droplets of active ingredient dispersed in the aqueous solution; (4) hardening/gelation of the microcapsule walls by cooling the suspension below the gelation temperature of gelatin; (5) chemically cross-linking the coacervate of the microcapsules walls.^[17] The process ends with washing the microcapsules and possibly drying them. Two main conditions are required to allow successful microencapsulation by coacervation: the compatibility of the core material with the coacervate, and the insolubility of the core material in the coacervation medium.^[18] Two mechanisms have been proposed to explain the formation of microcapsules of oil: (i) progressive coating of the core droplets by particles of coacervate as they form in the aqueous phase of the emulsion, or (ii) formation of large coacervate drops in the aqueous phase followed by their heterocoagulation with oil droplets.^[18,19] Process (i) results in a clean encapsulation of each oil droplet provided that the complete wetting condition of the oil droplets by the coacervate material is ensured. Process (ii) may result in more complex morphologies of the microcapsules when several coacervate particles and several oil droplets stick together into a single microcapsule. Some studies have shown that large microparticles were not fully encapsulated, due to incomplete coverage of the core particles by the coacervate particles.^[19,20] It has also been reported that small oil droplets of diameter smaller than 50 µm could be encapsulated into a matrix of coacervate material more easily

than large droplets.^[20] In such case, the polymer complexes do not form a homogeneous thick film at the surface of oil droplets. The mixed films can be subdivided in two layers: first mostly composed of protein, and second composed of protein/polysaccharide complexes. Differences in the structure of the layers of biopolymers were observed depending on whether they were formed by simultaneous or by sequential adsorption and whether the coacervate particles were neutral or negatively charged.^[21,22] At the end, three different types of microcapsules can be obtained by complex coacervation: mononuclear microcapsules where each oil droplet have formed a microcapsule, polynuclear microcapsules that contain several oil droplets, and complex clusters of coacervate particles and oil droplets called “grape coacervates”.^[23] Each type of microcapsule is formed under specific conditions. The size of mononuclear capsules is related to the oil droplet diameter, which is controlled by the settings of the emulsification step, and coacervate layer thickness. Formation of polynuclear microcapsules can be controlled by the shear rate during coacervation. Finally, the formation of “grape coacervates” seems influenced by the temperature and duration of the gelation step.^[23]

Microencapsulation by complex coacervation has been extensively investigated and the influence of process parameters on microcapsules size distribution and morphology is well documented. Emulsification process influences size of oil droplets, and large oil droplets are often partially encapsulated.^[19,20] The rate of stirring affected the size of oil cores encapsulated within the microcapsules.^[7] The design of the vessel influences size distributions of microspheres and microcapsules. The average particle size is directly proportional to polymer concentration and volume of the polymer phase, and inversely proportional to the rate of stirring and the concentration of the stabilizer. Viscosities of both the coacervate phase and the coacervation medium also influence the size of the resulting microspheres/microcapsules.^[18] In some studies surfactants were added to control the size of microcapsules. The presence of surfactants in o/w emulsion systems affects the oil uptake by complex coacervate droplets, depending on the HLB value of the surfactant.^[24] The use of large concentrations of sodium dodecyl sulfate surfactant causes a decrease

in the average diameter of microcapsules.^[17] In spite of this large body of experimental evidences that suggests a behaviour similar to a classical emulsification process, the above mentioned troubles and the beneficial addition of classical emulsifiers suggest that the emulsification using gelatin (or a protein) as emulsifier makes the emulsification more tricky than usually.

As a summary, in spite of quite an extensive work on the complex coacervation encapsulation process, the control over the efficiency of the encapsulation and the microcapsule morphology remains largely empirical. Several fundamental mechanisms pertaining to the coacervate precipitation/deposition remain open issues, and the control of the process is still a matter of case-by-case optimization work to be done.

The present work addresses such issues towards two directions:

- Assess the process parameters that allow the control of the deposition of the coacervate particles onto the surface of oil droplets. Such part of the work consists in a systematic comparison of the size distributions of the emulsion droplets and the microcapsules. This is performed by laser small-angle light scattering monitoring of the particle size distributions better than analyses of optical microscopy pictures.

- Investigate the coacervate precipitation and deposition processes by means of in line monitoring the oil droplets and coacervate particles by means of *in situ* observations with a video probe. The process conditions responsible for the mononuclear or polynuclear microcapsules formation can be studied inside the stirred reactor. A video probe was used for the first time for *in situ* monitoring the complex coacervation process, and its utility is demonstrated.

In line observations in stirred reactors using a video probe have already been applied successfully to *in situ* monitor emulsification, crystallization and crystallization-in-emulsion processes.^[25-27] But this technique has not yet been applied to encapsulation by complex coacervation although the quite large microparticles produced in such a process should make them easy to observe.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Gelatin from bovine skin, type B with gel strength of approximately 225g bloom, and gum arabic from acacia tree, branched polysaccharide with a molar mass of approximately 250,000 were purchased from Sigma-Aldrich. Raw linseed oil and glutaraldehyde solution, 50% in water, were purchased from Fisher Scientific.

2.2. Preparation of emulsions

Stock dispersions of gelatin 3%(w/w) were prepared at ambient temperature under magnetic stirring. 100 mL of gelatin dispersion was heated under moderate stirring rate (300 rpm) in a 400 mL cylindrical vessel of 70 mm diameter immersed in a water bath at 55°C to allow dissolution of gelatin above its denaturation temperature. Then 10 g of linseed oil were added into the solution and emulsified for different stirring times (15, 30 and 45 min) at different rotation rates of the propellers moved by a IKA motor (800, 1,000 and 1,200 rpm). An axial flow profiled three blade marine-type propeller of 38 mm diameter and a radial flow six flat blade disk turbine (Rushton turbine) of 35 mm diameter were used.

2.3. Preparation of microcapsules

Microencapsulation by complex coacervation was carried out in a 300 mL double jacketed cylindrical vessel with flat bottom and 60 mm internal diameter. Stirring was ensured by a marine propeller of 38 mm diameter rotated by a IKA motor. Temperature was regulated by an external thermostatic bath that made water circulating in the double jacket. pH was measured inside the reactor with a Radiometer PHM210 MeterLab pH-meter equipped with a 170 mm long electrode (InLab®Routine-L, Mettler Toledo). Stock dispersions of gelatin 3%(w/w) and acacia gum 3%(w/w) were prepared at ambient temperature under magnetic stirring. 100 mL of gelatin dispersion was heated at 55°C under moderate stirring rate (300 rpm); 10 g of linseed oil were added into the solution of gelatin and emulsified for 15 min at 1,000 rpm. After the formation of the emulsion, 100 mL of hot acacia gum

solution was added into the emulsion at the stirring speed of 300 rpm. The pH was 4.9 at this stage. The pH was progressively shifted down to 4.1 by addition of hydrochloric acid. After coacervate microcapsules have been observed by optical microscopy, the solution was cooled down to 5°C. Glutaraldehyde was finally added to the system and the temperature was increased to 25°C. After a cross-linking time of 2h30, stirring was stopped, the microcapsules were allowed to cream to the top, they were collected, rinsed with deionized water and kept in aqueous suspension for storage.

2.4. Particle size distribution analysis

The size distribution of the oil droplets was measured by small-angle light scattering using a Beckman Coulter LS 13320 Laser diffraction Particle Size Analyser. Samples were diluted in water till the obscuration of the suspension reached 10%, the scattered light was recorded with a multi-angle detector and converted into the particle size distribution using the Mie theory. The refractive indices used in the calculations were 1.33 for water and 1.48 for linseed oil. The final result was the average of at least three measurements.

The size of the microcapsules was measured by image analysis with the ImageJ[®] software. This technique was preferred to light scattering because of the non-spherical shape of microcapsules. Spherical shape is a condition for the use of Mie calculations implemented in the software of the Coulter granulometer. The measured diameters were defined as the distance between the two corners of the “eye”-shaped microcapsules.

2.5. Microscopic observations

The morphology of oil droplets and microcapsules suspended in water was observed by optical microscopy in transmission mode using a Leica DMLM microscope. Samples were deposited on microscope slides (without cover slip) and pictures were taken with a camera ColorView and image-analyzed using the software analySIS (Olympus).

2.6. Viscosity measurements

The viscosities of the two phases of the emulsions, linseed oil and 3% (w/w) gelatin solution, were measured at 55°C using a Rheomat RM100 rheometer equipped with a DYN11 Couette measuring cell with coaxial cylinders. Full flow behaviors of both liquids were recorded between 10 s^{-1} and 1500 s^{-1} shear rate. Linseed oil displayed Newtonian behavior; the viscosity was calculated as the slope of the linear flow curve (shear stress τ against shear strain rate $\dot{\gamma}$), giving $\eta = 18\text{ mPa.s}$. The 3% (w/w) gelatin solution showed shear-thickening behavior. Its flow curve has been modeled as a power-law behavior: $\tau = K\dot{\gamma}^n$ with $K = 5.5 \times 10^{-5}\text{ Pa}$ and $n = 1.65$, giving $\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}$.

2.7. Interfacial tension measurements

The surface tension and interfacial tensions between the two phases of the emulsions were measured at 55°C by the pendant drop method using a Krüss DSA10 mk2 drop shape analysis tensiometer temperature-regulated by circulation of water in a double jacketed thermostatic chamber. Pictures of pendant drops at the tip of a syringe needle were taken and their profile was analyzed for the surface or interfacial tension. Surface tensions were measured from pendant drop of the liquids formed at the blunt tip of a 1.5 mm syringe needle. A pendant drop of gelatin solution was formed in linseed oil medium at the blunt tip of a 0.5 mm syringe needle for measurements of the interfacial tension. The densities of linseed oil and 3%(w/w) gelatin solution at 55°C measured with a pycnometer were taken as $907,98\text{ kg.m}^{-3}$ and $995,10\text{ kg.m}^{-3}$ respectively.

2.8. *In situ* monitoring by video probe

In situ monitoring microencapsulation process was carried out in a 1 L cylindrical vessel of 85 mm diameter immersed in a water bath at 55°C. Two stirrers located on the same mechanical shaft were used in combination. The propeller generated a circulating axial flow in order to obtain a good uniformity in the vessel. In the same time the turbine ensured an efficient dispersion of the droplets when the flow was in its disrupting zone as shown in Figure 1. This experimental set-up was used to permit the immersion of the probe without disrupting microcapsules formation. The video and pH

probes dipped in the medium played the role of baffles, avoiding the vortex formation. The emulsion was realized in an aqueous solution (800 mL) containing both gelatin and acacia gum. Oil concentration was 4.8%(w/w).

The *in situ* video microscope probe EZ PROBE D25 L1200® designed in our laboratory was immersed in the vessel (Figure 3.1).^[25-27] This probe was already used to study emulsification process.^[25] This is an evolution of a previous probe used to monitor crystallization process.^[26,27] This optical probe allows real time recording of 2D images of the droplets at a rate of 50 frames per second. It was equipped with Light Emitting Diode (LED) back lighting driven by a pulse generator triggered by the video camera. This brought a flash light synchronized with the recording of the video camera to a gap of several hundreds of micrometers width where the emulsion flowed. The blurring by motion was eliminated by a pulse illumination of 50 μ s. The back-lighting allowed the visualization of droplets shadows which appeared black on a white background. The transmitted light illuminated a CCD video camera. The frame has the following specifications: image size of 640×480 pixels, resolution up to 2.0 μ m, 256 grey levels. This resulted in an optical field of 1300×960 μ m². A USB video grabber retrieved the video data and sent it to a computer.^[25]

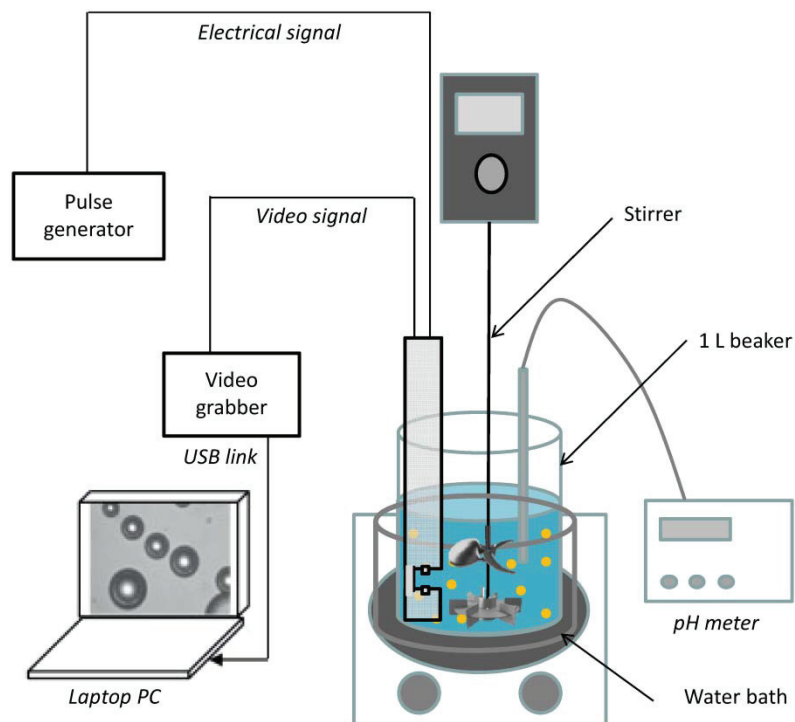


Figure 3.1: Experimental set-up for the microencapsulation by complex coacervation with the *in situ* video probe.

3. Results and discussion

3.1. Influence of emulsion process parameters on o/w emulsion droplets mean diameter

The three main parameters that control the droplet size distribution were investigated: the propeller type (either Rushton disk turbine or marine-type propeller), the rotation rate and the duration of the emulsification.^[28] The range of stirring rates was restricted such that the emulsion could be utilized farther for the microencapsulation, that is, droplet diameters ranging between 50 and 100 μm . Too slow rotation led to large droplets that creamed very fast unless vigorous stirring was applied during the coacervation step. High shear rate allowed producing smaller oil droplets that gave small microcapsules having a low oil-to-coacervate ratio (low encapsulation rate). High shear rate also caused uptake of air bubbles, which is unacceptable because they get encapsulated during the subsequent coacervation step. The droplet diameters were much larger than those prevailing in most emulsions. As a consequence, the range of shear rates in the emulsification process was slower than

in usual emulsification processes. Rotation rates of the stirrers ranged between 800 and 1,200 rpm. This is quite a narrow range for investigating the characteristics of the emulsification process. The stirrer rates should nevertheless be restricted within a narrow range because a slower rotation rate led to too large emulsion droplets and faster rates caused air entrapment. The rotation rates investigated are within the range that meets the requirements of the application to encapsulation.

In order to assess the features of the present emulsification process, the relevant physicochemical characteristics of the two phases of the emulsions were measured at 55°C: density, viscosity, surface and interfacial tension (Table 3.1). The Reynolds numbers of the impellers were between 3,000 and 7,000 for rotation rates between 800 and 1,200 rpm (Table 3.2). The flow in the tank was neither laminar ($Re > 10$) nor turbulent ($Re < 10^4$); it was in the intermediate regime between the two. The viscosities of the oil and aqueous phases were quite low and close to each other. Such viscosity conditions are optimum regarding the emulsification process.^[28]

Table 3.1: Physicochemical characteristics of linseed oil and 3%(w/w) gelatin solution at 55°C: density, viscosity, surface and interfacial tension.

	Density (kg.m ⁻³)	Viscosity (mPa.s)	Surface tension (mN.m ⁻¹)	Interfacial tension (mN.m ⁻¹)
Linseed oil	907.98	18	31.1	6.3
Gelatin solution 3%(w/w)	995.10	0.055 $\dot{\gamma}^{0.65}$	48.7	

Table 3.2. Parameters of the process modeling.

	Rotation rate, N (rpm)	Viscosity of the gelatin solution, η_c (mPa.s)	Reynolds number, Re	Weber number, We	Mean specific power density, ε (W.kg ⁻¹)	Mean shear rate, $\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	Kolmogorov microscale, λ (μm)	Maximum droplet diameter, d_{max} (μm)	Experimental $d(90)$ after 30 min stirring (μm)
Rushton turbine, $N_p = 5$	800	5.07	3210	1200	5.66	1050	69.5	62.0	136
	1000	5.98	3400	1880	11.10	1360	66.6	47.5	110
	1200	6.84	3570	2710	19.10	1670	64.2	38.1	90
Marine propeller, $N_p = 0.4$	800	3.02	6340	1540	0.68	474	80.0	58.1	120
	1000	3.56	6730	2410	1.33	611	76.5	44.4	108
	1200	4.07	7060	3470	2.31	751	73.8	35.7	83

Therefore, the emulsification conditions implemented in the complex coacervation encapsulation process were quite specific. The flow was intermediate between laminar and turbulent whereas emulsification is usually performed under turbulent flow. The phases were quite fluid; their viscosities were such that the emulsification process was quite efficient. Finally, the expected droplet

diameters were higher than in conventional emulsions. Owing to such peculiarities, the emulsification process is worth being investigated in more details.

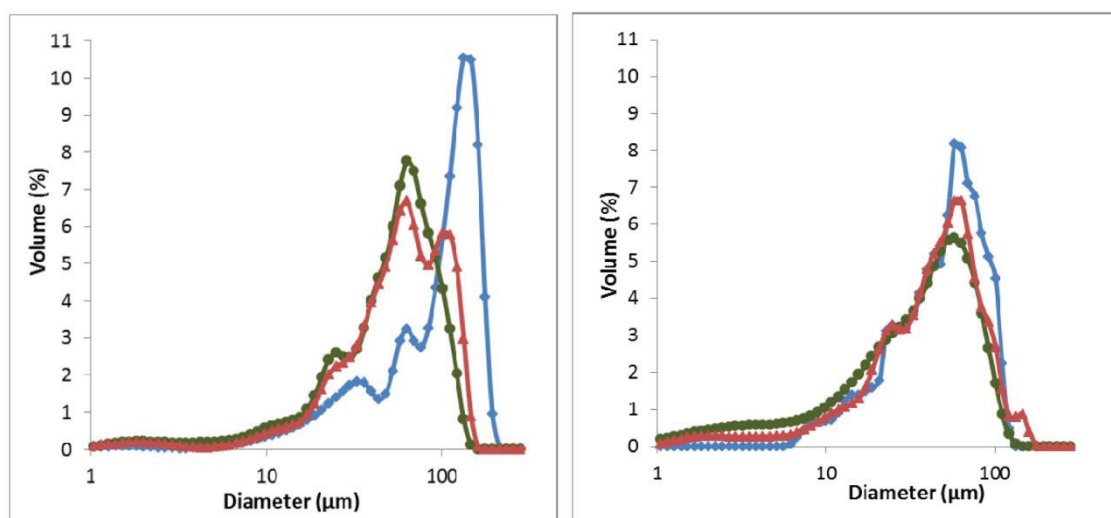


Figure 3.2: Size distributions of o/w emulsions droplets prepared with a three blades marine propeller at rotation rate of 800 rpm (A) and 1,200 rpm (B). Emulsification times of 15 min (blue diamonds), 30 min (green circles), and 45 min (red triangles) are given.

Two types of impellers were investigated: a three blades marine-type propeller and a six flat blades disk Rushton turbine that are well-suited for low-viscous media.^[28] Their flow characteristics are quite different however, since the propeller causes axial flow whereas the Rushton turbine causes radial flow and stronger shear in the vicinity of its blades (in its disrupting zone). These two impellers were compared in emulsification experiments performed at the same rotation rates varying between 800 and 1,200 rpm and for emulsification times of 15 min, 30 min and 45 min. The droplet size distributions varied with respect to the emulsification duration (Figure 3.2). At the lowest rotation rate (800 rpm), the droplet size distribution was quite broad after 15 min of emulsification, the droplet size distribution turned narrower as the stirring time was increased. The size of smallest droplets did not change as the emulsification was proceeding; narrowing the droplet size distribution was the result of the largest droplets being fragmented into smaller ones. A rough picture of the events taking place in the emulsification process is a fragmentation of the oil droplets in an inhomogeneous flow where large droplets were produced in the regions of low shear rate, in

quiescent zones far away from the stirrer, and the smallest droplets were produced in the highest shear zones in the vicinity of the impellers blades. The droplets size distribution was a picture of the shear rate distribution in the tank at the beginning of the emulsification. The droplet size distribution turned narrower as the droplets circulated in the flow and experienced high shear when they passed regularly close to the impellers blades. The droplet size distribution after 30 min and 45 min were similar at all stirring rates. The regime where the size distribution no longer depended on duration was reached faster at higher stirring rates because the fragmentation rate was faster. Thus, the droplet size distributions for 15 min, 30 min and 45 min duration were similar for the fastest rotation rate of 1,200 rpm. Emulsification for 30 min was enough for ensuring the narrowest droplet size distribution and a robust process that yielded similar oil droplets whatever the emulsification duration. Such a regime could result from two possible phenomena. Either all the droplets have been fragmented to such small size that the shear is no longer powerful enough for further fragmentation, or a stationary regime was reached where the fragmentation rate and the coalescence rate are equal. This question will be addressed next in this paper.

More insight into the emulsification process was gained by estimating the following parameters of the emulsification process. Such parameters were calculated from the characteristics of the impellers and the physicochemical properties of the continuous phase (3%(w/w) gelatin solution).^[28]

Reynolds number of the impeller's: $Re = \frac{\rho_c N D^2}{\eta_c}$ (1)

Weber number: $We = \frac{\rho_c N^2 D^3}{\gamma}$ (2)

Mean specific power density: $\varepsilon = \frac{N_P \rho_c N^3 D^5}{M}$ (3)

Mean shear (strain) rate: $\dot{\gamma} = \left(\frac{\varepsilon \rho_c}{\eta_c} \right)^{\frac{1}{2}}$ (4)

Kolmogorov microscale: $\lambda = \left(\frac{\eta_c^3}{\varepsilon \rho_c^3} \right)^{\frac{1}{4}}$ (5)

where N and D are the rotation rate (s^{-1}) and diameter (m) of the impeller, ρ_c and η_c are the density ($kg.m^{-3}$) and viscosity (Pa.s) of the continuous phase, γ is the interfacial tension ($N.m^{-1}$), N_p is the dimensionless power number of the impeller, and M is the total mass of the emulsion (kg). The power number N_p depends on the type of flow characterized by the Reynolds number. N_p scales as Re^{-1} in laminar flow and it assumes a constant value in turbulent flow. The constant value of the turbulent flow is reached in the intermediate regime for $Re > 10^2 - 10^3$, so that the N_p value of the turbulent flow holds in the present case.^[29,30] $N_p = 5$ has been reported for the 6 blades Rushton disk turbine and $N_p = 0.4$ has been given for a marine-type propeller in an unbaffled tank.^[29,30,31]

Although the regime was intermediate according to the present range of Reynolds numbers, the other parameters were calculated using equations that pertain to the turbulent inertial regime. Such an approximation revealed justified since the final conclusion of the calculation was that the mechanism of oil droplet breakup was fragmentation by turbulence eddies. In such calculations, the mean shear rate depends on the viscosity of the continuous phase, while the viscosity depends of the shear rate because the gelatin solution is a shear-thickening fluid. Therefore the viscosity and shear rate were calculated iteratively to convergence so as their values match the flow curve of the gelatin solution measured experimentally. It is worth noticing that such equations are approximate. In particular, the expression of the Weber number is valid for turbulent flow whereas the present flows are in the intermediate regime. The specific power density dissipated in the fluid and the shear rate are average values over the whole fluid volume; the energy dissipation rate and the shear rate are not spatially uniformly distributed however.

Since the flow is not laminar, turbulence significantly contributes to the emulsification. The efficiency of inertial forces for the fragmentation of oil droplets is estimated from the magnitude of ratio of the inertial forces to the interfacial forces given by the Weber number. The Weber numbers ranging between 1,000 and 3,500 were quite high although the flow was in the intermediate regime, showing the turbulence was a quite effective droplet break-up mechanism. Indeed gelatin adsorption

decreased significantly the oil-water interfacial tension. Accordingly, the size of the smallest eddies is given by the length of the Kolmogorov microscale calculated from the specific dissipated power density. The Kolmogorov scale did not vary so much with respect to the present experimental conditions (Table 3.2). Indeed, it scales as the power $1/4$ of the specific power density, which is quite low power dependence. Since droplets larger than turbulence eddies can be broken up when they collide with eddies, the size of the smallest eddies should correspond to the largest droplets of the droplet size distribution reached after long emulsification durations. The diameter of the largest droplet of the size distribution was approximated as the $d(90)$ (90% of the oil volume is included in droplets of diameter smaller than $d(90)$). The smaller droplets in the droplet size distribution correspond to daughter droplets resulting from the fragmentation. Each droplet fragmentation event obviously gave rise to several daughter droplets in order to account for the width of the droplet size distribution (Figure 3.2). There was a fair agreement between the $d(90)$ measured in the emulsification experiments and the Kolmogorov length. The droplet diameters were larger than the calculated Kolmogorov lengths however. Since the orders of magnitude of the droplets sizes agreed with the calculated sizes of eddies, it was concluded that the predominant mechanism controlling the droplet sizes was the droplet breakup: the droplets were the smallest that the stirring process could produce. The slight discrepancy between calculated and experimental diameters was ascribed to the approximations of the theory. Indeed the energy dissipation rate was not homogeneously distributed so that there were regions of high energy dissipation rate close to the impellers and regions where the energy dissipation rate is much lower than the mean value calculated above. Since the flow was in the intermediate regime, it is presumed that the flow was turbulent in the vicinity of the impellers and close to laminar far from the impeller blades, close to the vessel walls. Liquid droplets can hardly be broken up in simple laminar shear flow for $\eta_d/\eta_c > 3 - 3.8$.^[32,33] This prediction suggests that emulsification did not take place in the laminar circulation flow in the tank. The minimum droplet size came from the fragmentation of oil droplets at the maximum shear rate close to the impeller blades. Reaching a narrow droplet size distribution took time because it was necessary that each

droplet flowed to the propeller tips for it was fragmented to the minimum size. The local shear rate and energy dissipation at the end of the impeller tips are difficult to estimate with reliability; the flow is considered turbulent around the impellers blades. Indeed, it has been reported that turbulence (“trailing vortex”) appears at the back of impellers blades, so that efficient emulsification is taking place at these specific locations.^[34] Such local pseudo-turbulence is not isotropic as for a flow with Rayleigh number above 10^4 .^[35]

As a summary, modeling the emulsification allowed reaching interesting conclusions regarding the mechanism of emulsification. The inhomogeneous flow characteristics and energy dissipation are the main deficiencies of the turbulent model that makes use of average quantities. The agreement with the experimental data was quite fair however, so that the turbulent model provided a useful framework for the extrapolation of the process to higher scales.

Finally correlations between droplet size and the Weber number have been proposed for the case of non-coalescing emulsions of fluid oils, which meets the present conditions. Both the Sauter mean diameter $d_{[3,2]}$ and the maximum droplet diameter $d_{\max}$ have been related to $We^{-3/5}$.^[28, 36, 37] It has been noticed that there was no obvious relationships between $d_{\max}$ and $d_{[3,2]}$ and that the correlation of $d_{\max}$ with $We^{-3/5}$ was much more reliable.^[38,39] $d_{\max}$ has also a clearer physical meaning regarding the emulsification process since it is related to the smallest size of turbulent eddies. The droplet size is therefore discussed with regards to $d_{\max}$ which is given by Eq. 6.^[37]

$$\frac{d_{\max}}{D} = 0.125 We^{-\frac{3}{5}} \quad (6)$$

The functional form of such Eq. 6 is supported by theoretical arguments; but the prefactor is an empirical parameter adjusted to experimental data. The droplet diameters predicted from such equations were significantly smaller than the experimental values of $d(90)$. This is probably again a consequence of the inhomogeneous flow in the intermediate regime where turbulence taking place

in the vicinity of the impeller blades causes droplets fragmentation whereas the quasi-laminar flow far from the impeller does not allow significant droplet break-up.

Finally, it is remarkable that emulsification using either the Rushton turbine or a marine propeller resulted in similar droplet sizes although the Rushton turbine caused a radial flow whereas the marine propeller caused an axial flow. The Rushton turbine behaves more efficiently for droplet break up because it delivers a larger energy to the fluid; its power number is 5 against 0.4 for the marine propeller. The circulation is less effective than with the marine propeller however. Similar results showing poor dependence of droplet size with respect to the impeller geometry have already been reported in the literature.^[23,40]

3.2. Evidence of formation of polynuclear microcapsules

The ideal mechanistic picture of encapsulation by coacervation consists in the coating of each oil droplet by a shell of complex coacervate. However, the deposition of complex coacervate can bind together several oil droplets and finally encapsulate several oil droplets inside the same microcapsule. This phenomenon gives rise to polynuclear microcapsules. The mean diameters of the microcapsules were larger than the mean diameters of the o/w emulsion droplets. Such increase was significantly large, approximately a factor of 2 (Figure 3.3). Indeed the presence of the coacervate layer around oil droplets increases their size. However this cannot increase so much the droplet size because the amount of coacervation materials, gelatin and acacia gum, is less than the amount of linseed oil. Additionally, geometry limits the size growth since a sphere diameter increases only as the $1/3$ power of the volume. The main origin of such a large increase of droplet size was the incorporation of several oil droplets inside microcapsules. A lot of microcapsules are polynuclear; they contained a large oil drop surrounded by several smaller ones as can be seen in the optical microscopy picture shown in Figure 3. Upon encapsulation of an emulsion prepared at 1,000 rpm for 15 min having a mean diameter of oil droplets of 65 μm , the mean diameter of microcapsules was $\sim 130 \mu\text{m}$. The microcapsule diameters measured by small-angle light scattering were probably over-

estimated owing to the non-spherical shape of the microcapsules. Indeed the microcapsules were “eye”-shaped (Figure 3.3) because the complex coacervate layer has been quenched under stirring when the suspension has been cooled to 5°C, below the gelation temperature of gelatin, and subsequently cross-linked by glutaraldehyde. Even image analysis of microscopy pictures consists in measurements of chords that depart from the diameters of the equivalent sphere (defined as the sphere having the same volume).

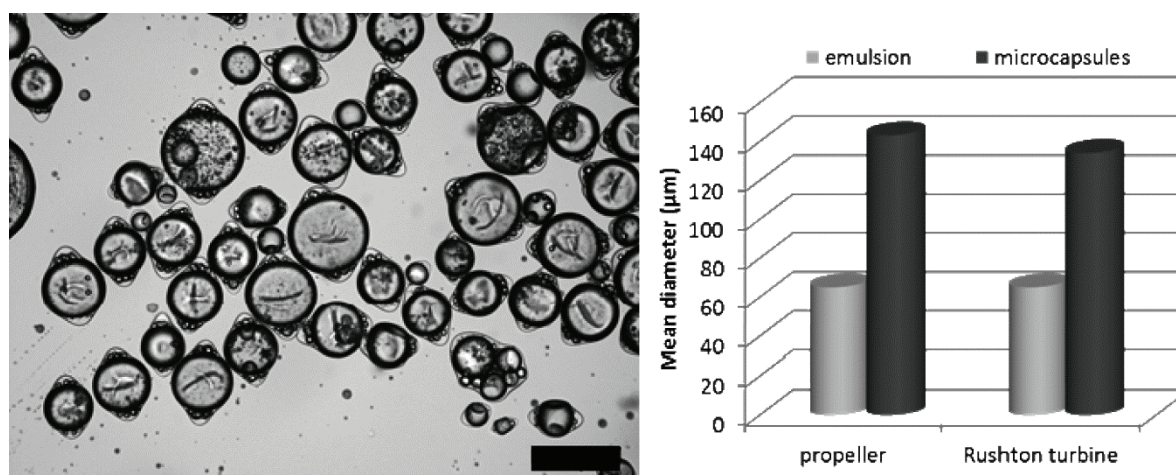


Figure 3.3: Evidence of polynuclear microcapsules formation. A: picture of washed polynuclear microcapsules (scale bar = 300 μm); B: comparison between emulsion droplets and microcapsules mean diameters.

The mechanism of formation of polynuclear microcapsules is probably coagulation of oil droplets during the complex coacervation step. Indeed the emulsion was stabilized by adsorbed gelatin acting as a polymeric surfactant.^[41] The origin of stabilization was steric and electrostatic.^[42] It is difficult to assess the relative contributions of the two mechanisms. Complex coacervation was performed by lowering the pH such that the charge of gelatin was reversed from negative to positive. Electrostatic stabilization obviously vanished when the isoelectric point was passed. The steric stabilization was also weakened at the same time. Indeed the protein layer was thick when the protein was charged because it was swollen by water owing to internal electrostatic repulsions; it collapsed when the electrostatic repulsions were suppressed inside the neutral protein layer at the isoelectric point. Coagulation of emulsions stabilized by proteins at the isoelectric point is a well-documented

phenomenon.^[43] Furthermore, complex coacervation taking place at the pH below the isoelectric point of gelatin is a heterocoagulation process that causes the formation of clusters of oil droplets. Poor stability of the emulsion and fast creaming upon stopping the stirrer have indeed been observed during the course of the encapsulation process by complex coacervation.^[20] Coagulation is similar to the electrostatic flocculation by adsorption of polymers of opposite charge.^[44] On this basis, it is difficult to avoid coagulation because the electrostatic attractions between macromolecules of opposite charges that are responsible for the coacervation are the same as those which cause the destabilization of the emulsion. Keeping the concentration of oil droplets low is a way to limit its coagulation. It has been proposed that a successful scale-up of the complex coacervation encapsulation process required increasing the stirring rate up to turbulent flow conditions during addition of the acid.^[23] However occurrence of air entrapment during coacervation is really crippling because air bubbles are encapsulated together with oil droplets. It should be noticed however that although coagulation takes place, coalescence of oil droplets has been avoided by the adsorbed layer of gelatin and complex coacervate. Indeed the oil droplets inside the polynuclear microcapsules remained well-separated each other. Coagulation of oil droplets remained limited since a fluid suspension of microcapsules was obtained at the end of the process. The main drawback of such coagulation is a poor control over the size of the microcapsules since the control by the emulsification step partly felt down.

3.3. Evidence of coacervate deposition on oil droplets

The deposition of the particles of complex coacervate onto the emulsion droplets is a key-step of the encapsulation. Indeed, poor adhesion of the complex coacervate to the oil droplets results in partial encapsulation, poor stability of the final suspension of microcapsules, and slow release of their oil content. In the framework of wetting, the complex coacervate material should fully wet the oil droplets for the shell of coacervate material covers the oil droplets to completion. The complex coacervate deposition events could be observed by discrete optical microscopic observations of aliquots collected out from the vessel. However, such *ex situ* observations require a correct sampling

and no alteration of the samples after they have been collected. *In situ* observation of the droplets and microcapsules avoids such drawbacks and allow the continuous in line monitoring of the process as the pH is slowly decreased. Such monitoring inside the stirred vessel has been performed with a video probe immersed inside the stirred liquid.

By *in situ* monitoring of microencapsulation process with the video microscope probe, four successive steps of the complex coacervation process have been observed. These steps are illustrated in Figure 4. At first, the formation of linseed oil droplets in aqueous solution of gelatin and acacia gum at constant pH (pH = 4.9) was monitored (Figure 3.4A). The emulsion droplet size distribution can be assessed from the video either by image analysis, ^[25] or by a manual determination of the diameters when a too poor quality of the picture does not allow automatic image analysis. The second stage was the formation of complex coacervate in the aqueous solution induced as acid was added (Figure 3.4B). The complex coacervate appeared as small dots (very small particles) in suspension and as a diffuse background in the aqueous phase, between pH 4.7 and pH 4.5. The particles of complex coacervate could be detected, but their size distribution could not be measured because their size was lower or of the same magnitude as the optical resolution of the video probe. The smallest coacervate particles could not be directly observed, but they were detected because they strongly scattered light. The oil droplets remained identical to the initial droplets observed in the first stage; they looked spherical, their surface was smooth and no shell of deposited coacervate could be detected. Coacervate particles started to deposit around oil droplets in a subsequent third stage, between pH 4.5 and pH 4.3 (Figure 3.4C). The surface of oil droplets appeared rough because there were coacervate particles stuck to it. The particles of complex coacervate in suspension in the aqueous phase were larger than in the second stage and the background was clear, showing that the coacervate particles of size smaller than the optical resolution have grown to larger sizes. Finally the deposited coacervate particles coalesced during a fourth stage, between pH 4.3 and pH 4.1, to form a continuous shell of coacervated materials around the oil droplets (Figure 3.4D). Microcapsules formed had an “eye”-like shape because their shells were deformed by the flow. Both oil-containnig

microcapsules and coacervate particle/aggregates were coexisting (Figure 3.4D/H). The particles of coacervate remaining dispersed in the aqueous phase were again larger than in the third stage. As a whole, there was a progressive growth of the coacervate particles along the acidification. The formation of these aggregates might be caused by the presence of excess biopolymers with respect to the amount required to ensure the full coverage of oil droplets.

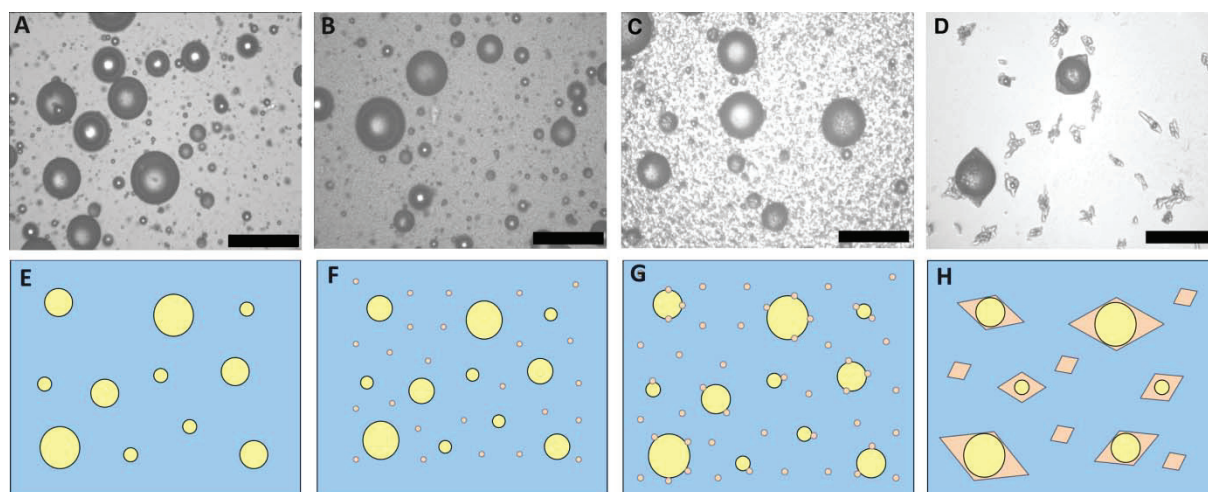


Figure 3.4: Microcapsules formation by complex coacervation. A to D: photographs from the video (scale bar = 300 μm); E to H: schematic representations. A/E: formation of the emulsion; B/F: formation of the coacervate in the aqueous phase; C/G: coacervate deposition around oil droplets; D/H: final microcapsules.

In situ monitoring along the slow addition of acid allowed gaining more insight into the physicochemical events taking place during the complex coacervation encapsulation process. The prominent feature is the separation of the encapsulation as two successive steps. Coacervation took place in the aqueous phase, giving rise to an aqueous suspension of well-dispersed particles coexisting with the emulsion droplets. The particles of complex coacervate did not deposit to the oil droplets once they were formed. Lowering the pH again was necessary for the complex coacervate stuck to oil droplets and remained as adhering discrete particles. The formation of a continuous shell of coacervate again required a further lowering of the pH. Such successive events could be observed as separated stages because the addition of acid was slow. The encapsulation can be stopped at its intermediate stages by incomplete addition of acid. Earlier failures of encapsulation where discrete

particles of coacervate were adsorbed on the surface of oil droplets instead of a continuous layer may be caused by such an incomplete addition of acid.^[19,45] A faster addition of acid would mix the stages and might result in a different final morphology of the microcapsules.

4. Conclusions

The control of the full process of encapsulation by complex coacervation requires that each step is mastered since all of the different steps have a significant impact on the final properties of the microcapsules. The emulsification step can be taken under control through the classical methodology developed for industrial mixing. Even though the flow in the emulsification tank was not fully turbulent, the theoretical equations valid in the turbulent regime gave a good account of the emulsification process. This is a suitable framework for scale-up the process. The droplet size of the emulsion controls the microparticles size. The microparticles size distribution is not homothetic with the droplet size distribution of the emulsion however because there is formation of polynuclear microcapsules. The coacervation and encapsulation steps are successive and can be performed separately upon a slow addition of acid. There remain several open fundamental issues regarding the mechanisms of coacervation and encapsulation. For example, the effect of the chemical nature of the acid may be a topic for future investigations. *In situ* monitoring the process in the stirred vessel by means of a video probe immersed in the reactor allowed the observation of the different steps of the process. Formation of coacervate has been observed in solution, before its deposition around oil droplets in suspension. The use of *in situ* video probe is quite promising as it provides relevant information about the formation of microcapsules.

References

- [1] S. Gouin, *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 330.
- [2] D. Renard, *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 163.
- [3] D.J. McClements, E.A. Decker, Y. Park, J. Weiss, *Crit. Rev. Food Sci.* **2009**, *49*, 577.
- [4] N.T. Annan, A.D. Borza, L. Trustrup Hansen, *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 184.
- [5] C.P. Champagne, P. Fustier, *Curr. Opin. Biotech.* **2007**, *18*, 184.
- [6] A.K. Anal, H. Singh, *Trends Food Sci Tech.* **2007**, *18*, 240.
- [7] Y. Yeo, E. Bellas, W. Firestone, R. Langer, D.S. Kohane, *J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 7518.
- [8] A. Lamprecht, U. Schäfer, C.M. Lehr, *J. Microencapsulation* **2001**, *18*, 347.
- [9] R. Arshady, in *Microspheres, Microcapsules, and Liposomes*, R. Arshady ed., Citus Books, London, **1999**, Vol. 1, Chap. 10, pp. 279-326.
- [10] T.F. Vandamme, D. Poncelet, P. Subra-Paternault, *Microencapsulation : Des sciences aux technologies*, Lavoisier Tec & Doc, Paris, **2007**.
- [11] J.L. Doublier, C. Garnier, D. Renard, C. Sanchez, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2000**, *5*, 202.
- [12] C. Schmitt, C. Sanchez, S. Desobry-Banon, J. Hardy, *Crit. Rev. Food Sci.* **1998**, *38*, 689.
- [13] V.B. Tolstoguzov, *Food proteins and their applications*, Marcel Dekker, New York **1997**, p. 171.
- [14] V.B. Junyaprasert, A. Mitrevej, N. Sinchaipanid, P. Boonme, D.E. Wurster, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2001**, *27*, 561.
- [15] D.J. Burgess, J.E. Carless, *J. Colloid Interf. Sci.* **1984**, *98*, 1.
- [16] H. Jizomoto, *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 879.
- [17] W. Li, G. Wu, H. Chen, M. Wang, *Colloids Surfaces A* **2009**, *333*, 133.
- [18] R. Arshady, *Polym. Eng. Sci.* **1990**, *30*, 905.
- [19] P.L. Madan, L.A. Luzzi, J.C. Price, *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1586.
- [20] F. Weinbreck, M. Minor, C.G. De Kruif, *J. Microencapsulation* **2004**, *21*, 667.
- [21] E. Dickinson, *Food Hydrocolloids* **2011**, *25*, 1966.
- [22] J.M. Rodriguez Patino, A.M.R. Pilosof, *Food Hydrocolloids* **2011**, *25*, 1925.
- [23] C.Y.G. Lemetter, F.M. Meeuse, N.J. Zuidam, *AIChE J.* **2009**, *55*, 1487.
- [24] M. Rabiskova, J. Valaskova, *J. Microencapsulation* **1998**, *15*, 747.
- [25] A. Khalil, F. Puel, Y. Chevalier, J.-M. Galvan, A. Rivoire, J.-P. Klein, *Chem. Eng. J.* **2010**, *165*, 946.
- [26] E. Gagnière, D. Mangin, F. Puel, O. Monnier, E. Garcia, J.-P. Klein, *J. Cryst. Growth* **2009**, *311*, 2689.
- [27] A. Khalil, F. Puel, X. Cosson, O. Gorbachev, Y. Chevalier, J.-M. Galvan, A. Rivoire, J.-P. Klein, *J. Cryst. Growth* **2012**, *342*, 99.
- [28] D.E. Leng, R.V. Calabrese, in *Handbook of Industrial Mixing*, E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta, Eds, Wiley, New Jersey, **2004**, Chap. 12, pp. 639-753.
- [29] J.H. Rushton, E.W. Costich, H.J. Everett, *Chem. Eng. Prog.* **1950**, *46*, 395 and 467.
- [30] R.L. Bates, P.L. Fondy, R.R. Corpstein, *Ind. Eng. Chem. Process Design Develop.* **1963**, *2*, 310.
- [31] Y. Kato, Y. Tada, Y. Takeda, Y. Hirai, Y. Nagatsu, *J. Chem. Eng. Jpn* **2009**, *42*, 6.
- [32] F.D. Rumscheidt, S.G. Mason, *J. Colloid Sci.* **1961**, *16*, 238.
- [33] S. Torza, R.G. Cox, S.G. Mason, *J. Colloid Interface Sci.* **1972**, *38*, 395.
- [34] K. van't Riet, J.M. Smith, *Chem. Eng. Sci.* **1975**, *30*, 1093.
- [35] K. van't Riet, W. Bruijn, J.M. Smith, *Chem. Eng. Sci.* **1976**, *31*, 407.
- [36] C.A. Coulaloglou, L.L. Tavlarides, *AIChE J.* **1976**, *22*, 289.
- [37] J.S. Lasigetty, P.K. Das, R. Kumar, *Chem. Eng. Sci.* **1986**, *41*, 65.

- [38] G. Zhou, S.M. Kresta, *Chem. Eng. Sci.* **1998**, 53, 2063.
- [39] A.W. Pacek, C.C. Man, A.W. Nienow, *Chem. Eng. Sci.* **1998**, 53, 2005.
- [40] D.I. Collias, R.K. Prud'homme, *Chem. Eng. Sci.* **1992**, 47, 1401.
- [41] I. Piirma, *Polymeric surfactants*, Marcel Dekker, New York, **1992**.
- [42] D.H. Napper, *Polymeric stabilization of colloidal suspensions*, Academic Press, London, **1983**.
- [43] D.J. McClements, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, 9, 305.
- [44] B. Dobiáš, *Coagulation and flocculation*, Marcel Dekker, New York, **1993**.
- [45] L.A. Luzzi, R.J. Gerraughty, *J. Pharm. Sci.* **1967**, 56, 634.

CHAPITRE 4 :

**Le suivi *in situ* du procédé
d'encapsulation par
coacervation complexe**

CHAPITRE 4: Le suivi *in situ* du procédé d'encapsulation par coacervation complexe

Les objectifs de ce travail sont de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la formation de microcapsules par coacervation complexe, et d'étudier le potentiel du suivi *in situ* pour comprendre ces mécanismes. Le suivi *in situ* du procédé d'encapsulation par coacervation complexe a été réalisé pour la première fois lors de cette étude.

Le suivi *in situ*, au moyen d'une sonde vidéo, du procédé d'encapsulation par coacervation complexe nous a permis de relever quatre étapes successives induites par l'abaissement du pH. La formation du coacervat commence à pH 4,25 où la solution se trouble. Des gouttelettes de coacervats sont ensuite observées à pH 4,1. Le dépôt des gouttelettes de coacervats sur les gouttelettes d'huile a été observé à pH 3,90. Enfin, l'encapsulation complète de gouttelettes d'huile a été atteinte à pH 3,75. Les influences des paramètres physico-chimiques (ratio protéine/polysaccharide et concentration totale en biopolymères) et des paramètres liés à l'étape de coacervation sur la formation des microcapsules ont aussi été évaluées à l'aide de ce nouvel outil de suivi *in situ*.

Bien que la sonde vidéo modifie les conditions d'écoulement dans le réacteur, la formation et la morphologie des microcapsules n'ont pas été modifiées par la présence de la sonde vidéo. Les deux principaux avantages du suivi *in situ* développé dans cette étude sont le suivi en temps réel du processus, et l'observation possible dans le réacteur agité. Ceci permet d'éviter les inconvénients provenant de l'échantillonnage et des manipulations qui sont nécessaires pour les observations microscopiques *ex situ*.

Ce travail est présenté sous forme de publication, qui doit être soumise au Journal of Microencapsulation.

***In situ* monitoring of microencapsulation by complex coacervation**

Delphine Ach^a, Stéphanie Briançon^a, Jean-Marc Galvan^b, Alain Rivoire^a, Jean-Pierre Valour^a, Guy Broze^c, Yves Chevalier^a

^a Université Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, UMR 5007 CNRS, 43 bd du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France

^b Université Lyon 1, INL UMR5270, CPE-Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France

^c Prayon S. A., rue J. Wauters 144, 4480 Engis, Belgium

Abstract

In line observations in a stirred reactor using a video probe was used to study the microencapsulation process by complex coacervation of whey proteins and acacia gum. This experimental set-up enabled us to identify four successive steps of the oil encapsulation by complex coacervates as the pH was decreased. The formation of coacervate started at pH 4.25 where the clear solution turned cloudy. Coacervates droplets of large enough size were observed at pH 4.1. The deposition of coacervates droplets onto oil droplets was observed at pH 3.90. And finally, the full encapsulation of oil droplets was reached at pH 3.75. Although the video probe modified the flow conditions in the vessel, the formation and the morphology of the microcapsules were not modified by the presence of the video probe. The influence of various parameters was then assessed using this new *in situ* monitoring tool.

Key words: Complex coacervation; Video probe; Whey proteins; Acacia gum.

1. Introduction

Microencapsulation is widely used in the food industry in order to achieve various goals: protect sensitive ingredients from oxidation or hydrolysis, mask unpleasant taste, transform liquid droplets into solid particles, and allow controlled release of food additives (Gouin, 2004; Renard, 2002). Indeed many functional food components would benefit from being encapsulated, such as vitamins, antioxidants, flavors, phytosterols, carotenoids and fatty acids (McClements *et al.*, 2009; Annan *et al.*, 2008; Champagne and Fustier, 2007; Anal and Singh, 2007; Yeo *et al.*, 2005; Lamprecht *et al.*, 2001). Microcapsules are mostly made of an internal liquid core containing either the pure active ingredient or its solution in oil, and a shell made of polymer.

Complex coacervation is an associative phase separation phenomenon induced by electrostatic interactions between at least two macromolecules; typically a protein and a polysaccharide of opposite charges (Cooper *et al.*, 2005). But other weak interactions, such as hydrogen bonding and hydrophobic interactions, can contribute to the formation of complex coacervates (Turgeon *et al.*, 2007). Complex coacervation takes place when a shift of the pH across the isoelectric point of one polymeric partner leaves the two polymers with opposite electrical charges. The association of the two polymers of opposite charge leads to the formation of an insoluble complex that causes a phase separation into liquid droplets made of water-swollen complex species called the “complex coacervate” (De Kruif *et al.*, 2004; Doublier *et al.*, 2000; Schmitt *et al.*, 1998; Tolstoguzov, 1997). Specific pH conditions are required for protein-acacia gum complexes to ensure encapsulation of oil droplets by optimal complex coacervation (Chourpa *et al.*, 2006).

Coacervates are used for nano- or microencapsulation of various lipophilic compounds, food ingredients and pharmaceuticals (Turgeon *et al.*, 2007; Mellema, 2004; Junyaprasert *et al.*, 2001; Jizomoto, 1984). Microencapsulation by the complex coacervation process relies on the phase separation of “complex coacervate” particles and their subsequent deposition onto the surface of

emulsified oil droplets or particles of an active ingredient (Gouin, 2004; Arshady, 1999; Vandamme *et al.*, 2007). Two mechanisms have been proposed to explain the formation of microcapsules of oil: (i) progressive coating of the core droplets by particles of coacervate as they form in the aqueous phase of the emulsion, or (ii) formation of large coacervate drops in the aqueous phase followed by their heterocoagulation with oil droplets. Process (i) results in a clean encapsulation of each oil droplet provided that the complete wetting condition of the oil droplets by the coacervate material is ensured. Process (ii) may result in more complex morphologies of the microcapsules when several coacervate particles and several oil droplets stick together into a single microcapsule (Arshady, 1990; Madan *et al.*, 1972). Microencapsulation by complex coacervation has been extensively investigated and the influence of process parameters on microcapsules size distribution and morphology is well documented (Lemetter *et al.*, 2009). Gelatin/acacia gum system is the most widely used pair of biopolymers for the microencapsulation by the complex coacervation process (Junyaprasert *et al.*, 2001; Burgess and Carless, 1984; Jizomoto, 1984). However the whey proteins/acacia gum system is also the subject of several studies since a decade (Klein *et al.*, 2010; Weinbreck *et al.*, 2003; Weinbreck *et al.*, 2004a). Whey proteins have been proposed as alternatives to gelatin, both for health safety and religious reasons. As examples, microencapsulations of dietary oils and dodecyl acetate (for pest control) have been realized using whey protein/acacia gum coacervates (Weinbreck *et al.*, 2004b; Lu *et al.*, 2012).

Since the physicochemical phenomena involved in this encapsulation process are quite complicated, a definite view over the process is still not established, even for the most popular system using gelatin and acacia gum. The microencapsulation process by complex coacervation has been much less studied for the whey protein/acacia gum system than for the gelatin/acacia gum system. The system whey protein/acacia gum looks simpler for fundamental physical chemistry studies because gelatin has to be used at around 50°C, whereas whey proteins are soluble in water at ambient temperature. So the objective of this study is to get a deeper understanding of the

microencapsulation process by complex coacervation at ambient temperature using a polymer pair that does not involve a thermal gelation step.

In situ monitoring of the coacervate particles and oil droplets with a video probe dipped into the vessel during the microencapsulation process was used in order to record the successive events inside the stirred vessel as the pH was decreased by addition of acid. In line observations in stirred reactors using a video probe have already been applied successfully to *in situ* monitor emulsification, crystallization and crystallization-in-emulsion processes (Gagnière *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2010; Khalil *et al.*, 2012). But this technique has not yet been applied to encapsulation by complex coacervation although the quite large microparticles produced in such a process should make their observation easy.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Whey proteins isolate (Prolacta® 95) was a gift from Lactalis Ingredients (Bourgbarré, France). The powder contained 95% protein/dry matter. Acacia gum from acacia tree (Acacia gum), branched polysaccharide with a molar mass of approximately 250,000 g/mol⁻¹, and hydrochloric acid (37%) were purchased from Sigma-Aldrich. Raw linseed oil was purchased from Fisher Scientific. Deionized water of 18 MΩ.cm resistivity was used throughout the whole study.

2.2. Preparation of polymers solutions

Whey proteins isolate and acacia gum were dispersed in deionized water and mixed under gentle stirring at room temperature until complete dissolution. Stock solutions of acacia gum were prepared between 0.4 and 4 % concentration in 100 mL deionized water. Stock solutions of whey proteins were prepared between 1 and 8 % concentration in 100 mL deionized water. Whey proteins contained β-lactoglobulin and α-lactalbumin as main components; a minor component, probably

casein, precipitated below pH 5.1. For some experiments whey proteins isolate solutions were purified by removing this component that is not soluble in the pH range of the complex coacervation process by acidification at pH 4.75 and centrifugation at 7,830 rpm for 30 min. The supernatant recovered after centrifugation was clear.

2.3. Video probe characteristics

The *in situ* video microscope probe EZ PROBE D25 L1300® designed in our laboratory was immersed in the vessel during the microencapsulation process. The same type of video probe has already been used to monitor emulsification processes inside the stirred vessel (Khalil *et al.*, 2010). This probe is derived from a previous probe that was designed to monitor crystallization processes (Gagnière *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2012). This optical probe allows real time recording of 2D images of the droplets at a rate of 60 frames per second. The tip of the probe where the video images are collected consists in a notch where the stirred liquid medium can flow. It was equipped on one side of the gap with a back lighting Light Emitting Diode (LED) driven by a pulse generator triggered by the video camera. The LED delivered a flash of light synchronized with the recording of the video camera into a gap of four hundreds of micrometers width where the emulsion/microcapsules flowed. The blurring by motion was eliminated by a pulsed illumination with flash duration of 50 μ s. The transmitted light illuminated a CCD video camera. The frame has the following specifications: (image size of 758×484 pixels, resolution up to 2.0 μ m, 256 grey levels). This resulted in an optical field of 1200×900 μ m². A USB video grabber retrieved the video data and sent it to a computer. The back-lighting allowed the visualization of droplets shadows which appeared black on a white background.

2.4. Preparation of microcapsules

Microencapsulation by complex coacervation was carried out in a 600 mL cylindrical vessel of 85 mm internal diameter. Stirring was ensured by a three blades marine propeller of 38 mm diameter rotated by a IKA motor (Figure 4.1). The pH was measured inside the vessel with a Radiometer PHM210 MeterLab pH-meter equipped with a 170 mm long electrode (InLab®Routine-L, Mettler

Toledo). The *in situ* video microscope probe EZ PROBE D25 L1300® was immersed in the vessel to monitor the microencapsulation process. Stock solutions of whey proteins isolate and acacia gum were poured together into the vessel and diluted with 200 mL deionized water. The pH was 5.0, above the isoelectric point of whey protein and acacia gum, so that both polymers, whey protein and acacia gum, were negatively charged. Around 15 g of linseed oil were added into the mixed solution of whey proteins isolate and acacia gum and emulsified for 20 min at 800 rpm. After the formation of the emulsion, the stirring speed was reduced to 500 rpm. Hydrochloric acid was added progressively while the pH was measured, until the successive events of the microencapsulation process were observed.

2.5. Microscopic observations

At the end of the process, the morphology of microcapsules suspended in water was observed by optical microscopy in transmission mode using a Leica DMLM microscope equipped with a camera ColorView. Samples were deposited on microscope glass slides, pictures were taken and image-analyzed using the software analySIS (Olympus). *Ex situ* microscopic observations of small samplings were also realized at different stages of the process as supplementary data to video recordings realized by the video probe immersed in the vessel.

2.6. Particle size distribution analysis

The size distribution of oil droplets was determined by image analysis with the ImageJ® software. Images used were photographs taken with the microscope immediately after the emulsification step. Optical microscopy was preferred to small-angle light scattering because it was not biased by creaming and coalescence of oil droplets that took place in some instances during sampling and dilution in the light scattering instrument before measurement.

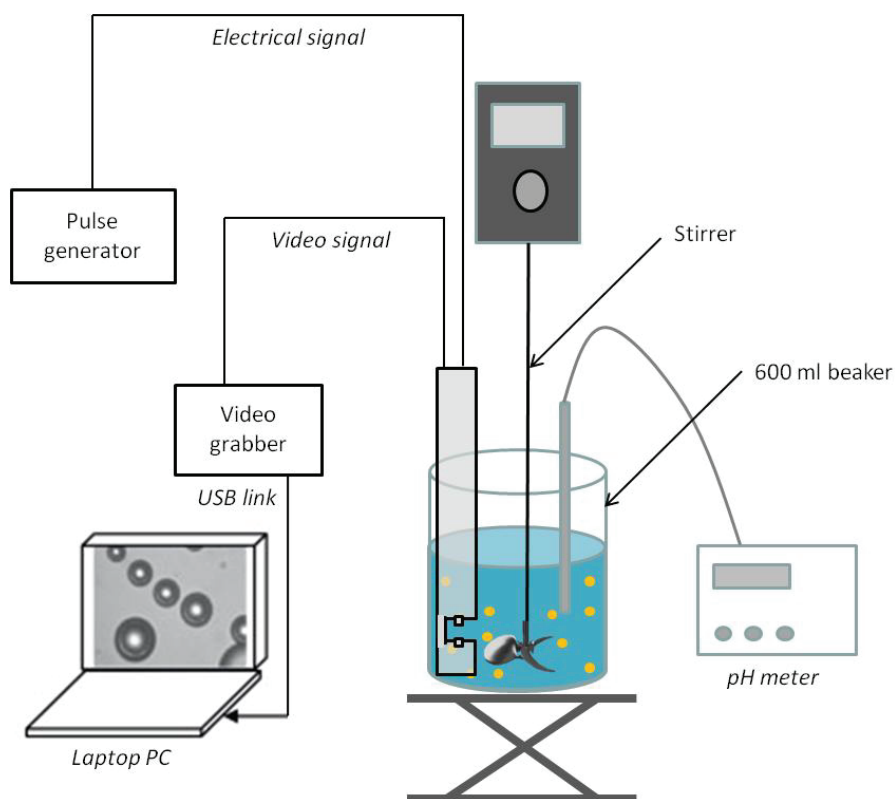


Figure 4.1: Experimental set-up for microcapsules formation by complex coacervation with *in situ* monitoring by a video probe.

3. Results and Discussion

3.1. Evidence of successive steps of microencapsulation by complex coacervation

Microscopic observations and photographs extracted from videos allowed the identification of the successive steps of the microencapsulation process by complex coacervation. The *in line* observations showed that formation of coacervates and their deposition on oil droplets were pH dependent. At the very beginning of the emulsification stage, large oil droplets were first observed in the video, which appeared black with a white spot in their center (Figure 4.2), inside a clear solution. The bright spot was the image of the light source in the middle of each large droplet. After 20 min of emulsification smaller oil droplets with a mean diameter of 114 μm were obtained. The video probe provided clear images of emulsion droplets that passed in the gap as they flew in the stirred vessel. A favorable observation of emulsion droplets requires that their concentration is low enough (Khalil *et*

al., 2010, 2012); the typical concentration range is below 10% of oil, which is indeed the usual concentration range of the encapsulation process by complex coacervation. The pH was progressively lowered down to 4.25 in a second stage. The solution turned darker but coacervates droplets could not be detected once they were formed because their size was below the resolution of the video. Coacervate droplets only could be detected below pH 4.25 (Figure 4.2). Microscopic observations at pH 4.10 showed coacervate droplets that started to deposit onto the surface of oil droplets, and oil droplets that tended to stick together. Significant deposition of coacervate droplets on oil droplets was clearly observed by the video at pH 3.90 (Figure 4.2). The concentration of coacervate droplets in the solution was lower at pH 3.90 than at pH 4.10 as a consequence of the coacervate deposition onto oil droplets, which reduced the number of free coacervate droplets in solution. Encapsulation of oil droplets was observed at pH 3.75, where no more free coacervate droplets were present in the solution. It was inferred that all coacervates droplets have deposited onto oil droplets at this final pH. For the gelatin/acacia gum system, Lv (2012) showed that the pH parameter was the most important factor that controlled the morphology of microcapsules, which is in accordance with our observations on the importance of pH on microcapsules formation. Evidence of such characteristic stages of complex coacervation has been previously for β -lactoglobulin and acacia gum at a 2:1 ratio (Mekhloufi, 2005). These stages included the phase separation at pH 4.2, the observation of the first spherical coacervates at pH 4.0 and the morphological change of coacervates at pH 3.8. These characteristic stages were only observed in aqueous solution however, without the presence of emulsion droplets. They are in agreement with our observations related to microcapsules formation.

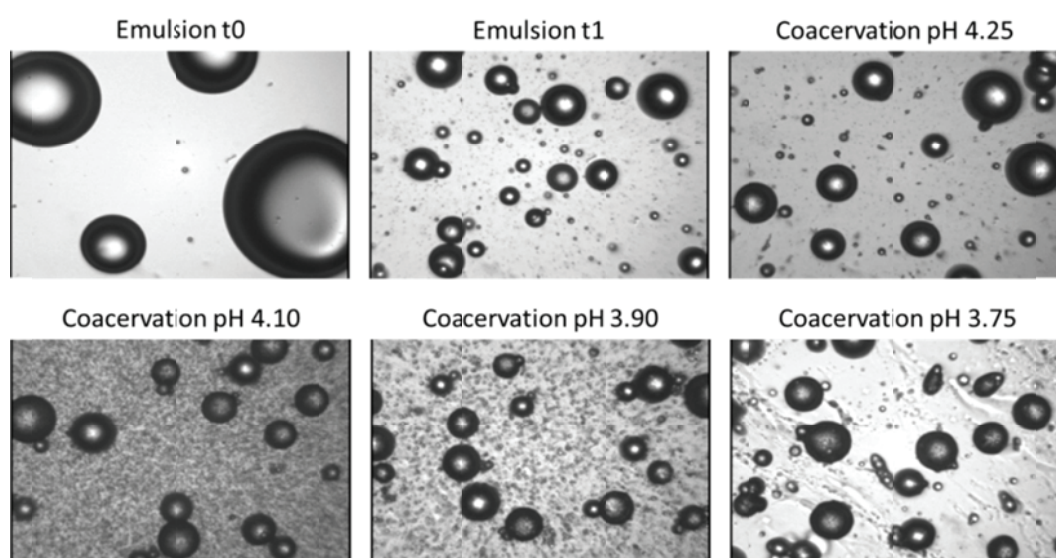


Figure 4.2: Photographs extracted from videos illustrating the successive steps of the encapsulation process by complex coacervation as a function of pH. Emulsion t_0 : emulsion at 1 min, Emulsion t_1 : emulsion at 20 min.

3.2 Influence of the video probe

The video probe immersed in the stirred vessel perturbed the flow since it induced turbulent eddies in its vicinity. In order to assess whether this study with the video probe immersed in the vessel was representative of what usually happens in the probe-free vessel, the influence of the introduction of the video probe in the vessel was studied. Oil droplets mean diameters were measured in two comparative experiments run under the same stirring conditions with and without the video probe immersed. A droplet mean diameter of $114\ \mu\text{m}$ was measured in the experiment with the video probe against a mean diameter of $118\ \mu\text{m}$ in the experiment without the video probe. These results indicated that the presence of the video probe did not cause significant variation of the mean diameter of the oil droplets after the end of the emulsification step was reached. Optical microscopy observations were also realized during the coacervation process in order to determine whether the presence of the video probe disrupted the formation of microcapsules. The appearance of the coacervate droplets started to be detected at pH 4.0 and the formation of microcapsules was observed at pH 3.7 in the two experiments (Figure 4.3). Oil droplets appeared well-separated at pH 4.2 in the two experiments. They started to stick together at pH 4.0, when the coacervate appeared.

Finally, large agglomerates of microcapsules were observed at pH 3.7 (Figure 4.3). These observations allowed concluding that the formation and the morphology of the microcapsules were not modified by the introduction of the video probe in the vessel.

The flow caused by stirring with the marine propeller was in the intermediate regime between laminar and turbulent flow. The Reynolds number of the impeller was

$$Re = \frac{\rho_c N D^2}{\eta_c} \quad (1)$$

where N and D are the rotation rate (800 rpm = 13.3 s^{-1}) and diameter (0.038 m) of the impeller, ρ_c and η_c are the density (1005 kg.m^{-3}) and viscosity ($6.2 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$) of the continuous phase, γ is the interfacial tension between oil and water ($5.2 \times 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$). $Re = 3,120$ was indeed between the lower limit for the turbulent regime ($Re = 10,000$) and the upper limit for the laminar regime ($Re = 100$). Under such conditions, it was expected that the disturbance of the flow by the video probe could make the flow more turbulent and the size of oil droplets smaller. The insensitivity of the droplet size to the presence of the video probe was probably due to the fact that the droplet break up events took place in the most sheared regions of the liquid located vicinity of the impeller (at the tips of the blades) and the circulation of the fluid was efficiently ensured by the marine propeller, so that it was not influenced by changes of the flow elsewhere in the liquid. The presence of the video probe did not influence the emulsification in the present case, but it might happen specific cases where the video probe alters the flow in such a way that the emulsification process is also influenced.

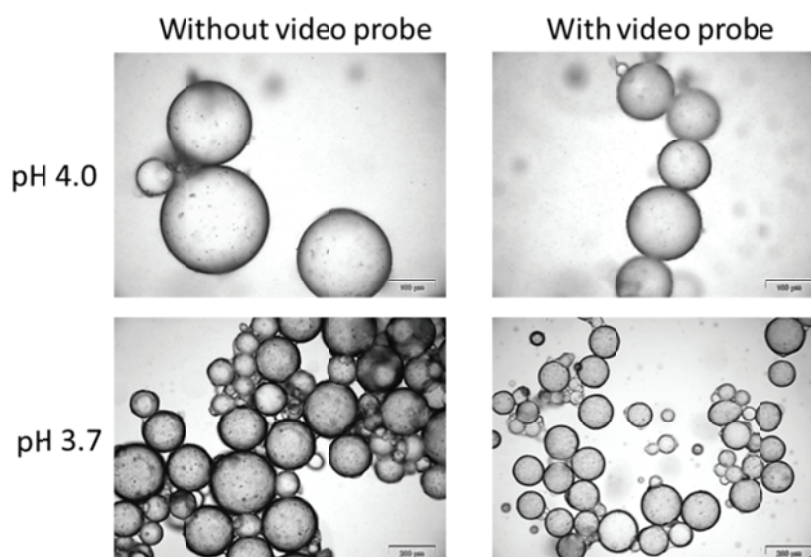


Figure 4.3: Microscopic observations of the morphology of microcapsules during their formation as a function of pH. Comparison between experiments with and without the video probe.

3.3 Influence of the purification of whey proteins isolate

Whey protein isolate used to form complex coacervates is sometimes purified to remove protein aggregates (Weinbreck *et al.*, 2003). The purification may have an influence on the process, so the morphology of the microcapsules obtained with whey protein isolate either after purification or without purification have been compared. The purification step is described in “Preparation of polymers solutions” section. In these experiments, the formation of coacervates and the beginning of its deposition around oil droplets was observed at pH 4.0, and the encapsulation of oil droplets reached completion at pH 3.8 (Figure 4.4). The aspect of coacervates was different in the two experiments however. Coacervates obtained with purified whey protein isolate were regular spheres with a smooth surface, whereas coacervates obtained from non-purified whey protein isolate contained pieces of precipitates buried in their bulk. These precipitates stuck to the oil droplets together with the coacervates and gave a non-regular shape and a rough surface to microcapsules (Figure 4.4). In the case of sole complex coacervation (no emulsion present), similar changes in the structure of β -lactoglobulin / acacia gum complex coacervates were observed in the presence of β -lactoglobulin aggregates (Schmitt *et al.*, 2000a): spherical vesicular coacervates and precipitated

particles were observed in β -lactoglobulin solution containing aggregates whereas only smooth spherical coacervate droplets were observed in aggregate-free β -lactoglobulin solution, which was in accordance with our observations.

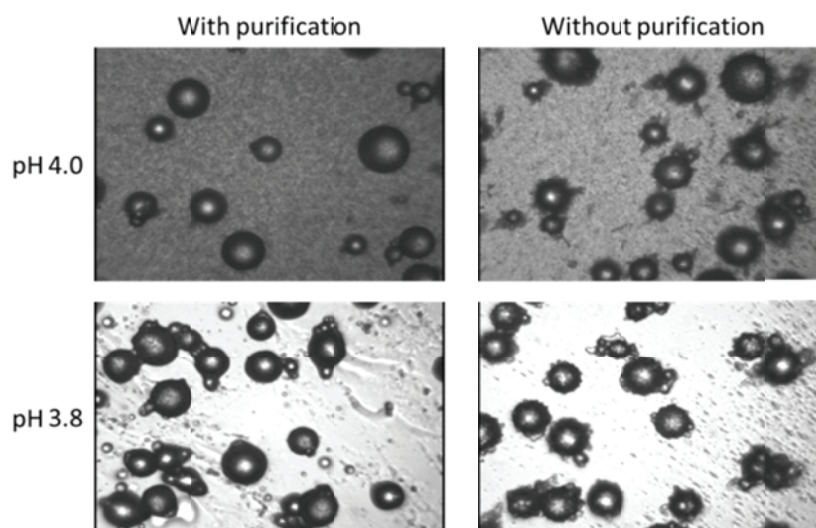


Figure 4.4: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate (with or without purification). Comparison of microcapsules aspect as a function of pH.

3.4 Influence of protein:polysaccharide ratio

Protein:polysaccharide (Pr:Ps) ratio is considered as an important factor in complex coacervation. Three Pr:Ps ratios of whey protein isolate/acacia gum for the microencapsulation process (1:1, 2:1 and 4:1) were studied. Different behaviors were observed as a function of pH for the three ratios studied. Neither coacervates nor microcapsules were obtained at pH 4.5 and 4.0 for Pr:Ps = 1:1 (Figure 4.5). For Pr:Ps = 2:1, coacervate formation was observed at pH 4.0 and microcapsules were obtained at pH 3.8 (Figure 4.4). Finally, for the Pr:Ps = 4:1, the formation of coacervates took place till pH 4.5 and microcapsules were formed at pH 4.0. Microcapsules were obtained for Pr:Ps ratios of 2:1 and 4:1, but not for Pr:Ps = 1:1. The Pr:Ps ratio influenced the pH at which coacervates formation was observed, and consequently, also the pH at which microcapsules were formed. Indeed coacervation occurred at higher pH for higher Pr:Ps ratios. The origin of this shift of pH by the larger protein content is the increasing amount of positive electrical charges to be neutralized by the formation of

the coacervate with the anionic acacia gum. Such behavior was in agreement with Weinbreck (2004b), who obtained the best encapsulation results for Pr:Ps = 2:1 for the whey protein/acacia gum system at pH 4. Encapsulation was achieved at pH 3.8 for Pr:Ps = 2:1 in the present case. This slight difference could be due to the different nature of the present whey protein; indeed variations in the compositions of whey proteins can be observed in commercial products; and composition affects the isoelectric point of the whey protein mixture, which affects the pH of coacervation.

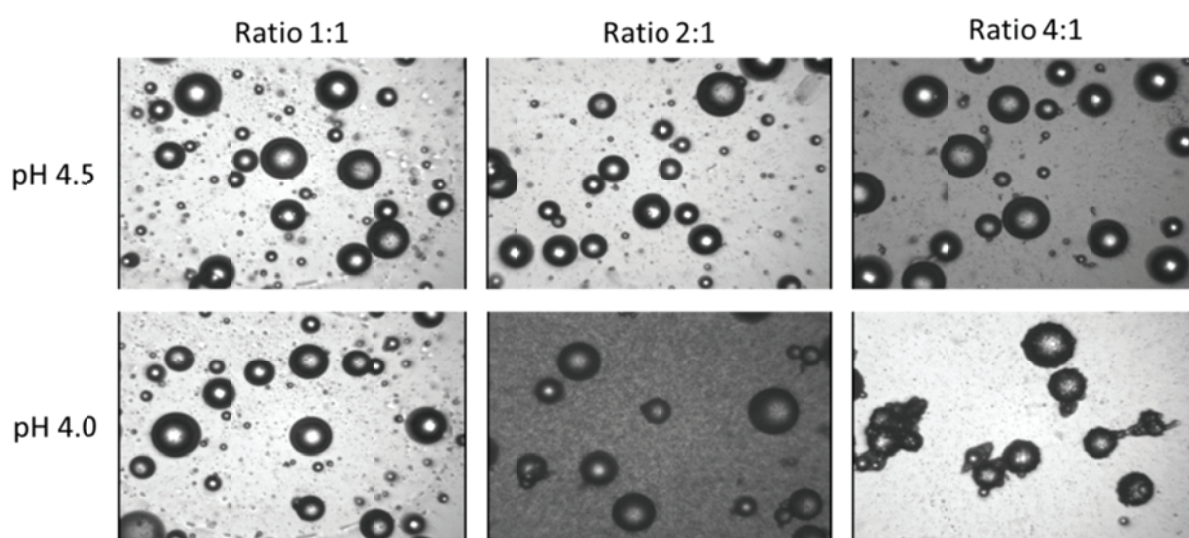


Figure 4.5: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate at three different Pr:Ps ratios. Comparison of microcapsules formation as a function of pH.

3.5 Influence of biopolymers concentration

Biopolymers concentration is also a factor influencing complex coacervation. In the present study, microcapsules formation and aspect were investigated at three different biopolymers concentrations: 0.5, 1 and 3 %. As shown in Figure 4.6, coacervates appeared at less acidic pH when biopolymer concentration was increased. Indeed, coacervate formation was not observed at pH 4.5 in the biopolymers mixture at 0.5 % concentration, but cloudiness was observed in the mixture with 1 % biopolymers and definite coacervate droplets formed in the 3 % biopolymers mixture. For the β -lactoglobulin/acacia gum system, Schmitt (2000b) found that increasing biopolymer concentration enlarged the pH range at which coacervation starts. A similar observation was also reported by

Weinbreck (2003) on the whey protein/acacia gum system, which is in accordance with the present results. In the present study, 1 % was the optimum biopolymers concentration where complex coacervation was maximum. Moreover a biopolymers concentration between 0.5 and 1 % seemed sufficient to encapsulate 5 % of oil droplets in the previous study of Weinbreck (2004b) dealing with oil encapsulation by the whey protein/acacia gum system. Such optimum concentrations are in accordance with the present results showing sufficient encapsulation of oil (3.6 %) at biopolymers concentrations of 0.5 - 1 %.

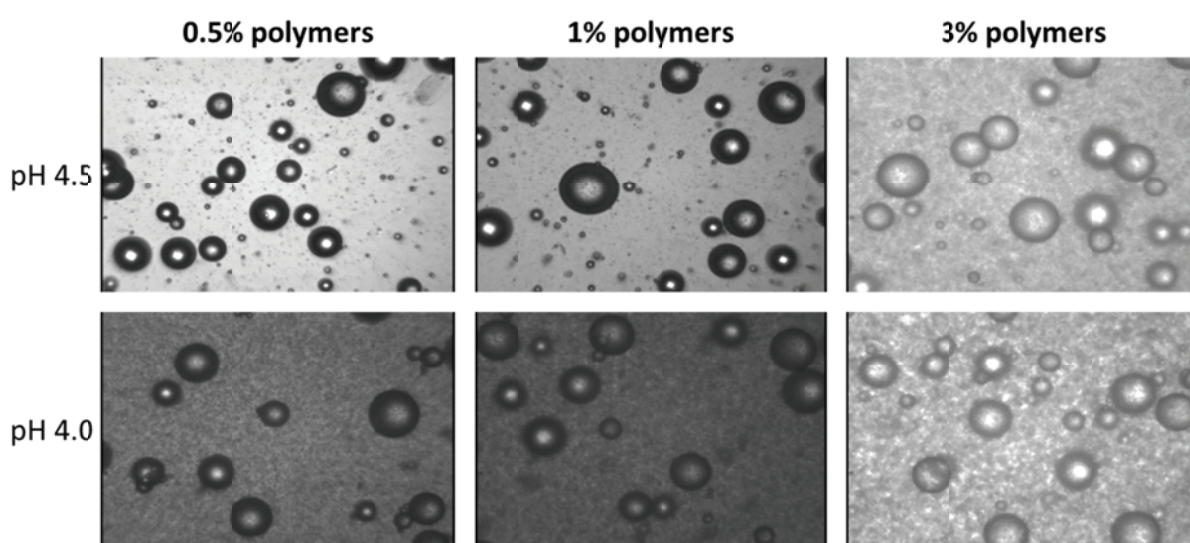


Figure 4.6: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate. Microcapsules formation as a function of pH at different total biopolymers concentrations (0.5, 1 and 3 %).

3.6 Influence of coacervation conditions

The influences of the stirring speed during coacervation, as well as the rate of acid addition, have been studied. Agglomeration of the microcapsules during their formation was observed when the stirring speed during coacervation was maintained at 250 rpm (Figure 4.7). So such stirring rate was not suitable for the formation of mononucleated microcapsules. The stirring speed of 500 rpm during coacervation was enough to obtain mononucleated microcapsules. For the gelatin/acacia gum system, Lemetter (2009) found that a too low shear rate during the coacervation step induced polynucleation of microcapsules, which is in accordance with the present results. The rate of acid

addition has no influence on the morphology of microcapsules. Indeed the same morphology of microcapsules was observed under either progressive or rapid addition of acid (Figure 4.8). The pH value has more influence on the formation of microcapsules than the duration of acid addition. Coacervation is usually carried out after the emulsification step. An attempt to perform coacervation before emulsification was unsuccessful. In such a case where oil was added under strong stirring into a suspension of coacervate particles at pH 3.7, no coacervate could adsorb onto the surface of the oil droplets during the emulsification. Such failure meant that coacervate droplets did not show surface-active properties. Adsorption of particles onto emulsion droplets takes place in many instances when oil and water partially wet the surface of the particles. This is the fundamental principle of the stabilization of Pickering emulsions (Aveyard *et al.*, 2003; Chevalier and Bolzinger, 2012). Preformed coacervate particles cannot adsorb onto oil droplets because they are totally wet by water, which means that their surface is very hydrophilic. The surface properties of coacervate particles appear different depending on whether they have been formed before oil was added and emulsified, or they were formed in the presence of oil droplets. Such behavior suggests that the newly formed coacervate particles bear few hydrophobic patches at their surface whereas the pre-formed coacervate particles have ripened in such a way that those hydrophobic patches have been buried inside the particles, turning the external surface to hydrophilic. So for the formation of microcapsules by complex coacervation the emulsification of the active ingredient has to be performed in aqueous solution of biopolymers at a pH above the isoelectric point of the protein. Then, after the emulsification of the active ingredient, the emulsion can be acidified to allow coacervate formation and deposition around the droplets of active ingredient.

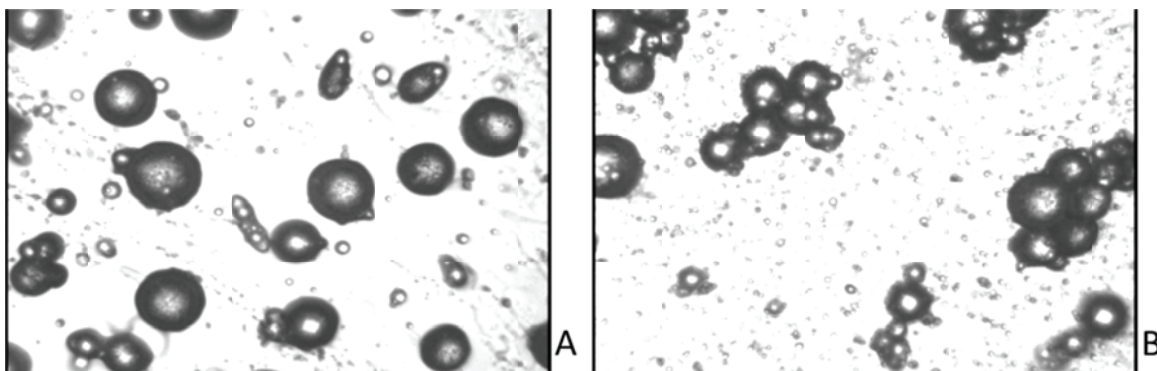


Figure 4.7: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate at pH 3.8 (A: Stirring speed during coacervation of 500 rpm, B: stirring speed during coacervation of 250 rpm).

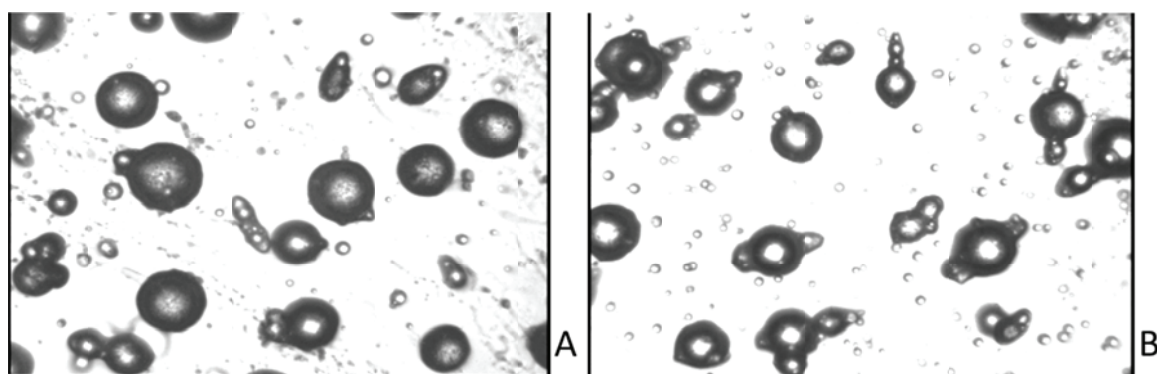


Figure 4.8: Photographs extracted from videos of microencapsulation experiments by complex coacervation between acacia gum and whey protein isolate at pH 3.8 (A: progressive addition of acid, B: rapid addition of acid).

4. Conclusions

In line observations in the stirred reactor using a video probe was used to monitor the microencapsulation process by complex coacervation. This technique had not yet been described for this purpose. Four successive steps ending to the oil encapsulation by complex coacervates have been identified. The first appearance of cloudiness in the solution was observed at pH 4.25, which corresponded to the formation of insoluble biopolymer complexes present as very small particles as their phase separation was starting. Then coacervates droplets that have grown could be observed with the video at pH 4.1. Coacervates droplets deposition onto oil droplets was observed at pH 3.90. And finally encapsulated oil droplets were observed at pH 3.75. The influence of physico-chemical

parameters (Pr:Ps ratio and biopolymers concentrations) on the formation and the aspect of microcapsules and the parameters of the coacervation step could be investigated *in situ* in the stirred vessel. Microcapsules could not be obtained when coacervation was induced before emulsification. This technique proved to be a useful tool to follow microencapsulation process by complex coacervation. The two main benefits are the in line real time monitoring of the process and the possible observation in the stirred vessel. This avoids the drawbacks coming from sampling and manipulations that are necessary for *ex situ* microscopic observations.

Acknowledgement

Thanks to Prayon S.A. for the financial support to present work.

References

- Anal A.K. & Singh H. 2007, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends in Food Science & Technology*, 18 (5), 240-251.
- Annan N.T., Borza A.D., Truestrup Hansen L. 2008, Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions, *Food Research International*, 41, 184-193.
- Arshady R. 1990, Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques Part II: Coacervation, *Polymer Engineering & Science*, 30, 905-914.
- Arshady R. 1999, in *Microspheres, Microcapsules, and Liposomes*, ed., Citus Books, London, Vol. 1, Chap. 10, 279-326.
- Aveyard R., Binks B.P., Clint J.H. 2003, Emulsions stabilised solely by colloidal particles, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 100-102, 503-546.
- Burgess D.J., Carless J.E. 1984, Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 98 (1), 1-8 .
- Champagne C.P. & Fustier P. 2007, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Current opinion in biotechnology*, 18, 184-190.
- Chevalier Y., Bolzinger M.-A., 2013, Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids Surfaces A*, 439, 23-34.
- Chourpa I., Ducel V., Richard J., Dubois P., Boury F. 2006, Conformational modifications of α gliadin and globulin proteins upon complex coacervates formation with gum arabic as studied by Raman microspectroscopy, *Biomacromolecules*, 7, 2616-2623.

Cooper C.L., Dublin P.L., Kayitmazer A.B, Turksen S. 2005, Polyelectrolyte-protein complexes, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10: 52-78.

de Kruif C.G., Weinbreck F., de Vries R. 2004, Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9: 340-349.

Doublier J.L., Garnier C., Renard D., Sanchez C. 2000, Protein–polysaccharide interactions, *Current Opinion in Colloid Interface Science*, 5, 202-214.

Gagnière E., Mangin D., Puel F., Monnier O., Garcia E., Klein J.-P., 2009, Formation of co-crystals: Kinetic and thermodynamic aspects, *Journal of Crystal Growth*, 311 (9), 2689-2695.

Gouin S. 2004, Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends in Food science and technology*, 15, 330-347.

Jizomoto H., 1984, Phase separation induced in gelatin-base coacervation systems by addition of water-soluble nonionic polymers I: Microencapsulation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73 (7), 879-882.

Junyaprasert V.B., Mitrevej A., Sinchaipanid N., Boonme P., Wurster D.E., 2001, Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27 (6), 561-566.

Khalil A., Puel F., Chevalier Y., Galvan J.-M., Rivoire A., Klein J.-P., 2010, Study of droplet size distribution during an emulsification process using in situ video probe coupled with an automatic image analysis, *Chemical Engineering Journal*, 165 (3), 946-957.

Khalil A., Puel F., Cosson X., Gorbachev O., Chevalier Y., Galvan J.-M., Rivoire A., Klein J.-P., 2012, Crystallization-in-emulsion process of a melted organic compound: In situ optical monitoring and simultaneous droplet and particle size measurements, *Journal of Crystal Growth*, 342 (1), 99-109.

Klein M., Aserin A., Ben Ishai P., Garti N. 2010, Interactions between whey protein isolate and gum Arabic, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 377-383.

Lamprecht A., Schäfer U., Lehr C.M. 2001, Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for $\Omega - 3$ unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition, *Journal of Microencapsulation*, 18 (3), 347-357.

Lemetter C.Y.G., Meeuse F.M., Zuidam N.J. 2009, Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up, *AIChE Journal*, 55, 1487-1496.

Lu Y.T., Liu L.N., Zhu X.L., Kong X.Z. 2012, Microencapsulation of dodecyl acetate by complex coacervation of whey protein with acacia gum and its release behavior, *Chinese Chemical Letters*, 23, 847-850.

Lv Y., Zhang X., Abbas S., Karangwa E. 2012, Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsules, *Journal of Food Engineering*, 111, 225-233.

- Madan P.L., Luzzi L.A., Price J.C., 1972, Factors influencing microencapsulation of a waxy solid by complex coacervation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61 (10), 1586-1593.
- McClements D.J., Decker E.A., Park Y., Weiss J., 2009, Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49 (6), 577-606.
- Mekhloufi G., Sanchez C., Renard D., Guillemin S., Hardy J. 2005, pH-induced structural transitions during complexation and coacervation of β -lactoglobulin and acacia gum, *Langmuir*, 21, 386-394.
- Mellema M. 2004, Complex coacervate encapsulate comprising lipophilic core, Patent WO 2004054702 A1.
- Renard D. 2002, Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 163-166.
- Schmitt C., Sanchez C., Desobry-Banon S., Hardy J. 1998, Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689-753.
- Schmitt C., Sanchez C., Despond S., Renard D., Thomas F., Hardy J. 2000a, Effect of proteins aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2, *Food Hydrocolloids*, 14, 403-413.
- Schmitt C., 2000b, Étude de la coacervation complexe entre la β -lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Tolstoguzov V.B., Food proteins and their applications, Marcel Dekker, New York, 1997, p. 171.
- Turgeon S.L., Schmitt C., Sanchez C. 2007, Protein-polysaccharide complexes and coacervates, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 166-178.
- Vandamme T.F., Poncelet D., Subra-Paternault P., Microencapsulation : Des sciences aux technologies, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 2007.
- Weinbreck F., de Vries R., Schrooyen P., de Kruif C.G. 2003, Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic, *Biomacromolecules*, 4, 293-303.
- Weinbreck F., Tromp R.H., de Kruif C.G. 2004a, Composition and structure of whey protein/gum Arabic coacervates, *Biomacromolecules*, 5, 1437-1445.
- Weinbreck F., Minor M., De Kruif C.G. 2004b, Microencapsulation of oils using whey protein/gum Arabic coacervates, *Journal of Microencapsulation*, 21, 667-679.
- Yeo Y., Bellas E., Firestone W., Langer R., Kohane D.S., 2005, Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (19), 7518-7525.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La microencapsulation par coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia est un sujet d'actualité. Malgré de nombreuses études sur ce sujet, certains points nécessitent encore d'être approfondis. En effet, les protéines du lactosérum étant par définition un mélange de protéines, il était intéressant d'étudier l'influence des différentes protéines qui composent ce mélange sur la coacervation avec la gomme d'acacia. De même pour le procédé d'encapsulation, de nombreuses études de cas ont été réalisées mais les mécanismes conduisant à la formation des microcapsules ne restent décrits que de manière partielle.

Par conséquent, les objectifs de ce travail étaient :

- d'encapsuler l'huile de lin par le procédé de coacervation complexe en utilisant les protéines du lactosérum et la gomme d'acacia comme polymères d'encapsulation ;
- de mieux comprendre les mécanismes de coacervation des protéines du lactosérum, notamment l'influence des deux constituants majeurs dans la formation du coacervat ;
- et de mieux comprendre les mécanismes de formation des microcapsules par coacervation complexe, en identifiant les étapes clés du procédé d'encapsulation et en les étudiant de manière approfondie.

Ce travail de thèse peut ainsi se décomposer en deux parties principales: l'une portant sur la coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia, notamment l'influence de la bêta-lactoglobuline et de l'alpha-lactalbumine dans la formation du coacervat, et l'autre portant sur l'étude du procédé d'encapsulation, de l'étape d'émulsification à la formation de microcapsules.

La coacervation complexe des protéines du lactosérum et de la gomme d'acacia

Nous avons commencé cette étude par l'identification des protéines du lactosérum composant notre produit d'étude le Prolacta. Diverses méthodes analytiques adaptées à l'analyse

des protéines ont été utilisées : électrophorèse SDS-PAGE, électrophorèse capillaire, dosage ELISA. La mise au point d'une méthode en électrophorèse capillaire sur gel, permettant l'identification et la quantification de la bêta-lactoglobuline et de l'alpha-lactalbumine dans les protéines du lactosérum, a notamment été réalisée. Cette méthode nous a par ailleurs permis de quantifier ces protéines dans le coacervat. L'influence du ratio protéine/polysaccharide et du pH sur la composition du coacervat a ainsi pu être étudiée. Un pH optimum, correspondant au pH où l'on obtient la quantité maximale de coacervat, a été identifié pour chaque ratio protéine/polysaccharide.

Les données obtenues lors de cette étude peuvent être utilisées afin de mieux contrôler le procédé d'encapsulation par coacervation complexe.

Le procédé d'encapsulation par coacervation complexe

Afin de mener à bien cette étude nous avons commencé par identifier les étapes clés du procédé d'encapsulation par coacervation complexe. L'étape d'émulsification, première étape du procédé, a ainsi fait l'objet d'une étude approfondie sur le système gélatine/gomme d'acacia. Il a été observé que les tailles de gouttes de l'émulsion sont similaires avec l'hélice marine et la turbine Rushton. Il a été mis en évidence que le régime d'écoulement de l'étape d'émulsification est le régime intermédiaire. L'utilisation d'un modèle de régime turbulent a permis de rendre compte des résultats expérimentaux et il pourrait alors être appliqué à d'autres systèmes ou utilisé pour une transposition d'échelle.

Le suivi *in situ* du procédé d'encapsulation par coacervation complexe a été réalisé pour la première fois lors de cette étude. Ce suivi a été réalisé au moyen d'une sonde vidéo immergée dans le réacteur pendant le procédé d'encapsulation. Cette sonde avait été utilisée auparavant au sein du laboratoire pour suivre des procédés d'émulsification et de cristallisation. Cette technique d'étude a ainsi dû être adaptée aux particularités de notre procédé. Des résultats intéressants ont été obtenus

et des connaissances ont été acquises sur les étapes conduisant à la formation des microcapsules par coacervation complexe.

Il serait alors intéressant d'appliquer cette technique à d'autres systèmes protéine/polysaccharide, ainsi qu'à d'autres produits à encapsuler, afin de déterminer si les étapes identifiées lors de notre étude sont généralisables à tous les systèmes.

Bilan global

Cette étude permet d'avoir une vision plus globale du procédé d'encapsulation d'huiles par coacervation complexe appliqué au couple protéines de lactosérum / gomme d'acacia. Nous avons étudié simultanément les questions relevant de la formulation et du procédé afin d'aboutir à des réponses techniques qui puissent avoir une pertinence pour des applications. Au-delà de la compréhension des différentes étapes du procédé et de l'optimisation des paramètres qui en découle, ces travaux donnent un cadre d'étude construit qui permet d'envisager l'étude/optimisation d'autres couples de polymères. En particulier, l'utilisation d'une sonde vidéo immergée dans le réacteur agité est une technique de mesure nouvelle dans le cadre de l'encapsulation et qui offre des possibilités d'études plus pertinentes par rapport à des procédés industrialisables.

Perspectives

Lors de notre étude, nous avons obtenu des microcapsules d'huile de lin par coacervation complexe. Cependant nous n'avons pas pu vérifier l'influence de l'encapsulation sur la stabilité oxydative de l'huile. De même, nous n'avons pas eu le temps de vérifier les conditions de libération de l'huile. Ces travaux restent donc à effectuer.

Nous avons conscience que la recherche d'agents réticulant alternatifs au glutaraldéhyde est un axe de recherche important dans le domaine de l'encapsulation par coacervation complexe. Nous avons d'ailleurs effectué des premiers essais, qui n'ont pas abouti faute de temps... La recherche de nouvelles méthodes de réticulation et/ou de séchage est donc à poursuivre.

Annexe : Publications et communications issues de ce travail

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction de trois articles intégrés à ce manuscrit, l'un d'entre eux a été accepté pour publication et les autres sont à soumettre, et à trois communications orales et affichées dans des congrès internationaux et nationaux.

Publication acceptée:

Ach D., Briançon S., Broze G., Puel F., Rivoire A., Galvan J-M., Chevalier Y., **(Accepté, à paraître)**.
Formation of microcapsules by complex coacervation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*.

Communication orale:

Ach D., Briançon S., Broze G., Chevalier Y., **2013**. Microencapsulation by complex coacervation: Study of the emulsification step. *XIV^e congrès de la Société Française de Génie des Procédés SFGP 2013*, Lyon, octobre 2013.

Communications affichées :

Ach D., Briançon S., Broze G., Chevalier Y., **2013**. Microencapsulation by complex coacervation: Study of the emulsification step. *XXI International Conference on Bioencapsulation 2013, Berlin, août 2013*.

Ach D., Briançon S., Broze G., Chevalier Y., **2012**. Microencapsulation by complex coacervation: Assessment of the emulsification step. « *Vingt cinquièmes Entretiens* » du Centre Jacques Cartier: *Emulsification - Modeling, Technologies and Applications CJC2012*, Lyon, novembre 2012.