



HAL
open science

Peroxydation des lipides émulsionnés et transfert d'ions fer à l'interface huile / eau stabilisée par des protéines de lait : influence des résidus phosphates et de la stabilité du chélate de fer

Tatiana Guzun Guzun-Cojocar

► **To cite this version:**

Tatiana Guzun Guzun-Cojocar. Peroxydation des lipides émulsionnés et transfert d'ions fer à l'interface huile / eau stabilisée par des protéines de lait : influence des résidus phosphates et de la stabilité du chélate de fer. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS012 . tel-00567622

HAL Id: tel-00567622

<https://theses.hal.science/tel-00567622>

Submitted on 21 Feb 2011

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.

Université de Bourgogne
AgroSupDijon
(Eau-Molécules actives-Macromolécules Activités)

École doctorale des environnements, santé, stic

THÈSE en co-tutelle

Pour obtenir le grade

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Science de l'aliment (physico-chimie)

Présenté par

Tatiana Guzun

01/04/2010

**Peroxydation des lipides émulsionnés et transfert d'ions de fer
à l'interface huile/eau stabilisée par des protéines de lait :
influence des résidus phosphates
et de la stabilité de chélate de fer**

**Stratégie d'enrichissement en fer des aliments
et contrôle de la peroxydation des lipides**

Directeur de thèse : Philippe CAYOT

Soutenue publiquement, devant la commission d'examen :

Rapporteurs : Pr. Jacques NICOLAS (AgroParisTech-CNAM)
Pr. Sylvie MARCHESSAU (Université Montpellier II)
Examineurs : Pr. Philippe CAYOT (Université de Bourgogne)
Pr. Rodica STURZA (Université Technique de Moldavie)
Pr. Maria JITARU (Université « Babes-Bolyai » Cluj-Napoca, Roumanie)
Dr. Eliane CASES (Université de Bourgogne)
Dr. Serge PIN (CEA-CNRS)

*« On ne peut pas croire à la moitié de ce qu'on entend raconter,
on ne peut pas croire à la plupart des choses qu'on lit,
mais on peut croire à tout ce que l'on fait... »*

Ellen MacArthur (2002), Du vent dans les rêves, Editions, Paris

Avant propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre deux laboratoires : Eau-Molécules actives-Macromolécules Activités (EMMA), AgroSupDijon, Université de Bourgogne, sous la direction du professeur Monsieur Philippe Cayot et le Laboratoire de Physico-Chimie du Département de la Technologie et Management en Industrie alimentaire de l'Université Technique d'Etat de Moldavie, sous la direction du professeur Madame Rodica Sturza.

Ce travail a fait objet de :

✓ **Publications dans des revues ou ouvrages à comité de lecture**

T. Guzun-Cojocaru, P. Cayot, C. Loupiac, E. Cases, 2010. Iron chelates and oil-water interfacial stabilized by milk proteins: role of phosphate groups and pH. Prediction of iron transfer from aqueous phase toward fat globule surface by changes of interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 24: 364-373.

T. Guzun-Cojocaru, C. Koev, M. Yordanov, T. Karbowskiak, E. Cases, P. Cayot, 2010. Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: transfer of iron from chelates to milk proteins at interface. *Food Chemistry*. Souspresse.

✓ **Comunications par affiches dans des congrés nationaux et internationaux**

T. Guzun-Cojocaru, E. Cases, R. Sturza, P. Cayot. 2008. Effect of iron-chelates on oil/water interfacial proprieties stabilized with milk proteins. First European Food Congress. Food Production · Nutrition · Healthy Consumers. 4-9 November 2008. Ljubljana, Slovenia.

T. Guzun-Cojocaru, E. Cases, R. Sturza, P. Cayot. 2009. Iron fortification of foods & nutraceutics: Peroxidation risk. The evidence of oxidative stability of iron chelates at oil in water emulsions stabilized by milk proteins. Forum des jeunes chercheurs : De la science au professionnalisme, 25 et 26 juin 2009. Dijon, France.

Remerciements

J'adresse mes remerciements au Gouvernement Français et à l'Alliance Française de Moldavie, pour avoir financé la bourse de thèse m'ayant permis de réaliser ce travail. Je remercie vivement les deux directeurs de laboratoire, Madame Andrée Voilley, Directeur du laboratoire IMSAPS au moment où j'ai commencé la thèse (actuellement EMMA sous la direction de Philippe Cayot), et Madame Rodica Sturza, Professeur associée, de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires. Je remercie Mme Sturza et M. Cayot d'avoir initié ce sujet de thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon directeur de recherche qui est aussi l'actuel directeur du laboratoire Eau Molécules actives Macromolécules Activités (EMMA) de l'Université de Bourgogne, Professeur à AgroSupDijon, Monsieur Philippe Cayot. Cette thèse n'aurait vu le jour sans sa confiance, sa patience et sa générosité. J'apprécie la pleine confiance et la liberté scientifique qu'il m'a accordées pour la réalisation de cette thèse. Je voudrais notamment le remercier pour le temps et la disponibilité dont il a fait preuve pendant toutes ces années, ainsi que d'avoir cru en mes capacités et en me donnant une véritable liberté d'action et ce dans d'excellentes conditions logistiques et financières. De plus, les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de la rédaction ont toujours été clairs et précis, me facilitant grandement la tâche et me permettant d'aboutir à la production de ce travail. Merci aussi, Philippe, pour tes conseils et pour le partage d'expériences enrichissantes au niveau de l'enseignement.

J'exprime ma gratitude envers ma co-directrice de recherche, Madame le Professeur Rodica Sturza, pour avoir initié ce sujet, ses conseils précieux au long de cette étude, ainsi que la confiance qu'elle m'a accordée.

Je ne manquerais de remercier aussi le Maître de conférences, Mme Eliane Cases, co-encadrante de la thèse, pour ses conseils et ses remarques percutantes qui m'ont permis d'avancer dans mon travail. Je te suis très reconnaissante notamment pour ton soutien et tes encouragements au démarrage de cette thèse, ce qui pour une étrangère est très important. Merci Eliane de m'avoir aidée à me mettre debout.

Je remercie également Monsieur le Professeur, Jacques Nicolas, Chaire de Biochimie Industrielle et Agro-alimentaire, UMR Ingénierie Procédés Aliments à AgroParisTech-

Conservatoire National des Arts et Métiers et Madame le Professeur Sylvie Marchessau, Université Montpellier II, Polytech' Montpellier, UMR Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes pour avoir accepté d'examiner ce travail en tant que rapporteurs.

J'associe à ces remerciements Monsieur le Professeur Serge Pin, collaborateur CEA-CNRS Saclay, Madame le Professeur Maria Jitaru ; Université « Babes-Bolyai » Cluj-Napoca, Roumanie ; Faculté de Chimie et de Génie Chimique, pour avoir examiné ce document et accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Maître de conférences, Mme Camille Loupiac, membre du comité de cette thèse, pour son enthousiasme, les encouragements et l'intérêt qu'elle a accordés à ce sujet. Merci Camille pour m'avoir aidé à me maintenir debout tout au long de cette aventure, malgré les difficultés. Merci pour m'avoir permis d'avoir accès au Syncontron Soleil où ainsi les expériences de spectroscopie d'absorption par rayons X ont été faites.

J'aimerais encore remercier, Madame Valérie Briois responsable d'appareil, Madame Isabella Ascone, contact scientifique, pour la possibilité offerte de travailler à Syncontron Soleil, pour la très agréable ambiance au moment des expériences de spectroscopie d'absorption par rayons X. Merci, c'était très motivant et j'ai passé des moments inoubliables.

Je remercie vivement la technicienne, Bernadette Rolin, pour son aide précieuse, sa disponibilité et sa gentillesse. Merci Bernadette pour tes leçons en grammaire française.

Merci également à Madame le Professeur Dominique Champion, Pierre-André Marechale et Monsieur le Maître de conférences, Laurent Brachais pour leurs disponibilités et leurs amabilités.

Qu'il me soit également permis d'associer à ces remerciements, Monsieur Bernard Colas, Ingénieur de recherche, Docteur ès-Sciences de l'Equipe Eau Molécules actives Macromolécules Activités, qui m'a apporté de précieux conseils, concernant notamment l'enseignement. Merci, c'était très enrichissant.

Je tiens à remercier aussi Alexandra Da Silva, secrétaire du laboratoire Eau Molécules actives Macromolécules Activités, pour sa disponibilité et sa gentillesse pour toute son aide administrative.

Je remercie également Thomas Karbowiak pour son soutien, son aide et sa contribution à ce travail au cours de ces derniers mois.

Merci à toute l'équipe EMMA pour sa convivialité et les interventions précieuses lors des réunions scientifiques.

Je souhaiterais exprimer ma sympathie à l'ensemble des étudiants, des membres et à tous les stagiaires que j'ai côtoyés au laboratoire d'Eau-Molécules actives-Macromolécules Activités. Je tiens à remercier Elena, Mariana, Katya, George, Caroline, Katryne, Oana, Elie, Eva, Zoheïr, Lucian, Cintya, Alicia, Lisa, Maude, Mia, Magalie, Miriam, Cecile, Stéphane, Martin, Chavdar, Jean-Luc, Sonia, Florence, Phu, Son, Adem et Rémi pour leur amitié et leur aide tout au long de mes études doctorales.

Enfin, et surtout, je dédie ce travail, avec toute mon affection et mon éternelle reconnaissance à mon mari et mon fils pour avoir accepté ce sacrifice de séparation ainsi qu'à ma mère Nina Guzun, mon père Anatol Guzun, ma sœur, mon frère cadet, ma belle-sœur et à mon frère aîné.

Résumé

Le fer ajouté dans des systèmes complexes tels que les aliments induit divers problèmes comme l'oxydation des lipides ou la précipitation d'autres composés présents dans la matrice. Il s'en suit une diminution de sa biodisponibilité et des défauts de goût. L'utilisation de chélates de fer, comme le bisglycinate de fer ou l'EDTA de fer, constitue une voie intéressante : le fer ainsi protégé n'interagirait pas avec la matrice alimentaire.

La stabilité des chélates de fer (bisglycinate de fer et NaFe-EDTA), supposés peu réactif pour l'initiation de peroxydation, a été attestée sur des modèles d'émulsions huile-dans-eau stabilisées par du caséinate de sodium ou de la β -lactoglobuline. Dans un second temps, le travail a consisté à vérifier la faible influence de ces complexes sur la nature de l'interface huile/eau (étude de la tension et de la rhéologie interfaciales). La stabilité du bisglycinate de fer en solution aqueuse et en présence de β -lactoglobuline a également été évaluée en fonction du pH (pH 2, 3,5 et 6,5) par rayons X.

Il a ainsi été montré que la nature des protéines formant l'interface huile/eau et le type de sels de fer jouent un rôle crucial sur la stabilité oxydative des émulsions enrichies en fer. L'affinité des protéines de lait pour les ions fer libres est le premier facteur qui contrôle la peroxydation des matières grasses par l'absence de transfert à l'interface huile/eau. La capacité du complexe bisglycinate à retenir les ions fer et donc à limiter la présence d'ions fer libres (ferriques ou ferreux) apparaît comme le second facteur principal à contrôler. La compétition pour les ions fer entre les groupes fonctionnels des protéines et les contre-ions de chélates (glycinate ou EDTA) gouverne ainsi l'état d'oxydation du système dans des conditions acide/base proche de la neutralité. En milieu acide, l'oxydation est principalement gouvernée par l'instabilité du complexe bisglycinate de fer et par conséquent la lente libération fer ionique dans la phase aqueuse.

Pour résumer, si le complexe de fer n'est pas destabilisé et que la protéine à l'interface huile/eau ne présente pas de groupe fonctionnel ayant une forte affinité pour le fer, alors la peroxydation des lipides en émulsion est faible. Dans notre démonstration, si une protéine n'est pas phosphorylée et pour des pH proches de 7, alors l'émulsion ne sera pas peroxydée car le fer ne migre pas à l'interface huile/eau.

Mots-clefs : Enrichissement en fer, peroxydation lipidique, bisglycinate de fer, β -lactoglobuline, interactions fer protéine.

Abstract

Iron incorporated into food systems induces oxidation and precipitation. The consequences are a reduced bioavailability and a modification of other food flavor. The iron-chelates such as Fe-bisglycinate and Fe-EDTA represent a possibility to avoid side effects, since the iron is protected.

The inertety of Fe-bisglycinate and NaFe-EDTA for lipid peroxidation has been verified in oil-in-water emulsion models stabilized by sodium caseinate or by β -lactoglobulin through the following studies: i/ increase of primary and secondary products of oxidation, ii/ change of the properties of the oil/water interface (tension and interfacial rheology), iii/ the stability of the chelate iron (Fe-bisglycinate) in the aqueous phase with β -lactoglobulin at different pH (pH 2, 3.5 and 6.5). The oil/water interface stabilized by proteins with phosphate groups has induced peroxidation, which was not observed with proteins containing no phosphate residue.

These results demonstrate also that the type of iron salts plays a crucial role in the oxidative stability of emulsions. The ability of the complex to retain iron ion and to avoid “free” ferrous ion is the first important factor to be controlled. The affinity of milk proteins to bind these free iron ions is the second factor that controls the transfer to oil/water interface.

To sum up, the competition for iron ions between functional groups of protein and salt counter-ions (glycinate, sulfate or EDTA) governs the oxidation state of the system in neutral conditions. In acidic medium, the oxidation is mainly governed by the stability of the complex and the possibility to free iron in bulk.

Key Words: *Iron fortification, lipid oxidation, stability of ferrous bisglycinate, β -lactoglobulin, iron-protein interactions.*

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS	3
REMERCIEMENTS.....	4
RESUME.....	7
ABSTRACT	8
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES FIGURES.....	14
LISTE DES ANNEXES	19
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACRONYMES	20
INTRODUCTION GENERALE	22
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	26
I. FER ET CARENCE.....	26
<i>I.1 Rôle du fer dans l'organisme humain</i>	<i>27</i>
<i>I.2 Absorption du fer non héminique et héminique.....</i>	<i>28</i>
<i>I.3 Biodisponibilité du fer héminique et non héminique.....</i>	<i>29</i>
<i>I.4 Traduction de la carence en fer en terme de santé.....</i>	<i>31</i>
<i>I.5 Les besoins journaliers en fer</i>	<i>32</i>
<i>I.6 Les apports quotidiens conseillés en fer.....</i>	<i>34</i>
<i>I.7 Méthodes pour prévenir l'anémie</i>	<i>34</i>
<i>I.8 Enrichissement des aliments en fer</i>	<i>36</i>
<i>I.9 Conclusions</i>	<i>43</i>
II. PEROXYDATION DES LIPIDES (OXYDATION LIPIDIQUE)	45
<i>II.1 Mécanismes généraux de peroxydation des lipides.....</i>	<i>45</i>
<i>II.2 Catalyseurs de la peroxydation des lipides</i>	<i>49</i>
<i>II.3 Produits formés au cours de l'oxydation des lipides.....</i>	<i>56</i>
III. PEROXYDATION DES LIPIDES DANS DES SYSTEMES EMULSIONNES : CINETIQUE	69
<i>III.1 Émulsions alimentaires</i>	<i>69</i>

IV.	ACTIVITE DES ANTIOXYDANTS DANS LES MILIEUX LIPIDIQUES EMULSIONNES	85
MATERIELS ET METHODES		90
MATERIELS ET METHODES		91
I.	MATIERES PREMIERES	91
I.1	<i>La phase lipidique</i>	91
I.2	<i>Les protéines lactières</i>	92
I.3	<i>Les sels de fer</i>	96
II.	PREPARATION DE L'EMULSION	96
II.1	<i>Conditions de vieillissement oxydatif des émulsions</i>	97
II.2	<i>Caractérisation des émulsions : méthodes d'analyses physico-chimiques</i>	97
II.3	<i>Étude de l'interface</i>	109
II.4	<i>Etude des interactions chélate de fer - protéines</i>	117
HYPOTHESE ET OBJECTIFS		128
HYPOTHESE ET OBJECTIFS		129
OXIDATIVE STABILITY OF OIL-IN-WATER EMULSIONS CONTAINING IRON CHELATES: TRANSFER OF IRON FROM CHELATES TO MILK PROTEINS AT INTERFACE		132
II.	ABSTRACT	134
III.	INTRODUCTION	135
IV.	MATERIALS AND METHODS	137
V.	RESULTS AND DISCUSSION	140
V.1	<i>Effect of iron salts on the primary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 6.5</i>	141
V.2	<i>Effect of iron salts on the primary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 3.5</i>	146
V.3	<i>Effect of iron salts on the secondary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 6.5</i>	148
V.4	<i>Effect of iron salts on the secondary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 3.5</i>	148
VI.	CONCLUSIONS	151

EFFECT OF IRON CHELATES ON OIL-WATER INTERFACE, STABILIZED BY MILK PROTEINS: THE ROLE OF PHOSPHATE GROUPS AND PH. PREDICTION OF IRON TRANSFER FROM AQUEOUS PHASE TOWARD FAT GLOBULE SURFACE BY CHANGES OF INTERFACIAL PROPERTIES..... 153

I.	RESUME.....	154
II.	ABSTRACT	155
III.	INTRODUCTION	156
IV.	MATERIALS AND METHODS	158
V.	RESULTS AND DISCUSSION	162
	<i>V.1 Effect of the type of iron salt on the surface activity of the milk proteins at pH 6.5.....</i>	<i>162</i>
	<i>V.2 Effect of the acidic media on the surface activity of milk proteins in the presence of iron salts .</i>	<i>167</i>
	<i>V.3 Effect of various iron salts on the viscoelastic modulus of adsorbed milk proteins at pH 6.5</i>	<i>168</i>
	<i>V.4 Effect of the acidic media on the kinetics of the viscoelastic modulus of milk proteins in the presence of iron salts.....</i>	<i>172</i>
	<i>V.5 Could Fe-bisglycinate interacting with β-lactoglobulin in neutral conditions?</i>	<i>174</i>
VI.	CONCLUSION	177

STABILITE DU BISGLYCINATE DE FER EN PHASE AQUEUSE EN PRESENCE DE B-LACTOGLOBULINE 178

I.	RESUME:.....	179
II.	RESULTATS ET DISCUSSION	180
	<i>II.1 Effets du pH et de la présence de Fe-bisglycinate sur la structure et la stabilité de la β-lactoglobuline ; L'analyse enthalpique différentielle (AED)</i>	<i>180</i>
	<i>II.2 Effets du pH et de la présence de β-lactoglobuline sur le degré d'oxydation du fer dans le bisglycinate de fer et sur la structure atomique du chélate de fer ; Mesures d'absorption des rayons X : spectres XANES au seuil K de l'atome de fer.....</i>	<i>183</i>

CONCLUSION..... 192

CONCLUSION GENERALE 193

PERSPECTIVES..... 198

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 201

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Apports Nutritionnels Conseillés en fer selon les catégories de population (Herberg, 1988).....</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 2 : Caractéristiques des principaux composés du fer utilisés pour l'enrichissement alimentaire (Hurrell, 1997).....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 3 : Résultats d'analyse d'excrétions urinaires collectées à partir de différentes communautés avant et après consommation d'aliments enrichis en NaFe-EDTA (Viteri et al., 1995).....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 4 : Réactions des lipides oxydés avec les protéines (Pokorny, 2003)</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 5 : Principales caractéristiques des caséines du lait de vache (Cayot & Lorient, 1998c) ; pI : point isoélectrique</i>	<i>93</i>
<i>Tableau 6 : Principales caractéristiques des variantes génétiques A et B de la β-lactoglobuline du lait de vache (Cayot & Lorient, 1998c)</i>	<i>94</i>
<i>Tableau 7 : Zeta Potential (mV) of O/W emulsions stabilized by sodium caseinate (SC) and β-lactoglobulin (BLG) at two pH and at 20 °C after addition of different iron salts (NaFe-EDTA/Fe-bisglycinate (Fe-BIS)/FeSO₄) for two different concentrations.....</i>	<i>142</i>
<i>Tableau 8 : Integrated Peroxide Value (iPV) at 7 days for O/W emulsions stabilized by sodium caseinate (SC) and β-lactoglobulin (BLG) at two pH after addition of different iron salts: NaFe-EDTA/Fe-BIS (Fe-bisglycinate)/FeSO₄ = iron sulfate (two amounts). Samples held at 30 °C during 7 days.....</i>	<i>144</i>
<i>Tableau 9 : Integrated TBARS (iTARS) at 7 days for O/W emulsions stabilized by sodium caseinate (SC) and β-lactoglobulin (BLG) at two pH after addition of different iron salts: NaFe-EDTA/Fe-BIS (Fe-bisglycinate)/FeSO₄ = iron sulfate (two amounts). Samples held at 30 °C during 7 days.....</i>	<i>149</i>
<i>Tableau 10 : Characterization of first stage dy/dt at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate and β-lactoglobulin in presence of different iron salts*. The order of the samples in the tables goes the same as in curves 1 to 6.....</i>	<i>164</i>

Tableau 11 : *Viscoelastic modulus at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate and β -lactoglobulin in presence of different iron salts at $t = 5000 \text{ s}^*$. The order of the samples in the tables goes the same as in curves 1 to 6.....* 173

Tableau 12 : *Zeta Potential (mV) of sodium caseinate and β -lactoglobulin stabilized oil-water-interface as affected by addition of different salts of iron at pH 6.5 and at $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Confidents intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$* 176

Tableau 13 : *Température et énergie de dénaturation de la β -lactoglobuline en présence ou non de bisglycinate de fer ($0,86 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) dans un tampon imidazole/acétate $0,1 \text{ M}$, déterminés par l'analyse d'enthalpie différentielle (AED).....* 181

Tableau 14 : *Les positions énergétiques du point d'inflexion principal des dérivées des spectres aux pH 2, 3,5 et 6,5 du bisglycinate de fer avec ou sans la β -lactoglobuline.....* 190

Liste des figures

Figure 4 : Diagramme des orbitales moléculaires dans la molécule d'oxygène et ses formes réactivées.....	50
Figure 5 : Mécanisme d'addition de l'oxygène singulet sur une double liaison (réaction-1) et cycloaddition (réaction 2)	51
Figure 6 : Peroxydation des lipides en présence du fer, et formation de différentes espèces radicalaires (Zhengxing & Wilna, 2002)	53
Figure 7 : Schématisation de la cinétique d'oxydation des lipides riches en résidus d'acides gras polyinsaturés ; 1-initiation, 2-propagation, 3-terminaison	57
Figure 8 : Mécanisme proposé pour l'oxydation des acides gras polyinsaturés en présence du fer (Mozuraityte et al., 2008)	58
Figure 9 : Mécanisme de décomposition des monoperoxydes en fonction de leur degré d'insaturation (Grosch, 1982 ; Villière, 2005)	59
Figure 10 : Mécanisme de décomposition des radicaux 8-, 9-, 10- et 11-peroxy oléique (Frankel, 1980).....	61
Figure 11 : Mécanisme de décomposition du radical 9-peroxy-linoléique (Frankel, 1998b ; Villière, 2005).....	62
Figure 12 : Mécanisme de décomposition du radical 13-peroxy-linoléique (Grosch, 1982) .	63
Figure 13 : La voie de peroxydation de résidu d'acide α -linoléique et la décomposoition en malonaldéhyde d'après Wheatley (2000).....	64
Figure 14 : Mécanismes impliqués dans les interactions entre les protéines et les aldéhydes (Genot et al., 2003). Imine = Base Schiff.....	67
Figure 15 : Schémas représentant les principaux mécanismes de déstabilisation des émulsions.....	71
Figure 16 : Composés « à activité de surface »	72

Figure 17 : Positionnement à l'interface d'émulsifiants polymériques : flexible et globulaire	74
Figure 18 : Représentation schématique de l'implication des protéines émulsifiantes dans l'oxydation d'émulsion stabilisées par le caséinate de sodium en absence (A) ou en présence (B) d'EDTA. pH de la phase aqueuse 6,5 (d'après Villier et Genot(2006))	78
Figure 19 : Représentation schématique de la répartition du substrat oxydable dans la phase dispersée d'une émulsion : a) à faible proportion en linoléate d'éthyle, b) à forte proportion en linoléate d'éthyle. D'après (Coupland & McClements, 1996)	81
Figure 20 : Mécanisme de transfert d'électron d'un phénol et formes mésomères du radical phénoxy formé (stabilisation par résonance)	86
Figure 21 : L'oxydation d'acide ascorbique en acide déhydroascorbique. DHA = acide déhydroascorbique	87
Figure 22 : Schéma de principe de la granulométrie laser	98
Figure 23 : Produits de la réaction entre un aldéhyde et l'acide thiobarbiturique (E1cB-élimination unimoléculaire par base conjuguée) (Bors & Buettner, 1997)	104
Figure 24 : Schéma de la double-couche d'une particule (Puisieux & Seiller, 1983)	107
Figure 25 : Détermination de la tension interfaciale à partir du profil de la goutte	111
Figure 26 : Schéma du dispositif de mesure par AED	119
Figure 27 : Schéma de la spectrométrie d'absorption X, système ultravide (RX ; source synchrotron de rayonnement X) monochromateur (double cristaux de Bragg) ; détecteur ; détection des photons X transmis-chambre à ionisation ; puis système d'acquisition et de traitement des données	121
Figure 28 : Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier	126
Figure 29 : Evolution of the oxidative state of β -lactoglobulin (BLG) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 3.5: a) Peroxide value and b)	

TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size 143

Figure 30 : Evolution of the oxidation state of BLG stabilized O/W emulsion as a function of the change in the interface net charge ($\zeta_{\text{with iron}} - \zeta_{\text{without iron}}$) of the emulsions after addition of various irons salts at pH 6.5 146

Figure 31 : Evolution of the global oxidative state of β -lactoglobulin (BLG) stabilized O/W emulsions after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 3.5. This representation combines the evolution in normalized primary and secondary products of oxidation, expressed as the iPV/iPV_{max} (full lines) and the $iTBARS/iTBARS_{\text{max}}$ (dashed lines) for each iron forms studied..... 150

Figure 32 : Interfacial tension at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20 °C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M. The curves correspond to the average values of 3 results of the interfacial tension. The differences between curves are up to confidence interval 163

Figure 33 : Interfacial tension at the sunflower oil/water interface stabilized by β -lactoglobulin in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20°C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M. The curves correspond to the average values of 3 results of the interfacial tension. The differences between curves are up to confidence interval 166

Figure 34 : Viscoelastic modulus at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20°C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M. Confidents intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$ 169

Figure 35 : Viscoelastic modulus at the sunflower oil/water interface stabilized by β -lactoglobulin in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaF-eEDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20°C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M. Confidents intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$ 171

Figure 36 : Viscoelastic modulus (ϵ) as a function of interfacial tension (γ) for oil/water interface stabilized by sodium caseinate in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20 °C, [Fe] = 0.2·10⁻⁶ M, [protein] = 0.4·10⁻⁶ M..... 172

Figure 37 : Viscoelastic modulus (ϵ) as a function of interfacial tension (γ) for oil/water interface stabilized by β -lactoglobulin in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20 °C, [Fe] = 0.2·10⁻⁶ M, [protein] = 0.4·10⁻⁶ M..... 173

Figure 38 : Second-derivative spectra of β -lactoglobulin collected at resolution 4 cm⁻¹ with 250 scan. 1. β -lactoglobulin without Fe-bisglycinate; 2. β -lactoglobulin with Fe-bisglycinate. Other experimental conditions: pH 6.5, 20 °C, [Fe] = 0.36·10⁻³ M, [protein] = 0.86·10⁻³ M 175

Figure 39 : Thermogramme de β -lactoglobuline en solution dans le tampon imidazole/acétate 0,1 M à pH 6,5 : a) avec et b) sans bisglycinate de fer (1,78·10⁻³ M) 181

Figure 40 : Thermogramme de β -lactoglobuline en solution dans le tampon imidazole/acétate 0,1M à pH 3,5 : a) avec et b) sans bisglycinate de fer (1,78·10⁻³ M)..... 183

Figure 41 : Spectres XANES du bisglycinate de fer aux pH 6,5 (1), 3,5(2), et 2(3). Température ambiante 184

Figure 42 : Dérivées premières des spectres d'absorption du bisglycinate de fer aux pH 6,5 (1), 3,5(2), et 2(3)..... 185

Figure 43 : Spectres XANES du bisglycinate de fer en présence : (1) de l'air, (2) de la dithionite (Na₂S₂O₄) et (3) du N₂ à pH 6,5. Température ambiante 186

Figure 44 : Dérivées premières des spectres d'absorption du bisglycinate de fer en présence : (1) de l'air, (2) de la dithionite (Na₂S₂O₄) et (3) du N₂ à pH 6,5..... 187

Figure 45 : Spectres XANES ; (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 6,5 188

Figure 46 : Dérivées premières des spectres d'absorption : (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 6,5 189

Figure 47 : Spectres XANES : (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 3,5 189

Figure 48 : Dérivée première des seuils d'absorption : (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 3,5 190

Figure 49 : Représentation schématique du rôle des protéines laitières sur la stabilité oxydative de système émulsionné : le caséinate de sodium et la β -lactoglobuline (protéines avec et sans groupements phosphate en présence) (A) de fer sous forme ionique (libre) (B) de fer sous forme chélaté 197

Liste des annexes

Annexe 1 : Le diamètre moyen en surface $d_{3,2}$ (μm) des émulsions huile-dans-eau stabilisées par le caséinate de sodium (CN) ou par la β -lactoglobuline (BLG) en fonction de la nature et de la quantité de sels de fer, à deux pH et à une température de 20 °C... 222

Annexe 2 : Evolution of the oxidative state of sodium caseinate (SC) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 6.5: a) Peroxide value and b) TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size 223

Annexe 3 : Evolution of the oxidative state of β -lactoglobulin (BLG) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 6.5: a) Peroxide value and b) TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size 224

Annexe 4 : Evolution of the oxidative state of sodium caseinate (SC) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 3.5: a) Peroxide value and b) TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size 225

Annexe 5 : Spectroscopie d'Absorption Atomique 226

Liste des abréviations et des acronymes

AED : analyse d'enthalpie différentielle

BLG ou β -lactoglobulin (e) : bêta-lactoglobuline

EDTA : acide éthylène diamine-tétraacétique

E/H : émulsion eau-dans-huile

Fe-BIS : bisglycinate de fer

FTIR : Fourier Transformed InfraRed Spectroscopie (InfraRouge à Transformée de Fourier)

ΔH : variations enthalpiques

H/E : émulsion huile-dans-eau

HLB : balance hydrophile-lipophile

iPV : integrated peroxide value

iPV_{max} : integrated peroxide maximum value

iTBARS : integrated thiobarbituric acid reactive substances

iTBARS_{max} : integrated thiobarbituric acid reactive substances (maximum value)

NaFe-EDTA : éthylène diaminetétraacétate de sodium et de fer

oméga 3 ou ω -3 : résidus d'acide gras de la série n-3

oméga 6 ω -6 : résidus d'acide gras de la série n-6

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

O/W : oil-in-water

PV : peroxide value

R-X : spectroscopie d'absorption par rayons X

SAB : sérum albumine bovine

SC : sodium caséinate

sr-TBA : substances réactives à l'acide thiobarbiturique

TBARS : thiobarbituric acid reactive substances

Td : température de dénaturation

WPI : whey proteins isolate

ε : module viscoélastique

γ : tension interfaciale

ζ : zéta

Introduction

Introduction générale

Le fer est, parmi les micronutriments, celui dont la couverture des besoins pose le plus de problèmes pratiques à résoudre pour l'espèce humaine. Selon l'OMS, la carence en fer est un problème de santé publique non seulement dans les pays en voie de développement mais aussi dans les pays industrialisés, où plus de 3,5 milliards de personnes sont touchées (OMS-WHO, 2009). En utilisant les critères internationaux concernant la prévalence d'anémie chez les mères et leurs enfants, la République de Moldavie est classée parmi les pays où la déficience en fer est un problème majeur. Une estimation récente de la situation de la République de Moldavie, basée sur des statistiques officielles, des rapports des experts nutritionnistes et des études réalisées par des organismes internationaux, a mis en évidence la présence de l'anémie ferriprive chez presque 48 % des femmes enceintes ou en âge de procréer, chez 28 % des enfants de 5 ans et chez 43 % des nourrissons.

Les causes de ce problème sont nombreuses, mais l'une des causes majeures est le faible niveau de la disponibilité biologique du fer dans les aliments.

Parmi les diverses stratégies développées en vue de résoudre ce problème de santé publique, l'élaboration d'aliments enrichis en fer semble constituer l'approche la plus rentable, viable et optimale dans la lutte contre l'insuffisance en fer (Zhengxing & Wilna, 2002). Cependant, malgré tous les efforts engagés dans cette direction, notamment dans les pays industrialisés, les apports réels sont toujours en dessous des recommandations prévues (Remondetto & Subirade, 2003). L'origine de ces échecs est multifonctionnelle. Cela peut tout d'abord s'expliquer par le fait que le fer est un élément extrêmement sensible à l'oxydation et à la complexation : les conditions de préparation et de stockage des aliments, les variations de pH, la présence d'autres micronutriments peuvent influencer considérablement sa biodisponibilité (Jackson & Lee, 1992 ; Hurrell, 1997 ; Dary, 2002). De ce point de vue, l'enrichissement des aliments en fer nécessite donc l'élaboration d'aliments vecteurs de fer avec une structure bien définie. Il convient cependant de vérifier que cet enrichissement n'entraîne pas d'effets secondaires gastro-intestinaux comme nombre de suppléments de fer en provoqueraient (Cremonesi & Caramazza, 1993 ; Martins *et al.*, 1995 ; Hurrell, 1998). Le taux d'enrichissement dépend également des besoins nutritionnels de la population cible, de la consommation de l'aliment enrichi et de sa biodisponibilité. La biodisponibilité, à son tour, est influencée par les facteurs diététiques

et les facteurs individuels de l'organisme. Outre la biodisponibilité, l'oxydation constitue un problème crucial, car une fois le fer ajouté à une matrice alimentaire, celui-ci ainsi que les constituants de la matrice peuvent se peroxyder (Hurrell, 1998 ; Mellican *et al.*, 2003). L'oxydation des lipides est un phénomène chimique qui provoque la dégradation des qualités sensorielles, nutritionnelles et technologiques des aliments. Il est donc important de sélectionner attentivement les matrices alimentaires qu'il faut enrichir, ainsi que les fortifiants de fer à utiliser.

Pour protéger et transporter des composés essentiels dans des endroits cibles de l'organisme, différentes stratégies ont été développées (Pothakamury & Barbosa-Canovas, 1997). Une des plus importantes ces dernières années consiste à encapsuler les molécules d'intérêt dans des matrices polymériques (Lysionek *et al.*, 2002). Une fois encapsulé, le composé d'intérêt est rajouté au système alimentaire. Cependant les difficultés majeures de ce type d'approche sont : (i) d'arriver à contrôler la stabilité du système, (ii) d'éviter les séparations de phases et (iii) de baisser les coûts de production des capsules.

Une autre alternative consiste à utiliser des sels qui maintiennent le fer dans un état « protégé ». Ainsi, l'utilisation de chélates du fer, tel que le bisglycinate de fer (Fe-BIS) et/ou l'éthylènediaminetétracétate de fer (NaFe-EDTA) et de sodium dans les systèmes alimentaires constitue une voie intéressante pour minimiser ces problèmes. Le Fe-BIS constitue actuellement une solution que beaucoup de nutritionnistes considèrent comme étant très prometteuse (Ashmead *et al.*, 1985 ; Bovell-Benjamin *et al.*, 2000 ; Ashmead, 2001 ; Allen, 2002).

Le travail réalisé tout au long de cette étude a donc pour objectif d'étudier le potentiel « oxydant » du fer contenu dans le chélate « bisglycinate de fer » au sein de n'importe quelle matrice alimentaire. De manière générale, un aliment contient toujours de la matière grasse. L'émulsion huile-dans-eau (H/E) nous est apparue comme le modèle alimentaire type en ce qui concerne la problématique de la peroxydation en présence de sel ou de complexe de fer. Les questions que l'on se pose sont alors les suivantes : i/ Est-ce que le Fe-BIS peut provoquer une oxydation de la matrice alimentaire enrichie ? ii/ Quels sont les effets des conditions environnementales, notamment de pH, sur la stabilité du Fe-BIS, seul ou en présence de la protéine ? iii/ Est ce que le Fe-BIS peut modifier les propriétés fonctionnelles des composés constitutifs de la matrice alimentaire enrichie en fer ? Nous

comparerons les effets du bisglycinate de fer à ceux engendrés par le sulfate de fer (II) (sel communément employé pour l'enrichissement des aliments en fer), ou encore par l'éthylènediaminetétracétate de fer et de sodium (NaFe-EDTA), puissant chélate du fer qui présente néanmoins un risque de toxicité (Zhu & Miller, 2007).

La présente étude se compose de plusieurs parties. Tout d'abord, est présentée une synthèse bibliographique conséquente, qui nous a permis de dégager les hypothèses de travail et les objectifs de cette étude. Puis, dans une seconde partie les matériels et méthodes seront détaillés. Ensuite, la troisième partie sera constituée de trois chapitres distincts, présentés sous forme d'articles : deux en anglais et un troisième en français, dans lesquels nous exposerons les résultats expérimentaux de ce travail ainsi que leur analyse. Il s'agit, dans un premier temps, de présenter l'influence de différents paramètres, en particulier le type de sel de fer, la concentration en fer et le pH sur la stabilité oxydative des émulsions huile-dans-eau stabilisées soit par la β -lactoglobuline soit par le caséinate de sodium. Dans un deuxième temps, nous présenterons l'impact des chélates ou sels du fer sur les propriétés de surface des protéines à l'interface en fonction du pH afin d'expliquer les résultats observés sur le développement de réactions de peroxydation. Enfin, dans un troisième temps, nous étudierons l'impact du pH et de la nature de la protéine (β -lactoglobuline) sur la stabilité du chélate du fer pour achever l'explication des phénomènes de peroxydation observés. Nous verrons, ainsi, l'effet des chélates ou des sels de fer sur la structure de la β -lactoglobuline. La toute dernière partie de ce travail sera consacrée à la conclusion générale et aux perspectives de cette étude.

Revue bibliographique

Revue bibliographique

I. Fer et carence

La carence en fer est un des problèmes de santé publique les plus répandus dans le monde, non seulement dans les pays en voie de développement mais aussi dans les pays industrialisés (OMS-WHO, 2009). Parmi les nombreuses carences mondiales (notamment iode et vitamine A), la carence en fer constitue la plus importante (Bloem *et al.*, 1996) puisque 37 % des femmes en général et 51 % des femmes enceintes souffrent d'un faible taux d'hémoglobine (<110 g.L⁻¹). Ce pourcentage est élevé à cause de la haute prévalence de l'anémie dans les pays en voie de développement qui atteint 56 % de la population des femmes (contre 18 % dans les pays industrialisés). La prévalence de la carence en fer chez les enfants dans le monde entier est encore plus élevée que celle rencontrée chez les femmes (Thomas & Frankenberg, 2002).

Au cours des dernières années, ce problème a conduit de nombreux chercheurs à s'intéresser à la formulation d'aliments enrichis en fer (Bovell-Benjamin *et al.*, 2000 ; Chaud *et al.*, 2002 ; Zhengxing & Wilna, 2002 ; Hurrell *et al.*, 2004). Plusieurs matières premières telles que le lait (Osman A., 2002 ; Miglioranza *et al.*, 2003), le sucre (Viteri *et al.*, 1995), ou encore des produits alimentaires transformés comme les sauces (Thuy *et al.*, 2003) et les condiments (par exemple la poudre du curry) ont été fortifiées avec du fer. Cependant, du fait de son interaction avec les autres ingrédients, le fer est souvent faiblement complexé (Hurrell, 1997) et par conséquent, sa réelle efficacité au sein de l'organisme reste encore à démontrer (Hurrell, 1998). Les aliments pour enfants ou ceux qui ont été conçus pour avoir un impact positif sur la santé (aliments fonctionnels) peuvent également être supplémentés en fer (Malaspina, 1996 ; Hilliam, 1998). Ainsi, il semblerait que les produits alimentaires fortifiés avec du fer améliorent les fonctions immunitaires (Bradley & Xu, 1996 ; Walter *et al.*, 1997), et activent des enzymes importantes, prévenant ainsi certaines maladies, telles que les maladies cardio-vasculaires et/ou le vieillissement (Dreosli, 1996 ; Pollitt, 1997).

Il existe des corrélations positives avérées de l'effet du fer sur le développement de quelques tissus comme par exemple le cerveau (Guesry, 1998). Par conséquent, on peut dire que le manque en fer a des effets importants aussi bien sur le plan physiologique de l'individu, que sur la santé publique et l'économie d'un pays (Thomas & Frankenberg, 2002).

I.1 Rôle du fer dans l'organisme humain

Bien que présent en très faible quantité dans l'organisme (0,005 % (m/m) de la masse corporelle), le fer joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques (Yip, 2000). Il intervient dans la constitution de l'hémoglobine (protéine respiratoire des globules rouges qui assurent les échanges gazeux avec le milieu extérieur), de la myoglobine (forme de réserve de l'oxygène du muscle) et d'enzymes jouant un rôle capital dans des réactions métaboliques (Herberg, 1988). Le fer existe sous deux formes : le fer héminique et le fer non héminique. Ces deux formes diffèrent tant par la nature chimique que par leur fonctionnalité (Prasad, 1978).

Le fer héminique entre dans la constitution de l'hémoglobine, de la myoglobine et des enzymes hémoprotéiques, il est incorporé dans la structure de l'hème. L'atome de fer est lié à quatre atomes d'azote par recouvrement d'orbitale (Figure 1). Les fonctions qu'il assure sous cette forme sont :

- Le transport de l'oxygène des poumons aux tissus, par l'hémoglobine présente dans les hématies, appelée fonction oxalovinique du sang.
- La fixation de l'oxygène par la myoglobine musculaire qui a plus d'affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine.
- La respiration cellulaire où les cytochromes des mitochondries assurent le transfert des électrons du substrat à l'oxygène (Herberg & Galan, 1989).

Le fer non héminique, qui est présent dans certaines enzymes (la plupart de ces enzymes à fer non héminique contiennent

4 atomes de fer par molécule), permet leur activité et correspond aux formes de transport (via la transferrine) et de réserve du fer. Les réserves en fer de l'organisme sont localisées au niveau du système réticulo-endothélial, notamment dans la rate, la moelle osseuse, les muscles squelettiques et dans le parenchyme hépatique. Le fer est distribué dans de nombreux

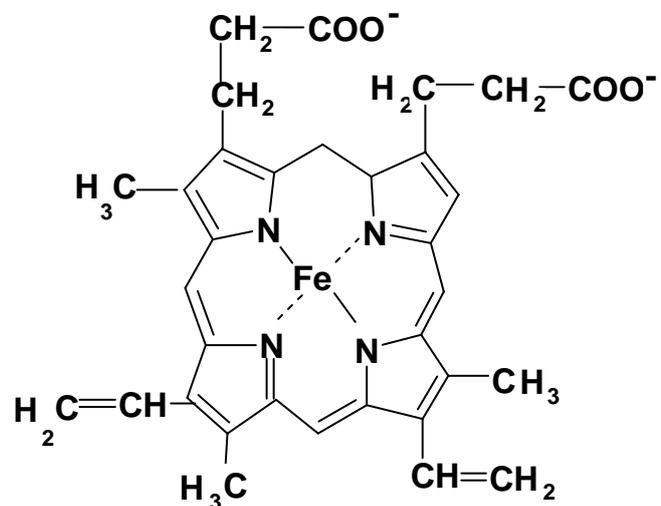


Figure 1 : Structure de l'hémoglobine

organes au niveau de multiples localisations subcellulaires et intervient ainsi dans des fonctions métaboliques variées (Benito & Miller, 1998).

On retrouve ainsi du fer non hémérique dans :

- l'aconitase ; lié à l'atome de soufre, le fer du résidu cystéyl, assure la transformation du citrate en isocitrate, étape métabolique du cycle de Krebs.
- les monooxygénases, qui assurent le transfert d'un atome d'oxygène sur un substrat. Parmi ces enzymes on peut citer : la phénylalanine hydroxylase, la tyrosine hydroxylase, la tryptophanehydroxylase. Ceci explique qu'une déficience importante en fer entraîne un défaut de synthèse des catécholamines dans le cerveau, conduisant à un retard intellectuel.
- la ribonucléotide réductase responsable de la transformation du ribonucléoside diphosphate en désoxyribonucleoside diphosphate, nécessaire à la synthèse de l'ADN.
- la lipoxygénase ainsi que la NADH ubiquinone réductase mitochondriale.

Le fer circule dans le plasma, lié à une protéine : la transferrine (ou sidérophiline). Chez les humains, cette protéine a une capacité totale de fixation de l'ordre de 300 à 350 $\mu\text{g.dL}^{-1}$, mais elle ne transporte qu'environ 100 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ de fer, le tiers de sa capacité (Hercberg, 1988). D'autres protéines, telles que la lactoferrine et la ferritine, sont également susceptibles de transporter le fer, mais elles n'ont, semble-t-il, aucun rôle dans le transport physiologique du fer (Hercberg, 1988). L'originalité du métabolisme du fer tient au fait qu'il s'effectue quasiment en circuit fermé. L'organisme est donc particulièrement économe de son fer.

Du point de vue quantitatif, une femme de 60 kg possède 2,3 g de fer et un homme de 70 kg en possède 3,8 g.

Si on considère le bilan global de distributions/fonctions du fer au sein de l'organisme, 2/3 du fer présent dans le corps humain se trouve lié à l'hémoglobine ou à la myoglobine, directement impliquées dans le transport de l'oxygène et dans son utilisation musculaire. La quasi-totalité du tiers restant correspond au fer de réserve stocké dans le tissu réticulo-endothélial et dans le foie.

I.2 Absorption du fer non hémérique et hémérique

Le fer non hémérique est libéré des complexes auxquels il est lié dans les aliments par les sécrétions gastriques (sécrétion peptique, HCl). Une fois libéré, il entre dans un pool gastrique

Le fer où il peut être réduit, chélaté ou rendu insoluble. Les composés ferreux (Fe^{2+}) sont mieux absorbés que les composés ferriques (Fe^{3+}) car le fer divalent forme facilement des chélates solubles en milieu légèrement basique. Le fer trivalent n'est soluble qu'à pH 5 ; il peut alors se complexer à certains peptides et polysaccharides qui peuvent être ensuite absorbés. Le Fe^{3+} peut aussi être réduit en Fe^{2+} . Le fer ferrique, qui n'est ni réduit ni chélaté, forme des complexes insolubles et est peu ou pas absorbé. Le fer bivalent ainsi obtenu est transféré au cytoplasme par l'intermédiaire de certains transporteurs transmembranaires de cations bivalents (DMT1 : "divalent metal transporter 1") (Hercberg & Galan, 1989).

Une fois libéré, le fer est absorbé au niveau du duodénum-jéjunum et transporté au niveau de la moelle et du foie où il est stocké et utilisé par les jeunes hématies de la moelle hématopoïétique pour la formation de l'hémoglobine.

L'absorption du fer héminique n'est pas influencée par le pH et peu influencée par les sécrétions gastriques. Contrairement au fer non héminique, le fer héminique n'est pas capté par les récepteurs de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale. Le mécanisme d'absorption n'est pas connu, mais l'endocytose semble jouer un rôle prépondérant. On ne sait pas précisément si c'est l'hème seul ou sous forme complexée avec la globine qui pénètre dans la cellule. Une fois dans l'entérocyte, le fer est extrait du noyau porphyrinique de l'hème par des oxygénases puis suit le même chemin que le fer absorbé sous forme ionisée.

I.3 Biodisponibilité du fer héminique et non héminique

La biodisponibilité du fer dans l'organisme humain est influencée par des facteurs diététiques et des facteurs individuels. Les facteurs diététiques comportent, d'une part les **inhibiteurs** de l'absorption du fer comme les phytates, les polyphénols, le calcium, certaines protéines végétales (par exemple soja) et animales (par exemple caséines du lait et protéines de l'œuf) (Hurrell, 1997). Les composés riches en phosphore ou magnésium, le malonaldéhyde, l'acide oxalique et l'acide phytique sont des puissants inhibiteurs de l'absorption du fer (Salovaara *et al.*, 2002). Il existe également les **promoteurs** de l'absorption du fer (Hercberg, 1988) tels que les vitamines A, C et E, l'acide folique ou certaines protéines animales (par exemple l'hémoglobine, la myoglobine et le hydrolysate de 1-25 β -caséine ou voir aussi les caséinophosphopeptides (CPP) (Almaas *et al.*, 1997 ; Bouhallab *et al.*, 1999 ; Bouhallab *et al.*, 2002 ; Chaud *et al.*, 2002).

Plus que la quantité totale de fer présent dans l'alimentation, c'est surtout la quantité de fer assimilable qui constitue le facteur déterminant pour couvrir les besoins. En effet, diverses études impliquant des aliments marqués au fer radioactif (^{55}Fe , ^{59}Fe) ont mis en évidence que l'absorption moyenne de fer chez des sujets en bonne santé est très variable d'un aliment à l'autre (Herberg & Galan, 1989). Ces différences s'expliquent par la forme sous laquelle le fer est apporté par les aliments : fer héminique ou fer non héminique. Le fer héminique, qui fournit de 10 à 15 % du fer alimentaire consommé dans les pays industrialisés, se trouve dans l'hémoglobine et la myoglobine des viandes rouges et est particulièrement biodisponible (de 20 à 30 % de fer). Le fer non héminique contenu dans les céréales, les légumes, les fruits et les produits laitiers, a une absorption très variable qui dépend de la nature et de la composition du repas. Selon l'action des facteurs énumérés ci dessus, l'absorption du fer à partir d'un repas peut varier de 1 à 20 % chez les individus ayant un statut en fer comparable. Parmi les aliments qui contiennent des substances qui inhibent fortement l'absorption du fer, on trouve le thé, le café, le jaune d'œuf et le son. Les substances responsables sont principalement les polyphénols, les phytates et les protéines (par exemple la lécithine). Selon la composition des régimes alimentaires, le coefficient d'absorption du fer varie de 5 % pour des repas à base de céréales et/ou de racines-tubercules, ou pauvres en produits carnés et en vitamine C, à 15 % pour des repas contenant des quantités importantes d'aliments carnés et de sources de vitamine C.

On constate donc que la biodisponibilité de ces deux formes de fer varie en fonction des aliments dans lesquels elles se retrouvent. En tenant compte de la différence existant entre les deux types de fer alimentaire, il est clair que le consommateur devrait donc s'attacher à la biodisponibilité du fer héminique influencée par les facteurs alimentaires comme le pH et la composition de la sécrétion digestive et d'autres constituants du repas. Si la problématique de l'influence des facteurs inhibiteurs ou promoteurs reste indiscutable, des phénomènes de feed-back et d'effet d'accumulation des facteurs alimentaires, rarement pris en compte, sont pourtant à considérer avec attention. Le feed-back est une mobilisation de l'absorption du fer en réponse aux besoins métaboliques. Ce feed-back est important quand les besoins sont élevés, ce qui est lié à des réserves faibles. La régulation par le feed-back se traduit ainsi par le fait que les individus sains n'accumuleront pas de fer lors de repas enrichis en fer ou bien même à partir de doses modérées des sels de fer à haute biodisponibilité (Bears, 2002). Les effets liés à une accumulation de facteurs alimentaires apparaissent quand, dans le même repas, se retrouvent deux composés actifs (ou plus). À titre d'exemple, les effets promoteurs

Le fer de l'acide ascorbique et des tissus animaux sur l'absorption du fer ne sont pas additifs quand ils se retrouvent ensembles dans un repas.

Cet effet de modulation a été démontré en présence d'inhibiteurs d'assimilation du fer. Par exemple, l'acide ascorbique est plus efficace pour accroître l'assimilation du fer quand il est ajouté à des produits à basse biodisponibilité en fer. Il faut donc en tenir compte lors de la fortification alimentaire, et éviter la présence conjointe de plusieurs composés actifs.

I.4 Traduction de la carence en fer en terme de santé

La déficience en fer se traduit par une diminution de la quantité totale de fer dans l'organisme. Elle se développe en situation de besoins ou de pertes accrus et s'installe lentement en évoluant selon 3 stades (Hurrell, 1998).

L'épuisement des réserves totales de fer représente la première étape. Le corps ne dispose plus de fer emmagasiné, mais le taux d'hémoglobine reste supérieur au seuil établi. Des réserves de fer épuisées sont définies par un faible taux sérique de ferritine ($< 12 \cdot 10^{-3} \text{mg.L}^{-1}$).

Le second stade est connu sous le nom d'érythroïèse causée par une carence en fer. Ce sont surtout les globules rouges en train de se développer qui ont besoin de fer et, à ce stade, l'apport en fer, alors amoindri, est associé au développement de l'érythroïèse. L'érythroïèse peut être régulée entre autres par la vitamine B12 (augmente la production). L'érythroïèse nécessite absolument une quantité suffisante de fer dans l'organisme.

Pour des raisons pratiques, le premier stade ainsi que le second sont souvent classés comme **carence en fer**.

L'anémie ferriprive est la troisième forme de la déficience en fer et c'est la forme la plus grave de la carence en fer. Cette anémie provient de réserves très insuffisantes de fer pour la synthèse de l'hémoglobine. D'autres manifestations cliniques lui sont également associées selon l'âge et l'état du sujet :

- Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que l'anémie ferriprive chez le jeune enfant conduit à un retard du développement cognitif (la diminution significative des performances spatiales, visuelles et auditives, par rapport à celles des enfants sains, ou des enfants carencés mais non anémiés) (Lozoff *et al.*, 1982 ; Hurrell *et al.*, 2004) ;

- Chez l'enfant et chez l'adolescent, la carence en fer est associée à une diminution des performances scolaires (Halterman *et al.*, 2001). Chez l'adulte, elle provoque une diminution des performances physiques et intellectuelles (Walter *et al.*, 1997) ;
- Au cours de la grossesse, l'anémie augmente le risque d'accouchement prématuré, ainsi que la mortalité maternelle dans les cas de carence sévère (Allen, 2002) ;
- La carence en fer est encore associée à des perturbations des défenses immunitaires. Elle altère la fonction bactéricide des polynucléaires, en raison de la perturbation de certains processus enzymatiques. Elle affecte aussi le fonctionnement des lymphocytes T. Chez les enfants ayant un déficit en fer, on rapporte une incidence accrue d'infections grippales et intestinales (Berger *et al.*, 2000).

Compte tenu des problèmes causés par la déficience en fer, il devient donc nécessaire d'intervenir, avec des solutions efficaces et pratiques pour éliminer ou réduire ce problème.

I.5 Les besoins journaliers en fer

La consommation journalière en fer est une nécessité en raison des pertes qu'impose le métabolisme du fer. Le métabolisme du fer se caractérise par une absorption et une élimination quotidienne faible, contrastant avec des mouvements importants dans l'organisme. Les pertes basales journalières par desquamation des cellules des différentes surfaces du corps humain, principalement des intestins, varient chez l'adulte de 0,9 à 1 mg de fer/jour, ce qui correspond à des pertes d'environ $14 \cdot 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (poids corporel). Pour les femmes, de la période puberté à la période ménopause, il est nécessaire d'ajouter aux pertes basales celles liées aux hémorragies menstruelles soit environ de 0,4 à 0,5 $\text{mg} \cdot \text{jour}^{-1}$. Les besoins en fer sont considérablement augmentés durant la grossesse, du fait de l'augmentation physiologique de la masse érythrocytaire, de la constitution des tissus du fœtus et du placenta. Ces dépenses spécifiques viennent s'ajouter aux pertes basales. Au total, c'est de plus de 1 g de fer dont la femme enceinte a besoin au quotidien, ce qui correspond à des besoins journaliers de 2,5 à 5,2 $\text{mg} \cdot \text{jour}^{-1}$ (pour un poids corporel moyen de 65 kg).

Les besoins de l'enfant au cours de la première année de la vie sont considérables. Compte tenu des besoins liés à la croissance, les besoins totaux en fer sont importants chez le très jeune enfant: à 1 an, ils sont de 8 à 10 fois supérieures à ceux d'un adulte de sexe masculin (lorsqu'ils sont exprimés par kg de poids corporel). L'accélération de la croissance, particulièrement au cours des années de maturation sexuelle, s'accompagne également d'une

augmentation des besoins en fer. Chez les adolescentes, s'ajoutent les besoins en fer liés à l'apparition des menstruations.

Toutefois, **un surdosage** en fer est également nocif pour la santé. En effet, rarement rencontré, il existe néanmoins dans les situations suivantes :

- Absorption excessive de fer à partir des aliments (hémochromatose héréditaire). Une quantité trop importante de fer peut se déposer sur différents organes et conduire alors à l'hémochromatose (chargement excessive de l'organisme en fer (Halliday, 1998)). Il s'agit d'une des maladies génétiques les plus fréquentes, qui concerne, dans certaines régions du Nord de l'Europe, 1 personne sur 350. Chez les personnes qui en sont atteintes, un risque élevé de cirrhose et de cancer du foie apparaît quand la quantité de fer excède 10 fois les valeurs normales.
- L'apport accru en fer par intoxication, transfusion, etc. augmenterait le risque d'hépatite et de cancer (Schumann, 2001).

Le surdosage peut se manifester par des troubles digestifs (irritation ou nécrose gastro-intestinale, vomissements, diarrhées), un dépôt de fer important surtout au niveau du foie et du pancréas pouvant entraîner une cirrhose du foie et un diabète insulino-dépendant, une pigmentation cutanée, des troubles hormonaux, des cardiopathies, des anomalies des ongles, des douleurs articulaires diffuses et une ostéoporose, ou encore un syndrome dépressif (choc) (Edwards *et al.*, 1988 ; Sempos & Looker, 1999).

C'est pourquoi l'enrichissement des aliments doit se faire en fonction des besoins de la population cible, tout en veillant à ce que le reste de la population ne soit pas « surdosé ». D'après l'Institut de Médecine de Canada (Trumbo *et al.*, 2001) le seuil de toxicité en fer est de 100 mg/jour. Dans la majorité des cas, les teneurs maximales autorisées dans des aliments écartent pratiquement tout risque de surdosages.

Les carences ou les surcharges sont longues à s'installer mais sont également lentes à se corriger. Dans de telles circonstances, il est donc clair que l'apport du fer doit strictement compenser les pertes : tout déséquilibre permanent entraînera à plus ou moins long terme une carence ou une surcharge durablement installée.

I.6 Les apports quotidiens conseillés en fer

Pour faire face à ses besoins en fer, l'organisme doit trouver dans son alimentation la quantité de fer nécessaire. Le fer est présent en quantité variable dans de nombreux aliments, mais seule une fraction du fer consommé est réellement absorbée. Donc, les apports "réels" en fer dépendent de la teneur en fer de l'alimentation, mais également de la biodisponibilité de ce fer. Les apports doivent tenir compte d'une absorption intestinale faible, de 5 à 30 % selon la forme alimentaire du fer (très grossièrement 5 % pour le fer non héminique et 30 % pour le fer héminique). Les besoins alimentaires quotidiens sont de l'ordre de 10 mg par jour. Une alimentation normale en apporte 15 à 20 mg.jour⁻¹, et les aliments qui en contiennent le plus sont les viandes, les abats dont le foie, les lentilles, les œufs, le vin, les fruits de mer. Les apports nutritionnels conseillés en fer sont présentés dans le tableau (Tableau 1) selon âge/sexe (Hercberg & Galan, 1989).

I.7 Méthodes pour prévenir l'anémie

Les stratégies applicables permettant d'accroître la prévention de la carence en fer sont nombreuses. Les solutions couramment proposées sont :

1) La diversification alimentaire qui impose :

- un choix des sources alimentaires de fer bien assimilables, variées, disponibles en permanence et accessibles aux plus pauvres – ce qui nous renvoie à un problème de politique agricole ;
- une augmentation de la biodisponibilité du fer contenu dans les régimes de base.

2) La **supplémentation en fer**, c'est-à-dire l'administration du fer sous forme médicamenteuse orale à titre thérapeutique ou à titre préventif sous forme de fer élémentaire.

3) La prise de mesures de santé publique qui comportent :

- une incitation à l'allaitement maternel (Hercberg & Galan, 1989) ;
- une obligation à l'enrichissement de certains aliments (Hurrell, 1997) ;
- une lutte contre les parasitoses (ankylostomase, trichocéphalose), connus pour sucer le sang, elles peuvent endommager aussi la paroi intestinale ou génito-urinaire qui va alors saigner chroniquement. Le paludisme, qui entraîne une destruction des globules rouges parasités, est à l'origine d'une anémie hémolytique plus que carencielle. Les programmes de

lutte contre les anémies doivent donc combattre autant les parasitoses et les diverses maladies à l'origine de saignements que l'insuffisance d'apport alimentaire (Hercberg, 1988).

Tableau 1 : Apports Nutritionnels Conseillés en fer selon les catégories de population (Hercberg, 1988)

Population	Quantité de fer (mg.jour ⁻¹)		
	Eviter l'anémie	Eviter la déficience	Assurer des réserves maximales
Enfants de 6 - 12 mois	5	7	10
Enfants de 1 - 3 ans	3	4	6
Enfants de 4 - 9 ans	4	7	10
Filles de 10 - 12 ans	8	10	12
Garçons de 10 – 12 ans	5	8	12
Adolescentes de 13 – 19 ans	9	13	19
Adolescents de 13 – 19 ans	8	12	18
Femmes adultes	10	16	24
Femmes allaitantes	6	9	13
Femmes enceintes	17 - 18	20	23 - 25
Femmes ménopausées	4	6	9
Hommes adultes	5	8	12

Toutes ces informations montrent qu'il est très difficile de remplir le besoin journalier en fer avec un régime alimentaire normal en raison des nombreux facteurs susceptibles de moduler sa biodisponibilité (Benito & Miller, 1998 ; Hurrell, 1998 ; Lynch, 2002). Le développement d'aliments enrichis en fer constitue une alternative intéressante pour pallier ce problème de santé publique.

4) L'enrichissement des aliments en fer est souvent considéré comme le moyen de lutte contre l'anémie le plus efficace, avec des effets à plus long terme pour réduire la prévalence de la carence en fer (Hurrell, 1997).

I.8 Enrichissement des aliments en fer

I.8.1 Aspect général

L'enrichissement des aliments est défini comme l'addition à un aliment d'un ou plusieurs nutriments essentiels, normalement ou non contenu dans l'aliment, avec l'objectif de prévenir ou corriger une carence affirmée en un ou plusieurs nutriments dans la population ou dans des groupes de population spécifiques (FAO/ILSI, 1997). Il concerne l'enrichissement des aliments de base destinés à l'ensemble de la population ou d'aliments préférentiellement consommés par les groupes à risque (Hurrell, 1997). L'enrichissement des aliments est pratiqué déjà depuis longtemps dans les pays industrialisés où la suppression supposée des carences en micronutriments a été largement attribuée à l'enrichissement des aliments en micronutriments (Ramakrishnan & Yip, 2002) (par exemple l'iode). La conférence internationale sur la Nutrition en 1992 a souligné l'importance et la pertinence de l'enrichissement des aliments en micronutriments pour lutter contre les carences en micronutriments dans les pays en voie de développement. En considérant le rapport coût/efficacité, cette approche, quand elle est possible, est considérée comme étant la meilleure, le but étant d'améliorer le statut en micronutriments pour l'ensemble des populations. Elle est « socialement acceptable » car, le plus souvent, il s'agit d'une approche qui ne modifie pas les habitudes alimentaires, ni la nature des aliments consommés.

Deux approches sont utilisées actuellement pour l'enrichissement d'aliments. La première consiste en un enrichissement obligatoire d'un ou de plusieurs aliments et la seconde en une supplémentation optionnelle : dans ce second cas, les industriels se portent volontaires pour enrichir leurs produits alimentaires.

Pour les pays en voie de développement, la plus sûre des stratégies reste la supplémentation obligatoire : cela permet d'une part de contrôler aisément l'enrichissement des rations alimentaires, et d'autre part, de faire face au manque de sensibilisation des industriels. C'est le cas de l'iode dans le sel à usage culinaire en France.

Dans les pays développés, où les populations sont plus sensibilisées aux problèmes nutritionnels, l'enrichissement volontaire est préféré (OMS-WHO, 2009). A titre d'exemple, en République de Moldavie, la déficience en fer concerne toutes les couches de la population et il y a, en outre, un manque de sensibilisation à la fois, de la part de la population et des

industriels. Dans de telles circonstances, un programme d'enrichissement obligatoire s'impose.

I.8.2 Fortifiants et niveaux d'enrichissement

Un « bon » fortifiant doit être organoleptiquement stable et ne pas produire de modifications notables de l'aliment « véhicule », ni des aliments auxquels il est associé. Il doit être facilement disponible en complément alimentaire et posséder un coût abordable. Certains fortifiants ne présentent pas de problèmes majeurs pour ce qui est de leur utilisation : il s'agit par exemple de l'iode (le plus souvent, l'enrichissement se fait sous forme d'iodate de potassium (Lofti *et al.*, 1996)), ou encore de la vitamine A (essentiellement sous forme de palmitate de rétinol (Wirakartakusumah & Hariyadi, 1998)). Par contre, de réelles difficultés apparaissent lors d'une supplémentation des aliments en fer. Premièrement, le fer est un composé très oxydable dont la solubilité varie en fonction de sa forme d'oxydation. À pH 7, la solubilité maximale de l'ion ferreux est de 0,1 M, tandis que celle de l'ion ferrique est 10^{-16} M. De plus, en présence d'oxygène, l'ion ferreux réagit pour former l'ion ferrique, moins biodisponible (Prasad, 1978 ; Wapnir, 1990). Le fer, en s'oxydant, devient alors un agent pro-oxydant et « détériore » l'aliment dans lequel il est introduit. Par conséquent, la difficulté rencontrée lors de l'enrichissement des aliments en fer sera de sélectionner un composé du fer :

- qui possédera une grande biodisponibilité,
- qui ne sera pas modifié lors de l'élaboration de l'aliment,
- qui n'altérera pas les qualités organoleptiques de l'aliment fini (Lynch, 2002).

Pour permettre un « enrichissement optimal », il est donc nécessaire de protéger le fer contre une oxydation éventuelle, une précipitation et de toutes réactions susceptibles à la fois de diminuer sa biodisponibilité et de modifier les qualités organoleptiques de l'aliment enrichi.

Les composés en fer les plus utilisés sont présentés dans le Tableau 2 en fonction de leur biodisponibilité relative par rapport à celle du sulfate de fer utilisée comme référence (Hurrell, 1997). Nous pouvons distinguer :

✓ Les composés du fer solubles dans l'eau – le meilleur représentant est le sulfate ferreux, qui est utilisé pour l'enrichissement des aliments destinés aux nourrissons, les pâtes et le pain. Il peut être ajouté à la farine de blé stockée pour des courtes périodes (le stockage prolongé provoque l'oxydation des lipides et la disparition d'arômes spécifiques). Le sulfate

ferreux et les autres composés du fer solubles dans l'eau sont responsables de changements de couleur dans les produits à base de cacao, dans les produits céréaliers telles que les céréales destinées aux enfants et les tortillas. De même, ils peuvent provoquer des précipitations de fer dans les sauces à base de soja, de poisson et les infusions de thé (Hercberg & Galan, 1989). Des effets secondaires sont attribués au fer ionique libre à cause de l'acidité qu'ils provoquent dans le tractus gastro-intestinal (Chaud *et al.*, 2002). De plus, le sulfate ferreux conduit à la formation des radicaux libres HO[•], qui peuvent initier la peroxydation des lipides de membranes biologiques, l'inactivation des enzymes, ainsi que la modification de l'ADN (Cremonesi & Caramazza, 1993 ; Martins *et al.*, 1995), ce qui explique partiellement la toxicité des préparations pharmaceutiques orales qui contiennent des ions Fe²⁺ non complexés (Slivka *et al.*, 1986 ; Singh & Barrand, 1990).

✓ Les composés peu solubles dans l'eau et solubles en milieu acide – ces composés entraînent des changements organoleptiques moins importants que ceux provoqués par les composés solubles dans l'eau, mais leur absorption par l'organisme dépend de leur dissolution dans le jus gastrique (acide) au cours de la digestion. Le fumarate et le succinate de fer sont les composés les plus utilisés de ce groupe. Pour les adultes, le ratio d'absorption de ceux-ci est le même que pour le sulfate ferreux.

✓ Les composés insolubles dans l'eau et peu solubles en milieu acide – tels que le phosphate de fer et les poudres de fer alimentaire, qui sont les composés les moins utilisables pour l'enrichissement alimentaire, du fait de leur faible absorption. Leur principale caractéristique repose sur une dissolution assez lente et incomplète dans le jus gastrique lors de la digestion. L'absorption de ces composés dépend de la composition et des caractéristiques physiques des particules (dimension, forme et surface) de l'aliment à enrichir. Le pyrophosphate ferrique est utilisé particulièrement par les compagnies européennes pour enrichir les céréales destinées aux enfants et les poudres pour boissons chocolatées. Cependant, la biodisponibilité du phosphate de fer est modifiée pendant le processus technologique (elle est considérablement augmentée en traitant par la chaleur l'aliment enrichi ; par exemple en stérilisant un aliment pour nourrissons à base de lait ou en cuisant le pain).

✓ Le fer protégé est une dernière forme de fer utilisé dans l'industrie agroalimentaire. A l'heure actuelle, l'industrie alimentaire contrôle la réactivité des métaux à partir de la chélation des métaux de transition (Diaz *et al.*, 2003). L'utilisation de composés où le fer est protégé des inhibiteurs apparaît alors comme une alternative.

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux composés du fer utilisés pour l'enrichissement alimentaire (Hurrell, 1997)

Composés du fer	Biodisponibilité relative*	Quantité relative de fer ajouté (%)	Aliments enrichis
Solubles dans l'eau à 20 °C			
Sulfate ferreux	100	33	
Gluconate ferreux	89	12	
Lactate ferreux	106	19	Aliments pour nourrissons, pain, pâtes
Citrate d'ammonium ferrique	-	18	
Chlorure ferrique	50		
Peu solubles dans l'eau/solubles en milieu acide à 20 °C			
Fumarate ferreux	100	33	
Succinate ferreux	92	35	Céréales pour enfants, poudres chocolatées
Saccharate ferreux	74	10	
Glycérophosphate ferrique	-	15	
Citrate ferreux	74	24	
Tartrate ferreux	62	22	
Insolubles dans l'eau/peu solubles en le milieu acide à 20 °C			
Ortho phosphate ferrique	25 - 32	28	
Pyrophosphate ferrique	21 - 74	25	Céréales pour enfants, riz, poudre chocolatée, farine de blé, céréales
Fer élémentaire** :	75	97	
Electrolytique	5 - 20	99	
Carbonyle	13 - 148	97	
H-réduit	-	97	
Fer protégé			
NaFe-EDTA	28 - 416	13	
Hémoglobine	100 - 700	0,34	Sucre, maïs, poudres chocolatées, céréales pour enfants, yaourt, margarine, boissons
Bisglycinate de fer	100 - 400	18	
Lactoferrine	100 - 800	13	

* Biodisponibilité relative chez l'homme par rapport au sulfate ferreux 7H₂O, pour la même quantité totale en fer.

** Fer élémentaire est obtenu par réduction sous H₂ ou CO ou par électrolyse (Lee & Clydesdale, 1980).

Trois composés chélatants du fer ont des potentialités d'application nutritionnelle intéressantes: il s'agit de l'hémoglobine ou la lactoferrine, l'éthylène diamine tétracétate de fer et de sodium (NaFe-EDTA) et du bisglycinate de fer.

L'hémoglobine est utilisée sous forme de cellules sèches provenant de sang de bovins. L'avantage principal de l'hémoglobine est son absorption importante et prévisible ; celle-ci n'est pas influencée par les composants du régime hormis le calcium. Le ratio d'absorption du fer à partir des céréales fortifiées avec de l'hémoglobine sera de 15-35 % en fonction du facteur feedback, c'est-à-dire des besoins métaboliques chez l'adulte.

Un organisme d'enfant absorbera 14 % du fer apporté (Herberg & Galan, 1989). Les principaux inconvénients sont sa couleur rouge-brun intense, son goût de sang, sa faible teneur en fer (de l'ordre de 0,34 %), et des problèmes de contamination potentiels impliqués dans sa production ainsi que les perceptions culturelles de ce supplément. On ne peut exclure les risques sanitaires (virus ou prions).

I.8.3 Description des chélates de fer

L'acide éthylène diamine-tétraacétique (EDTA) est un composé hexadenté avec quatre groupes chargés négativement appartenant à l'acide carboxylique et deux groupes amines (Figure 2). Il peut complexer virtuellement tous les ions métalliques du tableau de la classification périodique des éléments selon Mendeleïev.

L'éthylène diamine-tétraacétate de sodium et du fer (NaFe-EDTA) est un des nombreux composés chélatés de l'EDTA. Le « Group Consultative International d'Anémie Nutritionnelle » (INACG) recommande le NaFe-EDTA pour l'enrichissement des aliments

dans les pays en voie de développement. NaFe-EDTA est organoleptiquement inerte. Il est chimiquement stable et particulièrement intéressant pour les aliments nécessitant un stockage prolongé et des températures de préparation élevées, ou encore, qui contiennent des inhibiteurs du fer non-héminique. Il a l'avantage non seulement de conférer une meilleure absorption au fer qu'il contient, mais aussi de favoriser l'absorption de l'ensemble du fer non héminique du régime et celle du zinc .

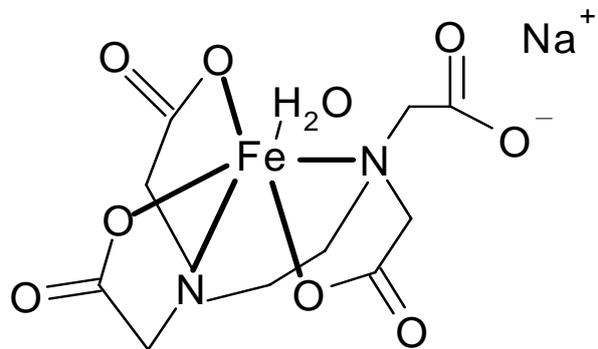


Figure 2 : Structure du NaFe-EDTA

Dans le cas de régime contenant des inhibiteurs de l'absorption de fer, l'absorption du fer du NaFe-EDTA, de l'ordre de 7-10 %, est 2 à 3 fois supérieure à celle du sulfate de fer.

Ajouté à de la sauce de poisson (Thuy *et al.*, 2003) ou au sucre (Viteri *et al.*, 1995), le NaFe-EDTA améliore indiscutablement le statut nutritionnel des populations. Cependant, des réactions se développent parfois dans l'aliment comme par exemple lorsque le sucre enrichi est ajouté à des produits à base de maïs ou dans le thé et le café. Outre les modifications organoleptiques que le NaFe-EDTA peut entraîner dans certains produits enrichis, ce dernier peut présenter un risque toxicologique non négligeable du fait qu'il peut chélater divers métaux bivalents tels que le Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} (Hurrell *et al.*, 2004 ; Zhu & Miller, 2007). Le risque d'accumulation à long terme avec l'EDTA est à prendre en considération. Ces métaux, non assimilables par l'organisme, s'accumulent au niveau des reins et sont éliminés par voie urinaire (Hurrell *et al.*, 2000). Au Guatemala, au milieu des années 1970, un essai de fortification du sucre avec NaFe-EDTA a été effectué. À l'époque, ce composé semblait prometteur, montrant une absorption apparente de 3 % à 8 % de fer. Le sucre était fortifié par ajout direct de 1 g du chélate par kg de sucre. La teneur en fer du NaFe-EDTA étant de 13 %, cela a entraîné l'ajout de 0,13 mg de fer par g de sucre. Compte tenu de l'absorption maximale de 8 %, la quantité de fer absorbable était de 0,01 mg par g de sucre. Avec une consommation moyenne d'une personne de 36 g de sucre par jour, une contribution d'environ 0,37 mg de fer absorbable par jour à partir du sucre a été possible. Cependant, après quatre années de consommation de ce sucre fortifié dans trois communautés sélectionnées, le changement dans l'alimentation de fer a été marginale (Viteri *et al.*, 1995). En outre, il y a eu une augmentation significative de l'excrétion urinaire de zinc, de cuivre et de fer (Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats d'analyse d'excrétions urinaires collectées à partir de différentes communautés avant et après consommation d'aliments enrichis en NaFe-EDTA (Viteri *et al.*, 1995)

Les excrétions des métaux (mg/g créatinine)			
Communauté	Fe	Zn	Cu
Contrôle	36 ^a	6 ^a	3 ^a
Communauté 1	112 ^b	131 ^b	51 ^b
Communauté 2	126 ^b	110 ^b	104 ^c
Communauté 3	134 ^b	247 ^c	41 ^b

Le bisglycinate de fer (Fe-BIS) est composé d'une molécule de fer liée à deux molécules de glycine (Figure 3) (Pineda & Ashmead, 2001). Son absorption est élevée. La stabilité de ce composé est obtenue grâce à sa structure de chélate, avec un ligand bidenté qui le protège des interactions indésirables. Le Fe-BIS posséderait des propriétés intrinsèques intéressantes comme une solubilité non influencée par le changement du pH, entre pH 3 et pH 10 (García-Casal & Layrisse, 2001), de faibles propriétés pro oxydantes (Olivares *et al.*, 1997), et une importante stabilité même quand il est exposé à l'air à la température ambiante (Olivares *et al.*, 1997).

De plus il est considéré fonctionnel à titre nutritionnel grâce aux qualités suivantes (Ashmead, 2001) :

- Faible masse moléculaire ;
- Une constante de stabilité idéale pour être considéré nutritionnel fonctionnel de $10^{7,5}$ M ;
- Ligand métastable par l'organisme humain.

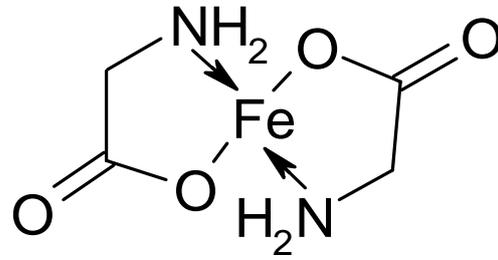


Figure 3 : Structure de bisglycinate de fer

Le chélate est stérique et sa structure chimique est énergétiquement possible (confirmé par la diffraction spectrométrique de rayons-X), réalisable aisément par synthèse chimique.

Introduit dans les aliments, ce composé limite les réactions avec les inhibiteurs d'absorption du fer, (Bovell-Benjamin *et al.*, 2000), neutralise la valence d'ion ferreux (Fe^{2+}) (Hendricks & Ashmead, 1995) et protège la surface gastro-intestinale contre l'irritation du fer (Jeppsen & Borzelleca, 1999 ; Allen, 2002).

Il semble qu'il ne réagisse pas avec les lipides pouvant être présents dans la matrice alimentaire enrichie, ce qui éviterait le rancissement des aliments enrichis (Cook *et al.*, 1990). Cependant, le lait (ou par exemple les caséines) (Olivares *et al.*, 1997) et les phytates diminueraient son absorption (Fox *et al.*, 1998). L'absorption serait par contre améliorée par l'acide ascorbique (Olivares *et al.*, 1997) et l'acide citrique. Si le lait entraîne une diminution de l'absorption du Fe-BIS, c'est probablement en raison des protéines notamment phosphorylées (telles que les caséines). On sait effectivement que les protéines de lait sont

Le fer susceptible de fixer les métaux (Gaucheron, 2004a). Il est évident que le Fe-BIS apparaît comme le chélate le plus prometteur pour l'enrichissement des aliments en fer mais son efficacité et son innocuité doivent, avant tout, être évaluées dans diverses conditions (par exemple : le pH, la température, force ionique, etc.) et dans divers produits alimentaires (Allen, 1997).

Beaucoup d'auteurs considèrent que le Fe-BIS est absorbé par les mécanismes caractéristiques de l'absorption d'acides aminés. Par conséquent, l'absorption du fer n'est pas influencée par les inhibiteurs du fer et elle est supérieure à celle du fer non héminique. Dans un menu alimentaire représentatif, riche en tanins, phytates, etc. (inhibiteurs du fer), l'absorption du fer à partir de Fe-BIS («Ferrochel»[®], Albion Laboratories, Utah) était de 4 à 5 fois supérieure à celle du fer issu du sulfate ferreux (Bovell-Benjamin *et al.*, 2000 ; Thuy *et al.*, 2003).

Actuellement, le Fe-BIS, sous forme de Ferrochel[®], est utilisé en qualité de fortifiant alimentaire dans plusieurs matrices alimentaires comme le lait et autres produits laitiers, plats de maïs, fromage, bonbons, boissons, etc (Layrisse *et al.*, 2000).

I.9 Conclusions

Il n'existe vraisemblablement pas de composé idéal susceptible de respecter toutes les caractéristiques attendues pour un « fortifiant ». On peut cependant rechercher des composés qui s'approchent de l'idéalité et qui possèdent un grand nombre de propriétés espérées (solubilité à tous les pH, stabilité chimique, forte biodisponibilité, ne possédant pas de goût, ne modifiant pas la couleur, faible potentialité toxicologique...).

En tenant compte des avantages et des inconvénients présentés par 2 composés : le Fe-BIS et le NaFe-EDTA, le premier peut être considéré comme l'un des meilleurs fortifiants en raison de l'efficacité de l'absorption (forte biodisponibilité) du fer, l'absence de risque de toxicité et quelques autres caractéristiques chimiques ayant un impact favorable d'un point de vue organoleptique.

Le choix d'un fortifiant adéquat ne présente qu'un seul des aspects parmi les stratégies de l'enrichissement en fer (Cook *et al.*, 1990 ; Hurrell *et al.*, 2004). Les autres aspects à contrôler dans une fortification sont la quantité optimale du fortifiant (suffisante pour lutter contre la carence, et sans intoxiquer ceux qui ne sont pas carencés) et le choix des systèmes

Le fer alimentaires capables de transporter et de protéger le fer d'une manière efficace. Bien sûr, il faut ensuite suivre les conséquences de ces interactions entre fortifiant et support (aliment-vecteur) en termes de réactions chimiques et de produits de transformation possibles pendant les processus technologiques (notamment la stabilité oxydative), durant le stockage ou lors de la consommation des aliments fortifiés. La bibliographie concernant les réactions chimiques dans les aliments fortifiés est relativement imprécise, voire inexistante.

II. Peroxydation des lipides (oxydation lipidique)

La détérioration de la qualité des aliments par voie peroxydative est le problème majeur des procédés de transformation ou de conservation des aliments (huiles et graisses, seules ou constitutives des aliments). Cette altération des composants liposolubles tels que les vitamines ou des pigments conduit également à des détériorations de constituants non lipidiques comme les protéines. La peroxydation lipidique aboutit à la dégradation des propriétés biochimiques, organoleptiques et nutritionnelles des aliments (Mielnik *et al.*, 2003). Enfin, l'ingestion des produits de peroxydation des lipides pourrait à long terme, participer au développement de pathologies dégénératives telles que des désordres intestinaux chroniques, l'artériosclérose, ou encore divers cancers (Poisson & Narce, 2003 ; Cheng & Li, 2007). La majorité des pathologies est liée à la formation progressive d'espèces radicalaires (Halliwell, 1991).

Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. Il s'agit d'une part de facteurs intrinsèques tels que la composition en résidus d'acides gras des lipides (nombre et position d'insaturations), la présence de pro-oxydants (ions métalliques, hèmes, enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc). D'autre part, les principaux facteurs extrinsèques sont la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, etc (Hsieh & Kinsella, 1989).

II.1 Mécanismes généraux de peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- l'auto-oxydation provient de la température (scissions radicalaires à température élevée), de la présence d'ions métalliques (oxydation), ou de radicaux libres déjà présents ;
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs ;
- l'oxydation enzymatique, catalysée par la lipoxygénase.

II.1.1 Auto-oxydation

La peroxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. D'après Moureau et Dufraise (1926) l'auto-oxydation correspond à une fixation d'oxygène sur des molécules insaturées. Il

s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes : l'amorçage, la propagation et la terminaison.

L'amorçage

Une première réaction, appelée amorçage ou initiation, produit un radical libre par élimination d'un hydrogène d'une double liaison d'un acide ou d'un résidu d'acide gras insaturé (Réaction 1). Mais il faut qu'au préalable un atome d'hydrogène soit enlevé sur la chaîne des doubles liaisons. L'oxygène (ou plutôt les espèces réactives d'oxygène) n'est pas le seul responsable de cette réaction initiant la peroxydation. Néanmoins, cette déshydrogénation a soulevé le problème de l'important niveau d'énergie nécessaire pour arracher un atome d'hydrogène. L'auto-oxydation d'un fût d'huile insaturée a été expliquée par la présence de chaînes à électron célibataire dans le mélange de lots ayant été exposés au soleil, ou encore chauffés à une température de plus de 50 °C. Des traces de métaux de transition peuvent aussi être impliquées. Dans le milieu hydrophobe qu'est l'huile, l'état radicalaire peut se conserver plus longtemps que dans une émulsion huile-dans-eau.

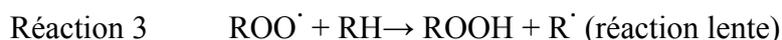
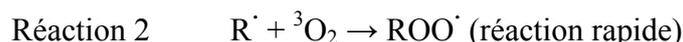


Cette étape est immédiatement suivie de réarrangements électroniques aboutissant, dans le cas des résidus d'acides gras polyinsaturés (avec des doubles liaisons initialement en position non conjuguées), à la formation de liaisons diéniques conjuguées. Les premiers radicaux sont ainsi formés. En effet, différents mécanismes réactionnels permettent d'amorcer l'auto-oxydation. Certains impliquent directement le substrat lipidique (RH) à partir duquel sont générés les premiers radicaux alkyles (R[·]). D'autres mettent en jeu les peroxydes (ROOH) préexistants dans le milieu réactionnel. Elles aboutissent à la formation de radicaux alkoxyde (RO[·]) ou peroxyde (ROO[·]) qui réagissent par la suite spécialement avec des substrats lipidiques.

Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de la température, peut aussi être produit par des réactions ionisantes, des générateurs chimiques (exemple de persulfate d'ammonium), des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, ou des traces de métaux.

Propagation

Les radicaux libres alkyles ($R\cdot$), formés lors de l'initiation, fixent très rapidement l'oxygène moléculaire à l'état normal et forment des radicaux libres peroxylés ($ROO\cdot$) instables (Réaction 2) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras insaturé pour former des peroxydes (Réaction 3).



Les peroxydes peuvent également se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyle ($RO\cdot$) et hydroxyle ($HO\cdot$).

Le radical alcoyle réagit avec d'autres substrats et il y a propagation de la réaction en chaîne. Il peut également subir une scission carbone-carbone de part et d'autre du radical pour former un radical alkyle et un radical vinyle. Le radical alkyle peut réagir avec un hydrogène, un radical hydroxyle ou une molécule d'oxygène générant ainsi des hydrocarbures, des alcools et d'autres peroxydes. Le radical vinyle peut réagir avec un radical hydroxyle, un radical hydrogène ou oxygène moléculaire pour générer des aldéhydes et des hydrocarbures. Alcools et aldéhydes forment les espèces responsables des odeurs de rance. Les aldéhydes permettent aussi une évaluation du degré de peroxydation.

Terminaison

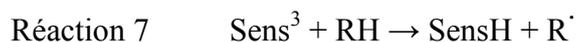
Au cours des réactions de terminaison, les radicaux formés réagissent entre eux pour former un produit qui n'est pas un radical libre (Réaction 4, Réaction 5 et Réaction 6).



II.1.2 Photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie importante de production de peroxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines, la riboflavine (Hultin, 1992) ou d'autres pigments. Les photosensibilisateurs (Sens) absorbent l'énergie lumineuse et passent à l'état triplet excité (Sens^3) (Hultin, 1994). Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel, 1998b).

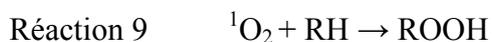
Les photosensibilisateurs de type I, telle que la riboflavine, agissent comme les radicaux libres initiateurs, dans leur état triplet, en arrachant un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène (Réaction 7).



Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité (Sens^3) avec l'oxygène triplet (état de base) auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$: état énergétiquement élevé) (Réaction 8).



L'oxygène singulet ainsi formé est très électrophile ($^1\text{O}_2 = [\cdot\text{O}-\text{O}\cdot]$). C'est un diradical. Il peut réagir directement avec un acide gras insaturé (RH) et former ainsi un hydroperoxyde ROOH (Réaction 9).



Par la suite interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto-oxydation. Les peroxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par photo-oxydation (Frankel, 1998b).

II.1.3 La peroxydation par catalyse enzymatique

Le phénomène de la peroxydation des résidus d'acides gras insaturés peut être d'origine enzymatique. Les deux enzymes principalement impliquées sont la lipoxigénase et la cyclooxygénase. Ces sont des enzymes présentes dans les tissus végétaux, dans les érythrocytes et les leucocytes. Ces cellules contiennent des résidus d'acide gras polyinsaturés

possédant un système malonique (cis, cis-1,4-pentadiène). La présence de ces acides gras et ces enzymes contribue à la flaveur de certains végétaux. Les substrats préférentiels des enzymes sont les acides gras et résidus d'acide gras non estérifiés de la série n-6 : acide linoléique pour les lipoxygénases végétales et acide arachidonique pour les lipoxygénases animales, ou ceux de la série n-3 : acide linoléique pour les végétaux. L'acide oléique n'est pas un substrat des lipoxygénases.

Les lipoxygénases contiennent un atome de fer dans leur site actif. Elles sont activées par les peroxydes, le fer constitutif du site actif de l'enzyme passant de l'état Fe^{2+} à l'état Fe^{3+} . L'acide gras se fixe alors sur l'enzyme au niveau de sa structure pentadiényle et réagit avec l'oxygène moléculaire (3O_2). Le radical peroxyde formé est immédiatement réduit par l'enzyme pour donner un hydroperoxyde après réaction avec un proton. La réaction est régiosélective, avec une spécificité dépendant de l'origine de l'enzyme. Par rapport à l'auto-oxydation, la réaction catalysée par une enzyme est également caractérisée par l'existence d'un pH optimum, de sa sensibilité aux traitements thermiques (même à basses températures), d'une vitesse de réaction élevée entre 0 et 20 °C, et de l'existence d'inhibiteurs spécifiques (par exemple l'aspirine comme inhibiteur des cyclooxygénases).

L'activité des lipoxygénases explique en grande partie la présence de peroxydes préexistants dans les matières premières utilisées pour préparer les aliments.

II.2 Catalyseurs de la peroxydation des lipides

La phase d'initiation de l'oxydation des lipides peut être déclenchée par plusieurs facteurs : les formes réactives de l'oxygène (1O_2), les enzymes, les métaux ou la chaleur (Hsieh & Kinsella, 1989 ; Hultin, 1994 ; Frankel, 1998b).

II.2.1 Amorçage par les formes réactives de l'oxygène

La fixation de l'oxygène sur une chaîne aliphatique insaturée est la réaction de base de l'oxydation des lipides. Ainsi, l'oxygène est le principal agent oxydant, quel que soit le mécanisme d'initiation de l'oxydation.

L'oxygène existe sous plusieurs états électroniques possédant des réactivités très différentes (Figure 4). Dans la molécule de dioxygène, les deux électrons de la dernière orbitale $\pi^*_{2p_{xy}}$ sont non appariés et sont de spins parallèles (S, moment du spin total = 1). La molécule est

donc à l'état triplet, noté $^3\text{O}_2$ (multiplicité du spin ($= 2S + 1 = 3$)). Dans cet état fondamental, noté « $^3\Sigma_g^-$ », le moment angulaire net des électrons non appariés possède 3 composantes. La molécule possède deux orbitales anti-liantes π disponibles. Le dioxygène à l'état fondamental réagit donc facilement avec les espèces radicalaires, c'est-à-dire avec les espèces ayant un électron non apparié.

Théoriquement la réaction directe du dioxygène avec les acides gras ou des résidus d'acide gras est donc difficilement possible, à cause de contraintes cinétiques. L'énergie d'activation de la réaction directe avec les molécules possédant des électrons appariés est très élevée : 146 à 273 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Chan, 1987). L'oxygène doit donc être transformé en une forme plus réactive, il s'agit de formes réactivées d'oxygènes, pour réagir (Zhengxing & Wilna, 2002).

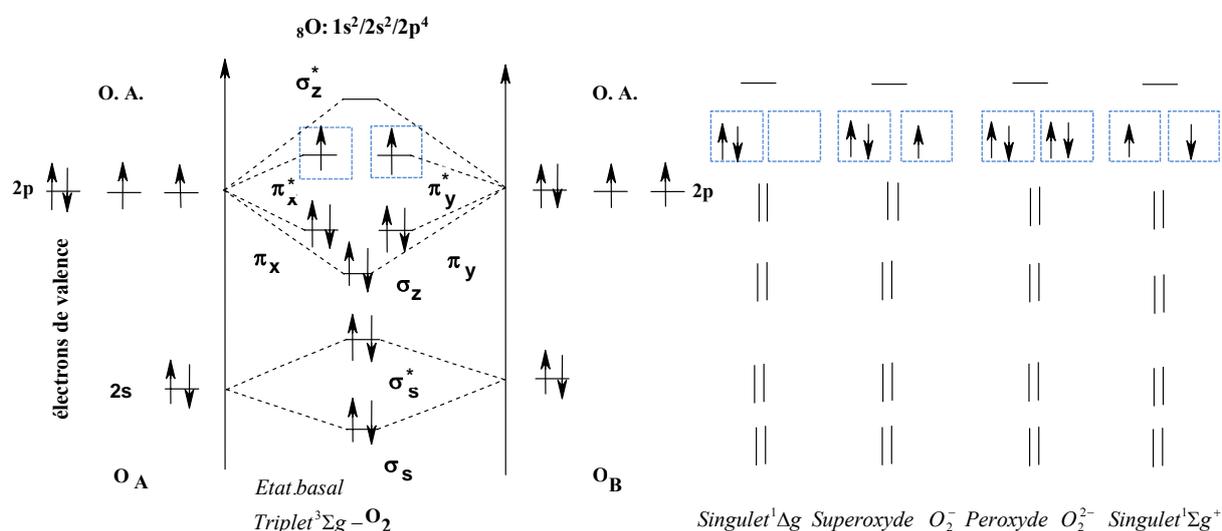


Figure 4 : Diagramme des orbitales moléculaires dans la molécule d'oxygène et ses formes réactivées

Parmi les autres configurations électroniques de l'oxygène, les états « $^1\Delta_g$ » et « $^1\Sigma_g^+$ » correspondent à des états singulet ($^1\text{O}_2$). Le premier comporte une paire d'électrons appariés de spins antiparallèles ($S = 0$) sur une même orbitale anti-liante. Il est très électrophile et réagit directement avec les doubles liaisons, formant des intermédiaires instables immédiatement convertis en peroxydes stables. Le second a une durée de vie très courte. Il est très rapidement converti en $^1\Delta_g$ et n'est pas impliqué dans l'oxydation des lipides (durée de vie $^1\Delta_g > ^1\Sigma_g$). D'après les résultats expérimentaux, le mécanisme consiste en une addition concertée d'oxygène singulet sur l'alcène, accompagnée d'une migration de la double liaison (Figure 5). $^1\text{O}_2$ correspond en fait à un biradical singulet (diénophile réactif ; à rapprocher de

la nucléophilie) : $\langle O = O \rangle$ alors que 3O_2 correspond à un biradical triplet possédant 2 paires d'électrons parallèles sur deux orbitales différentes non liants : $\cdot \overset{\cdot}{O} - \overset{\cdot}{O} \cdot$.

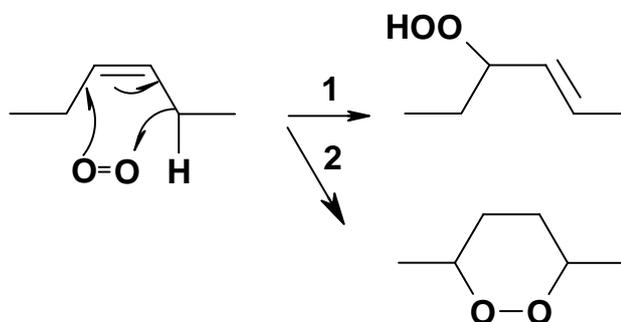


Figure 5 : Mécanisme d'addition de l'oxygène singulet sur une double liaison (réaction-1) et cycloaddition (réaction 2)

D'autres formes réactivées de l'oxygène, impliquées dans l'initiation de l'oxydation, en particulier au cours de réactions biologiques, peuvent être obtenues par réduction.

Parmi elles, le radical hydroxyle (HO^\cdot), issu de 4 réductions successives, est la forme la plus réactive de l'oxygène. Il peut être produit *in vitro*, ou *in vivo* à partir de H_2O_2 par radiolyse ou photolyse de l'eau, catalysée par les métaux (réaction de Fenton) ou photochimiquement. L'autre espèce est le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-} = [^\cdot O-O]$), produit essentiellement par voie enzymatique.

Par exemple, dans le lait, la xanthine oxydase génère des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), qui en milieu acide réagissent pour donner des radicaux hydroperoxyde (HOO^\cdot) puis de peroxyde de hydrogène.

II.2.2 Amorçage catalysé par les métaux

La décomposition des lipides peut être significativement accélérée par la présence de métaux tels que le fer, le cuivre, le manganèse ou le cobalt. Le fer et le cuivre sont les plus réactifs. Ils jouent un rôle important dans la génération des radicaux libres de l'oxygène : ils sont les premiers activateurs des molécules d'oxygène. Ils sont actifs, même aux faibles concentrations ($10^{-2} - 1 \text{ mg.kg}^{-1}$), ce qui est fréquent dans la matière grasse ou dans la phase lipidique des aliments (Pokorny, 1987 ; Whang & Peng, 1988).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés au fer. Notre modèle d'étude est une émulsion huile-dans-eau, enrichie en fer (sel/chélate). Nous allons donc détailler la phase d'initiation de la peroxydation des lipides créée par les ions de fer, quand ils sont libres (non complexés).

Rôle du fer dans l'amorçage de la peroxydation des lipides

La toxicité du fer est souvent attribuée à son action dans la production de radicaux et peroxydes. Actuellement, il n'y a aucun doute que le fer est un catalyseur dans les processus de la peroxydation des lipides, mais le mécanisme par lequel la peroxydation des lipides s'opère n'est pas complètement élucidé. Les deux mécanismes les plus connus de peroxydation des lipides en présence de fer sont : (i) la réaction de Fenton et (ii) la réaction d'Haber-Weiss. Dans la première réaction, le fer, dans son état de valence moins élevé, décompose une molécule de peroxyde en radical libre, avec oxydation simultanée de l'ion métallique ce qui conduit le fer à un état de valence le plus élevé (Réaction 10 et Réaction 11).



Dans la seconde réaction (ii), le métal dans son état de valence plus élevé dégrade un nouveau peroxyde et se réduit pour repasser à son état de valence moins élevé mais qui est plus réactive (Réaction 14 proposés par Pokorny (1987)).

Cette réaction en chaîne peut se répéter plusieurs fois et provoque ainsi une forte dégradation de la fraction lipidique que ce soit *in vivo* ou *in vitro* où sont toujours présents des ions métalliques à l'état de trace (Réaction 12 et Réaction 13).



Les peroxydes formés (ROOH) peuvent se scinder en présence d'ions ferreux, en formant des espèces radicalaires plus réactives, comme ROO·, alkoxyl (RO·), ou le radical epoxyperoxyl (OROO·) comme le montre la Figure 6 (Zhengxing & Wilna, 2002).

Ces espèces (ROO^\cdot , RO^\cdot , OROO^\cdot) peuvent arracher les atomes d'hydrogène des lipides et donc propager la peroxydation des lipides. Ces réactions en chaîne se terminent par la dimérisation ou par l'attaque de protéines ou d'ADN. On parle alors de détérioration oxydative. Cette détérioration oxydative conduit à la réticulation de l'ADN.

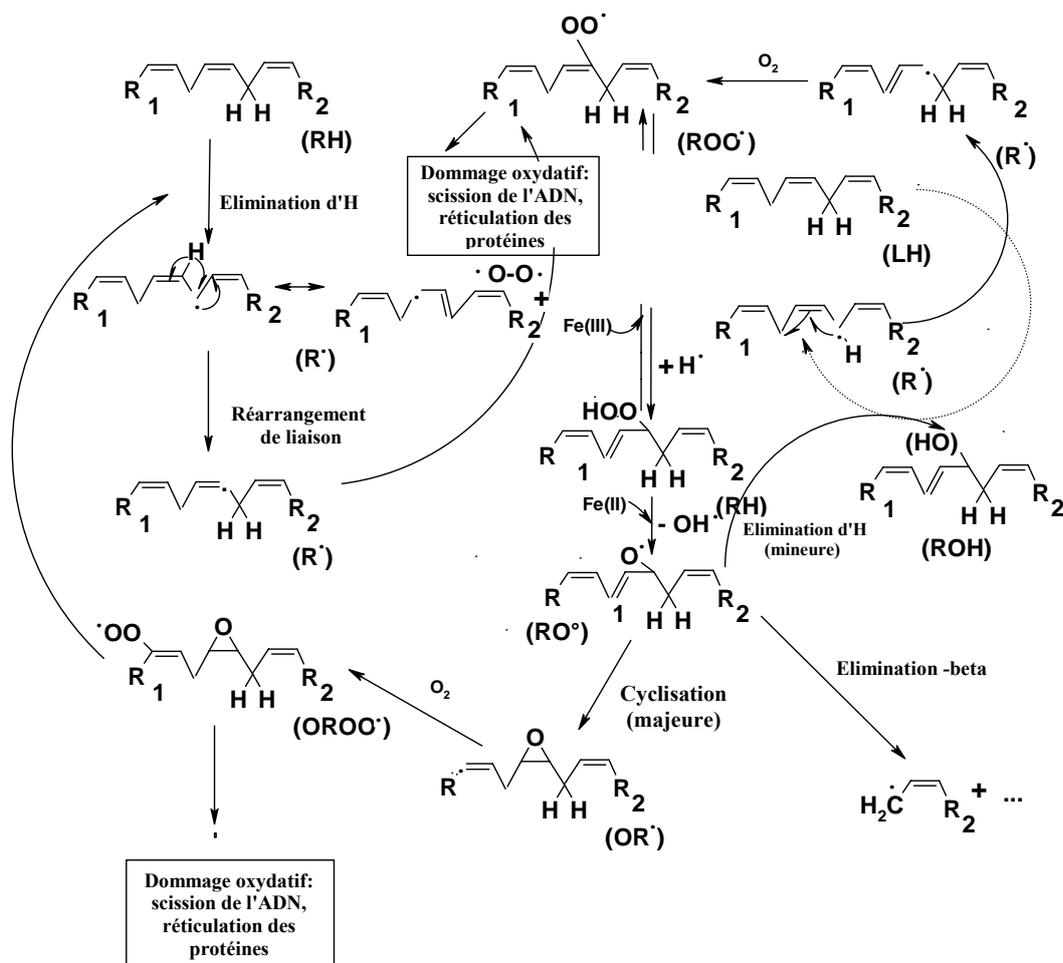
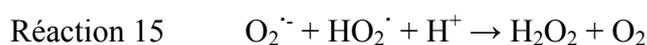
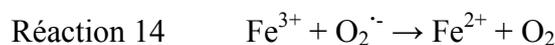


Figure 6 : Peroxydation des lipides en présence du fer, et formation de différentes espèces radicalaires (Zhengxing & Wilna, 2002)

La deuxième réaction, dite de Haber-Weiss peut aussi s'opérer différemment de celle $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^\cdot + \text{HO}^-$ (Shi *et al.*, 1998). Les Réaction 14 et 15 correspondent à l'initiation de la peroxydation lipidique *in vivo* et *in vitro* via l'ion de fer trivalent en présence de radical anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$).



Ceci conduit à la formation d'ion de fer dans sa forme la plus réactive (bivalent) et à la formation de peroxyde d'hydrogène. Ce peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sert ensuite de réactant dans les réactions de Fenton (Réaction 10 et Réaction 11).

II.2.3 Facteurs environnementaux

En dehors des concentrations en pro-oxydants et antioxydants, les principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des lipides au cours des procédés de transformation et de conservation des aliments sont : la température, le pH, l'activité de l'eau, la pression partielle en oxygène, ainsi que la surface de contact entre la matière grasse et les pro-oxydants (cas de l'émulsion).

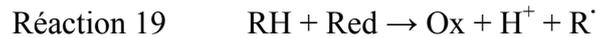
Une élévation de température favorise l'oxydation des lipides. Le départ des hydrogènes allyliques et la décomposition des peroxydes en produits secondaires est favorisée par une élévation de température (Réaction 16).



Il est à noter cependant, que la solubilité de l'oxygène diminue, quand la température augmente. Il existe donc un antagonisme entre ces deux paramètres. A basse température, la solubilité de l'oxygène est élevée : la température devient alors le facteur limitant de la peroxydation lipidique. Au contraire, à température élevée, la concentration en oxygène dans le milieu diminue : elle peut alors devenir un facteur limitant de l'oxydation. Aux températures élevées (de l'ordre de 70 °C), il y a également dénaturation des protéines, notamment en présence d'agents réducteurs (Khayat & Schwall, 1983). Ainsi, les opérations de cuisson sont bien connues pour avoir un effet pro-oxydant marqué. Au contraire, la congélation est un bon moyen pour augmenter la durée de conservation des produits (Genot, 2000).

Le pH influence aussi le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes (Genot *et al.*, 2003 ; Villière, 2005). Premièrement, pour les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir des protons (H⁺) le potentiel redox décroît linéairement avec le pH. Un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation, en particulier quand des espèces pro-oxydantes (ions des métaux de transition) ou antioxydantes (acide ascorbique par exemple) sont solubles

en phase aqueuse (Réaction 17, Réaction 18, Réaction 19) ; le réducteur s'oxyde et réduit le RH en lui donnant un électron.



Le pH intervient également dans la solubilité des composés impliqués dans l'initiation de la réaction. Ainsi, plus le pH est bas, plus la solubilité et le potentiel redox de ces ions métalliques est grand, et donc plus leur réactivité vis-à-vis des molécules oxydables est élevée (Mei *et al.*, 1998b). En général, la précipitation d'un hydroxyde diminue aussi le pouvoir oxydant du fer. En écrivant la relation entre le pH et le potentiel redox d'une demi-équation redox à 25 °C: $\alpha \text{Ox} + q \text{H}^+_{\text{aq}} + n e^- = \beta \text{Red}$ dont le potentiel redox est donné

par : $E = E^0 - \frac{q}{n} 0,06 \text{pH} + \frac{0,06}{n} \log \left(\frac{[\text{Ox}]^\alpha}{[\text{Red}]^\beta} \right)$, on voit donc bien que le potentiel redox

diminue avec l'augmentation du pH.

Dans le cas du tissu musculaire, un pH bas favorise la dénaturation des protéines héminiques et la libération du fer qui est un agent pro-oxydant. Le pH modifie également les interactions entre constituants, du fait d'attractions et de répulsions électrostatiques liées à la charge des molécules. Ainsi, les interactions entre cations métalliques et protéines sont favorisées quand le pH est supérieur à leur point isoélectrique, ce qui est susceptible de favoriser l'oxydation si les protéines sont directement en contact avec les lipides.

L'activité de l'eau (a_w) d'un système influence les réactions d'oxydation des lipides. Par définition, a_w est le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau autour d'un produit à la pression partielle de vapeur d'eau saturante exercée par l'eau pure à la même température. L'effet de l'eau est lié aux propriétés de solvation des ions et des radicaux libres et à son activité chimique. Par solvation, l'eau permet la mobilisation des substances pro-oxydantes ou antioxydantes (mobilité moléculaire). Elle interagit avec les cations métalliques et les rend plus ou moins disponibles dans la catalyse des réactions d'oxydation. En général, en présence de métaux de transitions solubles, à une a_w voisine de 0,3 (comprise entre 0,2 et 0,4), les vitesses d'autoxydation sont les plus faibles. Ceci est dû à la formation d'une couche

monomoléculaire d'eau autour des constituants. Une a_w comprise entre 0,6 et 0,8 correspond aux vitesses d'oxydation les plus grandes. Une très faible a_w est également favorable à l'oxydation (Frankel, 1998b) grâce à la très forte concentration des réactants. Par contre, les réactions initiées par des activités enzymatiques sont généralement fortement ralenties quand l' a_w est inférieure à 0,7 - 0,8.

La concentration en oxygène (pression partielle en oxygène) dans l'espace environnant le produit et dans le produit lui-même influence la vitesse d'oxydation. Elle intervient également au niveau de la nature des produits secondaires formés par décomposition des peroxydes. Son incidence touche donc à la fois la durée de conservation du produit et la nature des odeurs perçues quand le produit est oxydé. La relation entre vitesse d'oxydation et pression partielle en oxygène dépend de facteurs comme l' a_w , la température, la nature des catalyseurs. Quand la concentration en oxygène est suffisamment élevée, la vitesse d'oxydation (ou peroxydation) est indépendante de cette concentration. Inversement, quand la concentration en oxygène est faible, la vitesse d'oxydation est indépendante de la concentration en substrat et directement proportionnelle à la concentration en oxygène. Pour les concentrations intermédiaires, la vitesse d'oxydation dépend à la fois des concentrations en oxygène et en substrat (Frankel, 1998b).

II.3 Produits formés au cours de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides, en particulier des résidus d'acides gras polyinsaturés, conduit à la formation de produits primaires : peroxydes, radicaux libres, diènes conjugués, très instables et rapidement décomposés en produits secondaires (aldéhydes, alcools, cétones). Ainsi, lors du développement des réactions d'oxydation, vont successivement apparaître les produits primaires et secondaires de l'oxydation (Figure 7).

La Figure 7, présente la cinétique de la peroxydation des lipides qui se déroule en trois étapes :

- consommation des substrats : lipides insaturés et oxygène ;
- apparition puis disparition des produits primaires d'oxydation : peroxydes ($ROO\cdot$) ;
- apparition des produits secondaires d'oxydation et notamment des produits volatils (des aldéhydes spécialement, tel que le malonaldéhyde) (Wheatley, 2000).

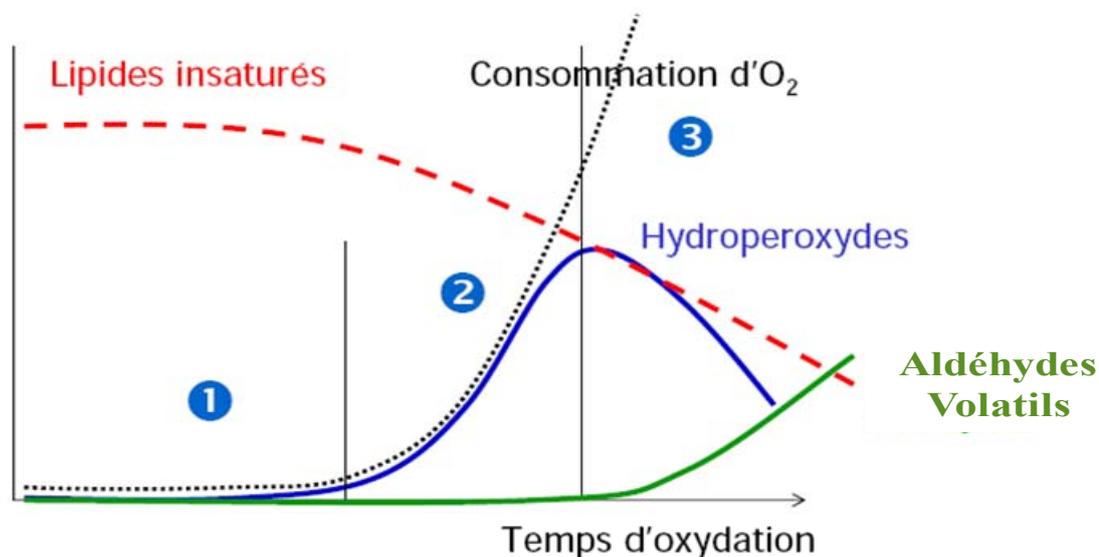


Figure 7 : Schématisation de la cinétique d'oxydation des lipides riches en résidus d'acides gras polyinsaturés ; 1-initiation, 2-propagation, 3-terminaison

Cette figure montre aussi l'existence d'une phase de latence, qui représente la durée pendant laquelle, dans des conditions données, les marqueurs ne semblent pas évoluer. Cela ne signifie pas pour autant qu'aucune réaction chimique n'a lieu dans le produit.

La Figure 7 illustre donc le fait que quantifier un seul substrat ou produit de la réaction ne suffit pas pour caractériser l'état de peroxydation des lipides. Par exemple, une teneur faible en composés volatils n'est pas synonyme de lipides non peroxydés, les peroxydes ne s'étant pas transformés. De même, un dosage ponctuel des produits primaires d'oxydation (peroxydes) peut conduire à une conclusion erronée puisqu'une valeur faible peut aussi bien refléter un système faiblement oxydé ou au contraire un système très oxydé et très avancé en réactions.

Quel que soit le produit visé, pour caractériser l'état global d'oxydation de ses lipides, il est nécessaire de combiner des méthodes basées sur le suivi de la disparition de substrats et de l'apparition des produits primaires et secondaires (Berset & Cuvelier, 1996 ; Frankel, 1998b).

II.3.1 Produits primaires

Des radicaux libres sont formés au cours des phases d'initiation et de propagation de la réaction de peroxydation des lipides. Ces espèces très instables et très réactives sont des composés cytotoxiques susceptibles d'induire des altérations des molécules d'ADN (Kanazawa *et al.*, 2000) et des protéines (Pokorny, 2003). Les diènes conjugués, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoyle des résidus d'acides gras polyinsaturés. Les peroxydes sont des composés qui n'ont ni goût, ni odeur (Belitz *et al.*, 2004), et qui, par conséquent n'affectent pas les qualités olfactives et gustatives des aliments.

En revanche, ils se décomposent en présence de traces de métaux ou sous l'effet de la chaleur. Les peroxydes ROOH peuvent également devenir des radicaux RO[•] (alkoxyls). Une fois le radical alkoxyl formé, il peut de nouveau propager la peroxydation lipidique par réaction en chaîne, conduisant ainsi à la formation de peroxydes, accompagné par la consommation d'oxygène (le cycle étant représenté dans la Figure 8). Ce sont les précurseurs des composés volatils.

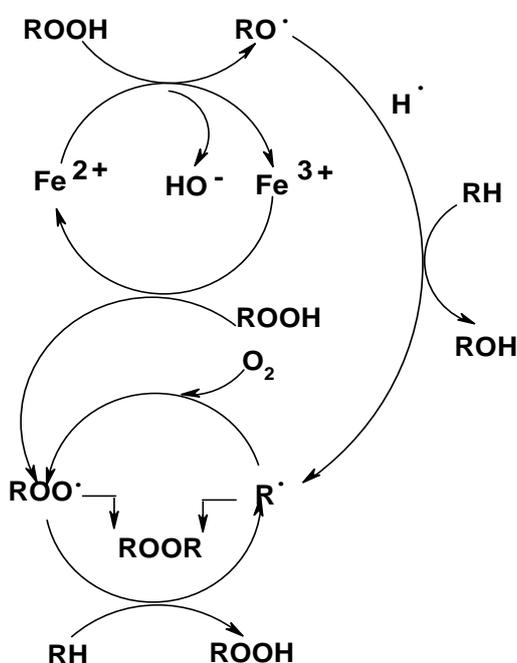


Figure 8 : Mécanisme proposé pour l'oxydation des acides gras polyinsaturés en présence du fer (Mozuraityte *et al.*, 2008)

II.3.2 Produits secondaires

La scission des produits primaires de l'oxydation conduit à la formation de composés secondaires souvent volatils (Figure 9). Les composés secondaires volatils (aldéhydes, alcools, cétones...) sont alors des produits responsables de dégradations ou de l'apparition de d'odeurs pour les aliments oxydés. La nature de ces composés est fonction de la nature du radical présent et du degré d'insaturation de la chaîne du résidu d'acide gras (Figure 9).

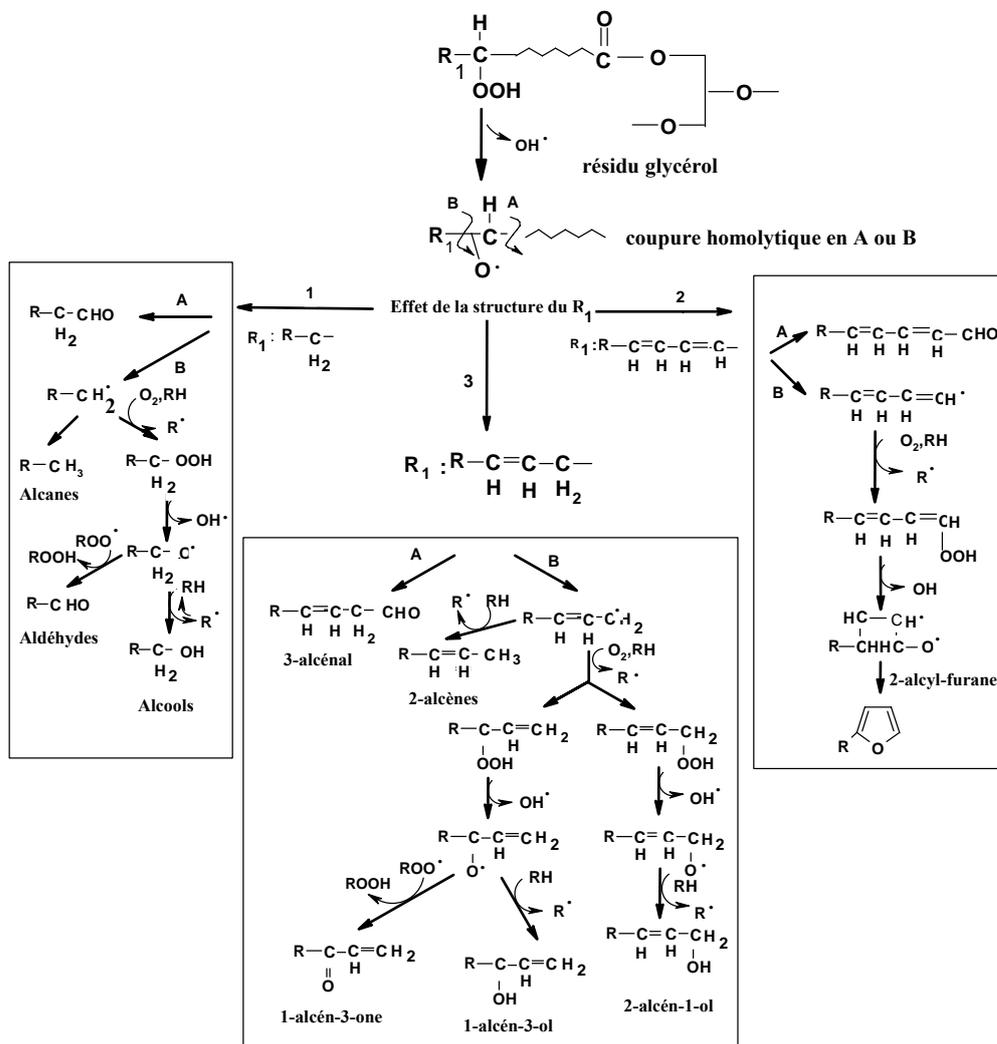


Figure 9 : Mécanisme de décomposition des monoperoxydes en fonction de leur degré d'insaturation (Grosch, 1982 ; Villière, 2005)

La décomposition débute par une coupure homolytique de la liaison O-O de l'hydroperoxyde et la formation de radicaux alkoxy ($\text{RO}\cdot$) et hydroxyle ($\text{HO}\cdot$). La réaction se poursuit alors par une coupure de la chaîne aliphatique d'un côté ou de l'autre du carbone lié au radical. La

nature des produits volatils formés dépend de la nature de l'acide gras peroxydé, notamment de son degré d'insaturation, de la position de la double liaison terminale, de la localisation de la rupture homolytique, et des autres espèces réactives (oxygène, métaux, donneurs et capteurs d'hydrogène) présentes lors de la décomposition (Grosch, 1982 ; Mottram, 1991). De nombreuses fonctions chimiques sont représentées parmi lesquelles, on trouve des alcanes et alcynes, des furanes substitués, des alcools, cétones et aldéhydes saturés et insaturés. Quantitativement, les aldéhydes représentent une part importante des produits formés. D'où généralement ces odeurs de friture d'huile peroxydée.

II.3.2.1 Décomposition des peroxydes issus de la peroxydation des résidus d'acides oléique et linoléique

L'acide oléique est le représentant principal des acides gras de la série n - 9. Le radical oléyl est présent majoritairement dans l'huile d'olive (53 à 80 % selon la provenance), mais aussi dans l'huile de tournesol (50 à 83 %), de colza (58 à 60 %), d'arachide (35 à 66 %), etc. (Karleskind, 1992).

La décomposition des peroxydes de résidus d'acide oléique (Figure 10) conduit principalement pour les radicaux 8-, 9-, 10-, et 11-peroxy oléique, à la formation de décanal et undec-2-énal, nonanal et déc-2-énal, octane, octan-1-ol et nonanal, heptane, heptan-1-ol et octanal.

Les acides carboxyliques, indiqués entre parenthèses sur le schéma, ne sont libérés que lors de l'oxydation de l'acide gras non estérifié. Les proportions relatives des composés volatils formés varient notamment avec la durée et la température d'oxydation (Grosch, 1982).

Ils peuvent, dans un premier temps, subir une interconversion par rupture de la liaison C-O, suivie d'une migration (réarrangement) de la double liaison et de la formation d'un autre radical (Figure 10 ; résidu d'acide oléique et Figure 11 ; résidu d'acide linoléique).

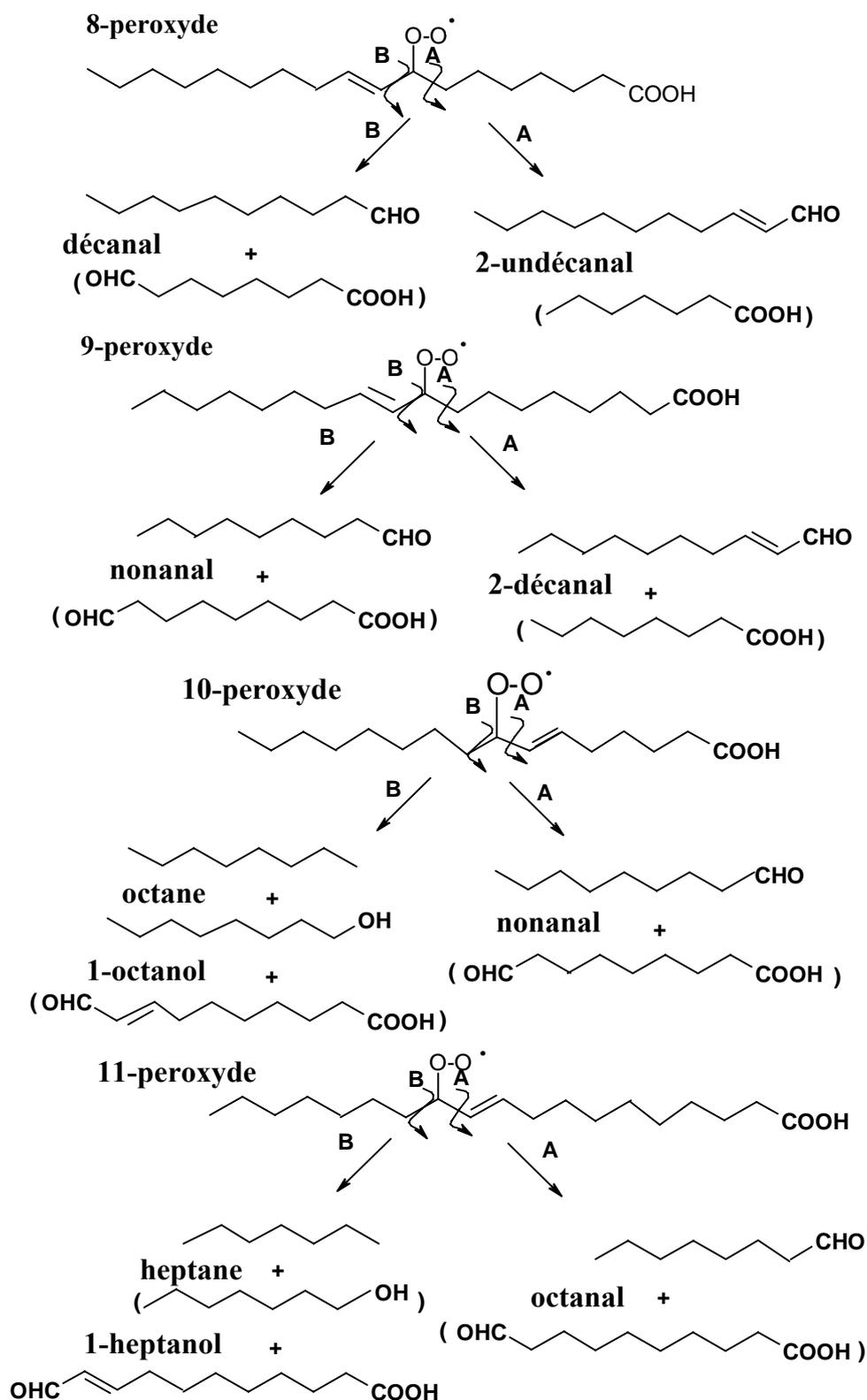


Figure 10 : Mécanisme de décomposition des radicaux 8-, 9-, 10- et 11-peroxy oléique (Frankel, 1980)

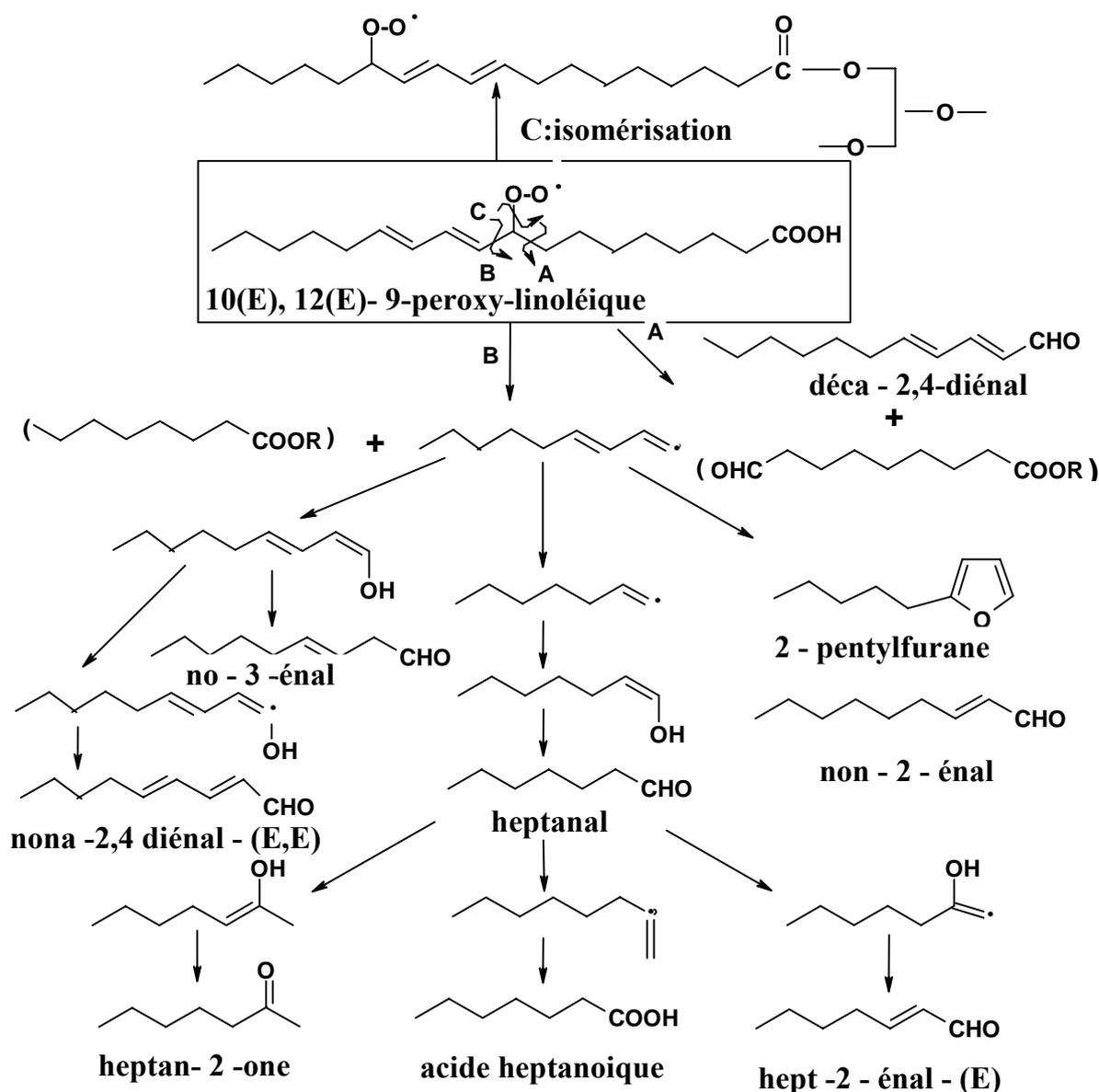


Figure 11 : Mécanisme de décomposition du radical 9-peroxy-linoléique (Frankel, 1998b ; Villière, 2005)

En effet, l'oxydation de l'un ou l'autre de ces peroxydes entraîne la production des mêmes composés volatils dans des proportions toutefois différentes (Frankel, 1980). Dans un second temps, ces radicaux subissent une rupture homolytique d'une liaison C-C, d'un côté ou de l'autre de la liaison C-O (Figure 10) (Grosch, 1982 ; Frankel, 1998b). Ainsi, la décomposition du radical 10(E), 12(E), 9-peroxy-linoléique (Figure 12) se fait par deux voies : A) par formation de déca-2,4-diényl-(E, E) et B) par formation du 2-pentyl-furanne et du non-2-ényl -(E). La décomposition du radical 9(Z), 11(E) 13-peroxy-linoléique suit aussi deux voies, A et B, qui passent par la formation principalement de pentane, pentanol, pentanal et

d'hexanal (Figure 12). Les résidus d'ester de l'acide pentanoïque et hexanoïque se formeraient par oxydation des aldéhydes correspondants (Grosch, 1982). Par contre, la proportion de chacun des composés varie avec les conditions d'oxydation (temps et température) ainsi qu'avec le type de substrat (acide gras, ester méthylique ou glycéride).

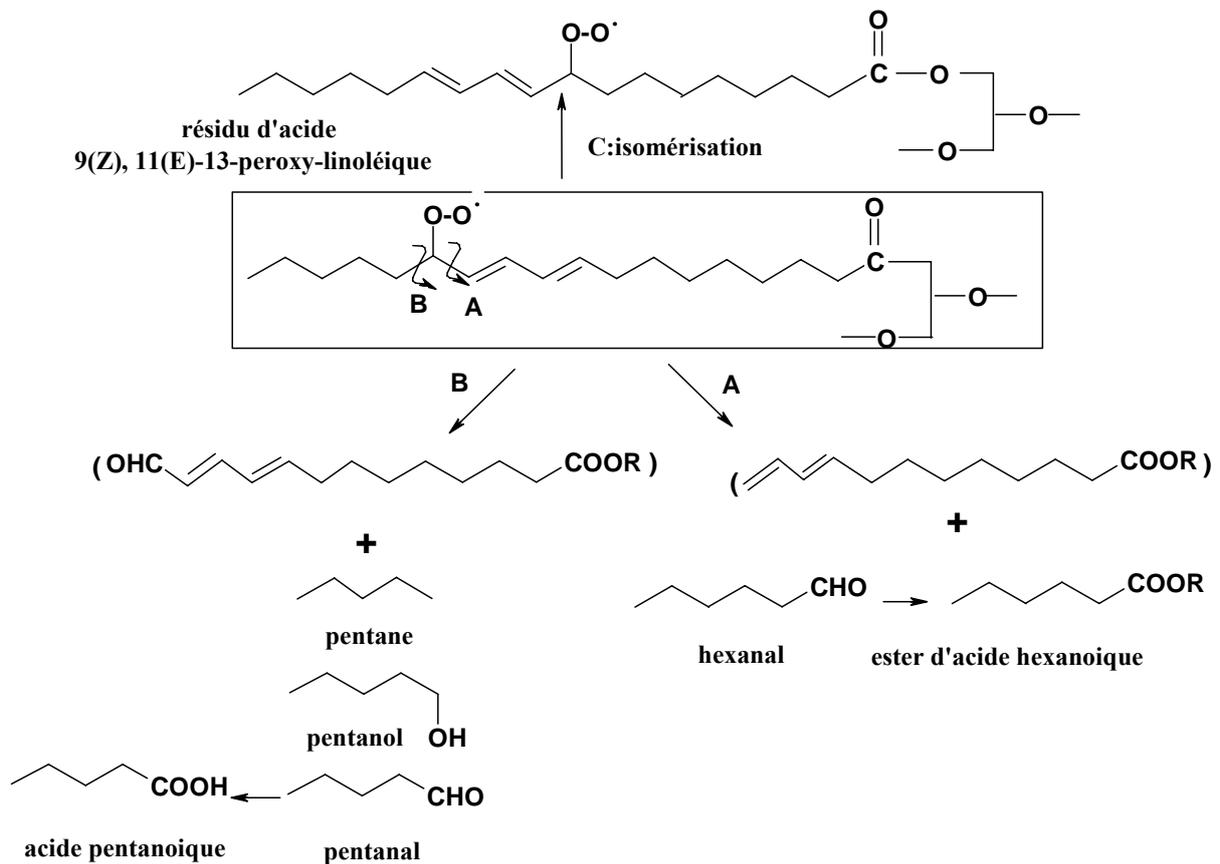


Figure 12 : Mécanisme de décomposition du radical 13-peroxy-linoléique (Grosch, 1982)

De plus, il existe d'autres voies de formation de composés volatils au cours de l'oxydation. Les aldéhydes et cétones insaturés formés lors de la décomposition des monoperoxydes peuvent s'oxyder et générer de nouveaux composés volatils, en majorité des aldéhydes (Frankel, 1998b).

II.3.2.2 Décomposition des peroxydes issus de la peroxydation des résidus d'acides α -linoléique

A côté de résidus d'acide oléique majoritaire et d'acide linoléique, l'huile de colza (utilisée dans notre étude) est connue comme huile végétale riche en résidus d'acide alpha linoléique (un représentant de la famille des acides gras oméga-3, lesquels sont considérés comme d'importants agents de protection contre les maladies du système cardio-vasculaire et certaines formes de cancer). L'huile de colza est « fragile », facilement oxydable, du fait de son nombre élevé en insaturations. La Figure 13 représente la manière la plus fréquente avec laquelle peut être représentée la peroxydation des résidus d'acide α -linoléique.

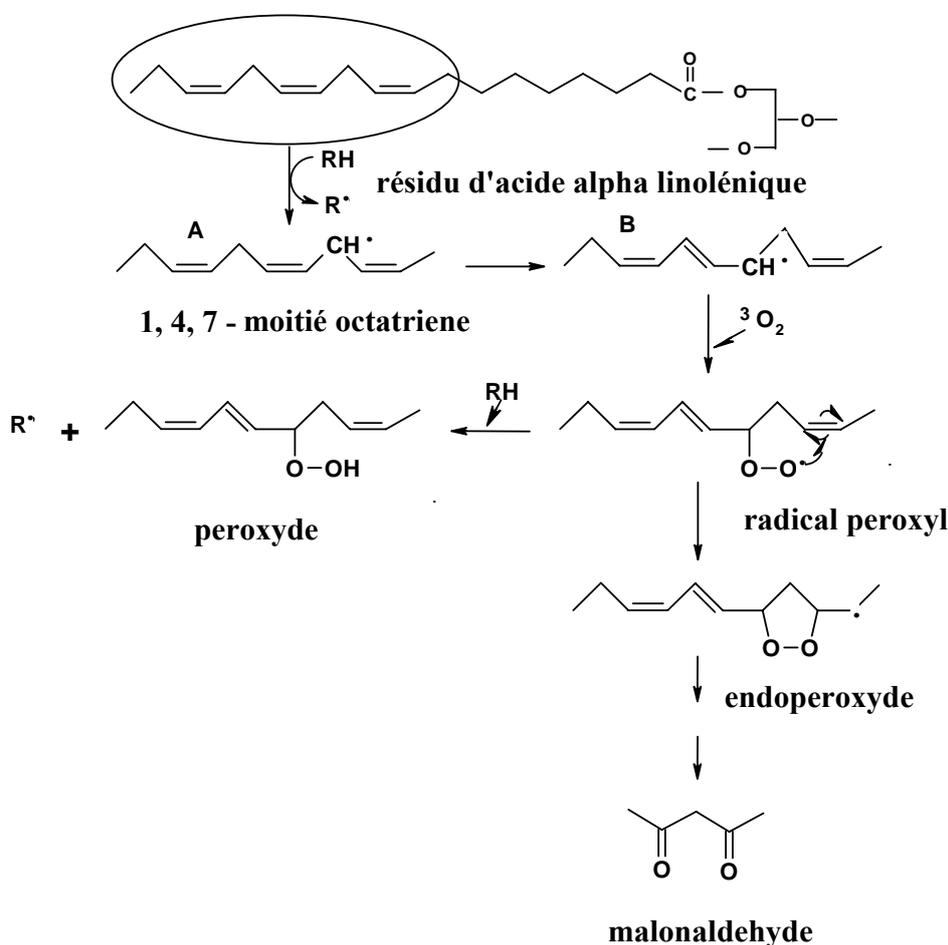


Figure 13 : La voie de peroxydation de résidu d'acide α -linoléique et la décomposition en malonaldehyde d'après Wheatley (2000)

Tout d'abord, l'enlèvement d'un atome d'hydrogène (A) peut se produire par l'intervention d'un radical libre (ex ; R^\cdot). Puis la chaîne triène devient radicalaire et subit un remaniement

qui lui donne une structure conjuguée (B). Les rayonnements ultraviolets induisent la photoxydation de l'oxygène et génèrent l'oxygène singulet, très réactif en termes d'initiation de la peroxydation lipidique (Kubow, 1992). Topallar *et al.* (1997) ont montré que la sensibilité des acides gras insaturés à l'oxydation dépend de la capacité de l'hydrogène allylique à réagir avec un radical hydroperoxyde (propagation).

Une fois les radicaux formés, il se produit de nombreux réarrangements : formation de radicaux endoperoxydes, via des endoperoxydes bicycliques et la formation de malondialdéhyde (Janeiro, 1990), bien que d'autres voies soient aussi proposées (Pryor *et al.*, 1976) pour la formation du MDA. Asakawa *et al.* (1980) ont montré que les sels de fer catalysent la scission des peroxydes de l'acide linoléique et linoléique, pour former du malondialdéhyde.

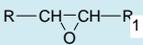
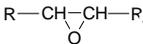
II.3.2.3 Interactions entre protéines et produits de peroxydation des lipides

Les lipides oxydés peuvent réagir avec beaucoup de constituants de produits alimentaires (Pokorny, 1981). Présentes dans la plupart des aliments, les protéines représentent en général de 1 à 50 % du produit. Elles contiennent un grand nombre de groupes fonctionnels qui peuvent donc interagir avec les radicaux libres issus de l'oxydation des lipides. Les réactions les plus importantes sont représentées dans le Tableau 4. Ces interactions ont un impact important sur la dégradation des propriétés fonctionnelles, sensorielles et nutritionnelles des aliments (Pokorny, 2003). La nature de ces interactions dépend du stade de l'oxydation des lipides, c'est-à-dire de la teneur en peroxydes ou en produits secondaires (Ladikos & Lougovois, 1990).

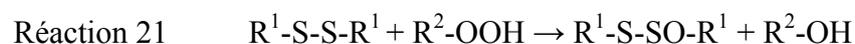
Les protéines réagissent avec les radicaux libres lipidiques pour former des molécules protéiques radicalaires qui peuvent à leur tour interagir et générer soit des lipoprotéines, soit des oligomères protéiques. On obtient principalement des dimères de protéines mais également des oligomères à des degrés de polymérisation plus élevés. Durant la dimérisation, la solubilité et la biodisponibilité des protéines diminuent.

Les peroxydes et des produits secondaires issus de l'oxydation des lipides interagissent avec les protéines et des acides aminés. Les peroxydes sont très réactifs avec les groupements aminés et sulphydryles (groupement très réactifs) des protéines.

Tableau 4 : Réactions des lipides oxydés avec les protéines (Pokorny, 2003)

Produits lipidiques d'oxydation réagissant	Groupe réactif dans les protéines	Produits résultants
Peroxyde (R – OOH)	Chaîne polypeptidique (–CO – NH –) _n	Lipoprotéines insolubles (cholestérol)
Peroxyde (R – OOH)	Thiol (R – SH)	Disulfures (R – S – S – R ₁) R-OH
Peroxyde (R – OOH)	Disulfure (R – S – S – R ₁)	Thiosulphinates (R – S – SO – R ₁) R-OH
Peroxyde (R – OOH)	Sulfure (R – S – R ₁)	Sulfoxydes (R–SO – R ₁)
Peroxyde (R – OOH)	α-aminé (R – CH ₂ – NH ₂) ε-aminé (R – (CH ₂) ₄ – NH ₂)	Aldéhyde (R – CHO) Imine (R – CH = N – R ₁)
Aldéhyde ou cétone (R – CHO) ou (R – CR₁O)	Amine (R – NH ₂)	Imines substituées (R – CH = N – R ₁ ; base de Schiff)
 Epoxydes	Hydroxyle (– OH)	Ether (R – O – R ₁)
 Epoxydes	Carboxylique (R – COOH)	Ester (R – COOR ₁)

Ainsi, les résidus aminés soufrés qui constituent la protéine (cystéine, cystine, méthionine), peuvent réagir avec les peroxydes. Lorsque deux résidus de cystéine sont oxydés en un résidu de cystine, des ponts se forment entre les polypeptides (Réaction 20). Le résidu de cystine est ensuite à son tour oxydé en résidu de thiosulfate (Réaction 21).



Aucun radical libre n'est formé au cours de ces réactions. La réaction d'un hydroperoxyde avec un groupe α -aminé conduit à la formation d'un aldéhyde, tandis que la réaction d'un hydroperoxyde avec un groupe ϵ -aminé (résidu lysyl) conduit à la formation d'une imine. Les modifications chimiques induites par les interactions entre les peroxydes de lipides et les protéines se traduisent par des polymères protéine-protéine, des produits d'addition lipide-protéine, et des dégradations de résidus d'acide aminé, plus particulièrement Lys, Cys, Met, Trp (Gardner, 1979). Les composés carbonylés, notamment les aldéhydes, issus de l'oxydation des lipides réagissent avec les groupements aminés des protéines et forment ainsi des bases de Schiff (imine ; Figure 14).

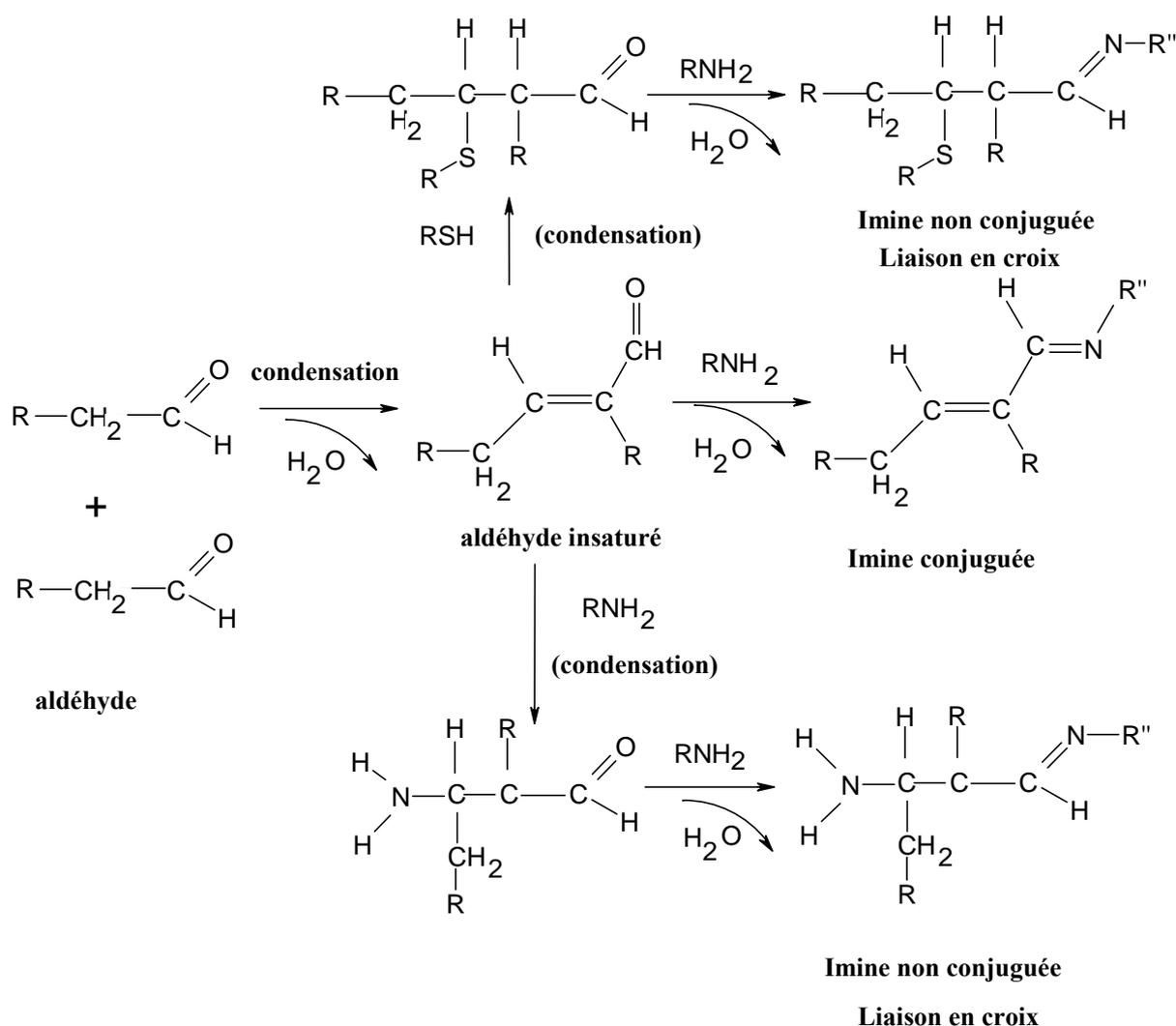


Figure 14 : Mécanismes impliqués dans les interactions entre les protéines et les aldéhydes (Genot et al., 2003). Imine = Base Schiff

Les aldéhydes réagiraient préférentiellement avec les groupements thiol des résidus cystéinyl et les groupements ϵ aminé des résidus lysinyl (Genot et al., 2003).

Les réactions du malonaldéhyde, produit secondaire de l'oxydation des lipides (notamment contenant des chaînes en ω -3), conduisent à la formation de groupements carbonyles au niveau des chaînes d'acides aminés (Burcham & Kuhan, 1996). La solubilité et les propriétés émulsifiantes et gélifiantes des protéines sont affectées par les réactions entre les produits d'oxydation des lipides et les protéines. Les liaisons formées entre les produits d'oxydation des lipides et les protéines sont de trois types : 1/ liaison chimique vraie, 2/ interactions ioniques 3/ interactions hydrogène (interactions dipole-dipole) entre les groupements polaires des lipides oxydés et les protéines (Pokorny, 1987).

III. Peroxydation des lipides dans des systèmes émulsionnés : cinétique

Les cinétiques d'oxydation des matières grasses émulsifiées sont différentes de celles des phases lipidiques continues, à cause des propriétés de l'interface des gouttelettes de l'émulsion et du partage des pro-oxydants, antioxydants et substrats oxydables entre la phase huile, la phase eau et l'interface de l'émulsion (McClements & Decker, 2000). En milieu émulsionné, les cinétiques d'oxydation des matières grasses sont souvent plus rapides que celles observées dans le cas des phases lipidiques continues.

Dans de nombreux aliments transformés (produits laitiers, charcuterie, pâtes et mousses, sauces, mayonnaises, soupes, ...), la fraction triglycérique est sous forme de gouttelettes dispersées, dans une phase aqueuse. Les émulsions huile-dans-eau constituent le modèle le plus représentatif des produits alimentaires.

L'oxydation des lipides dans les milieux émulsionnés met en jeu globalement les mêmes réactions que celles qui se produisent quand les lipides constituent une seule phase continue.

III.1 Émulsions alimentaires

Généralités

Dickinson (1988) définit une émulsion comme un système hétérogène contenant un liquide dispersé dans un autre, sous forme de gouttelette de taille colloïdale ou microscopique. Plus généralement, on peut définir une émulsion comme la dispersion d'une phase non miscible dans une autre, quel que soit son état physique (Cayot & Lorient, 1998a).

Les émulsions peuvent être de différents types. Lorsque la phase dispersée est de nature lipidique et la phase continue aqueuse, on parle d'émulsion huile-dans-eau (H/E). Le lait et la mayonnaise en sont deux exemples. Lorsque la phase aqueuse est dispersée dans la phase lipidique, comme le beurre et la margarine, on parle d'émulsion eau-dans-huile (E/H).

Dans les aliments, la taille des gouttelettes de phases dispersées est très variable. On parle d'émulsion stable pour un diamètre compris entre 0,1 µm et 50 µm. L'émulsion huile-dans-eau constitue le système modèle retenu pour notre étude.

III.1.1 Stabilité physique des émulsions

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables. L'augmentation de la surface de contact entre les deux liquides augmente l'énergie libre du système du fait de la tension interfaciale. Spontanément, une émulsion tend à retrouver l'état thermodynamiquement le plus stable pour lequel la surface de contact entre les deux liquides est la plus faible, c'est-à-dire deux phases homogènes séparées.

III.1.1.1 Mécanisme de déstabilisation

On peut identifier 5 phénomènes distincts dans la perte de stabilité d'une émulsion (Figure 15), sachant que la déstabilisation est un concept cinétique dans un état thermodynamique métastable (Cayot & Lorient, 1998a).

Ces cinq facteurs de déstabilisations sont :

- La floculation ou agrégation de gouttelettes, celles-ci restant individualisées sous l'effet de la force d'attraction. Elle est favorisée par les mouvements des particules au sein du système, que ce soit un mouvement Brownien, ou sous l'effet de forces hydrodynamiques.
- Le crémage et la sédimentation (décantation) sont le résultat d'une séparation gravitationnelle des phases, liée à leur différence de densité. Le crémage se produit quand la phase dispersée possède une densité plus faible que la phase continue, ce qui est le cas dans les émulsions huile-dans-eau.
- La coalescence résulte de la fusion de deux films interfaciaux. Les gouttelettes fusionnent en gouttes plus grosses. L'étape ultime de la coalescence est la séparation de phase.
- Le phénomène de maturation d'Ostwald. Les gouttelettes augmentent en taille sous l'effet de transfert de masse entre gouttelettes *via* la phase continue. On l'observe surtout entre les bulles d'air d'une mousse (émulsion air-dans-eau), l'air étant faiblement soluble dans l'eau. Pour l'éliminer, il faut minimiser la solubilité dans la phase continue des molécules qui constituent la phase dispersée (inhibition du transport de matière) ou de diminuer l'énergie interfaciale (diminution de la surpression de Laplace).
- L'inversion de phase, qui est le passage brutal d'une émulsion « huile-dans-eau » à une émulsion « eau-dans-huile ».

La stabilité physique d'une émulsion peut influencer sa stabilité chimique. En effet, une phase crémée représente une émulsion concentrée dans laquelle les probabilités de collisions entre gouttelettes augmentent et par la suite et les vitesses de réaction pourraient ainsi augmenter.

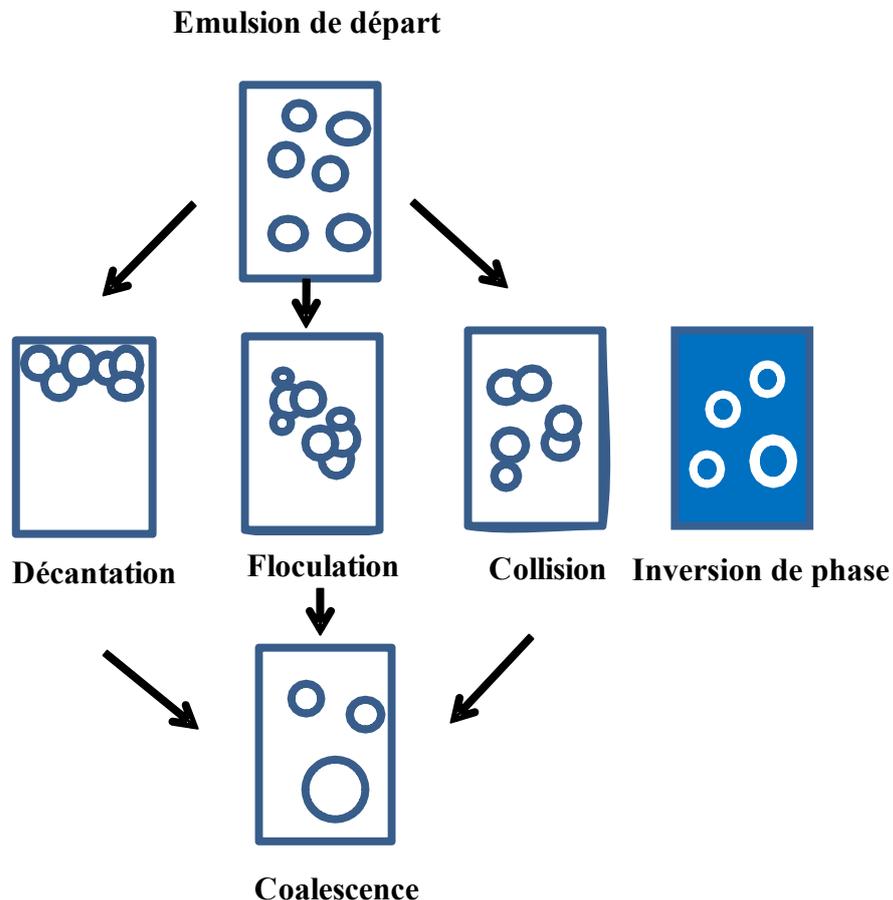
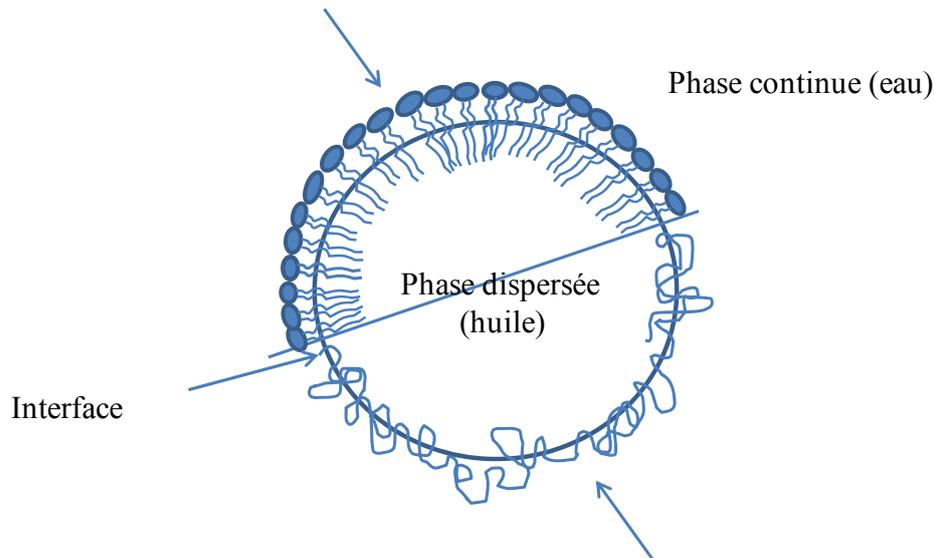


Figure 15 : Schémas représentant les principaux mécanismes de déstabilisation des émulsions

III.1.1.2 Stabilisation des émulsions

Il est possible de stabiliser les émulsions sur une durée qui peut aller de quelques heures à quelques années. On parle alors de la stabilité cinétique ou d'état métastable. Pour cela, on ajoute un composé « à activité de surface » (Figure 16). Ces composés peuvent être naturels ou synthétiques. Un composé « à activité de surface » est une substance qui abaisse la tension superficielle d'un liquide ou la tension interfaciale entre les deux liquides non miscibles. En présence d'un tel composé, la coalescence immédiate est empêchée. Ces composés, qui permettent l'existence d'une émulsion, sont appelés : agents émulsifiants et agents de texture.

Emulsifiant synthétique, tel que les tween, ou mono- et diacylglycérol



Emulsifiant naturel de grande taille comme une protéine

Figure 16 : Composés « à activité de surface »

Agents émulsifiants

Les agents émulsifiants jouent un rôle essentiel dans la formation et la conservation des émulsions. Un émulsifiant est généralement défini comme une substance amphiphile permettant de maintenir homogène le mélange de deux ou plusieurs phases non miscibles. C'est donc un composé qui, possédant à la fois des fonctions hydrophiles et hydrophobes, s'adsorbe aux interfaces huile/eau en abaissant la tension interfaciale. Il diminue l'énergie interne du système et le stabilise. De plus, les émulsifiants peuvent former autour des gouttelettes une barrière protectrice qui les protège de l'agrégation et de la coalescence.

Parmi les émulsifiants utilisés en agroalimentaire, on distingue les émulsifiants de faible masse moléculaire (exemple : mono- ou diacylglycérol) et les émulsifiants macromoléculaires, constitués de bio-polymères : les protéines.

Emulsifiant de faible masse moléculaire

L'efficacité d'un émulsifiant est liée à la proportion relative des parties hydrophobes et hydrophiles de la molécule, laquelle est caractérisée empiriquement, pour les émulsifiants de faible masse moléculaire, par la balance hydrophile - lipophile (HLB) (Équation 1).

$$\text{Équation 1} \quad \text{HLB} = \frac{\text{Masse de la partie hydrophile}}{\text{Masse de la partie hydrophobe}} \times 20$$

Les valeurs de HLB s'échelonnent entre 1 et 20. Plus cette valeur est faible et plus l'émulsifiant est lipophile et inversement. Les émulsifiants lipophiles, présentent une HLB comprise entre 1 et 6 et stabilisent des émulsions E/H. Les émulsifiants hydrophiles ont une valeur de HLB comprise entre 8 et 18, et stabilisent des émulsions H/E. Dans les cas d'un mélange d'émulsifiants, la HLB du mélange est la moyenne pondérée des HLB de chaque constituant. Cet indice ne donne toutefois qu'une première indication de l'efficacité d'un émulsifiant car il ne prend pas en compte certains paramètres tels que l'hydratation de la partie polaire ou la répartition spatiale entre zones polaires et apolaires (Marion & Douliez, 2002), ou encore l'effet des autres constituants de la formulation, la salinité ou la température, etc (Salager, 1996).

Les émulsifiants de faible masse moléculaire, parfois qualifiés dans ce mémoire de «petits émulsifiants» ou de surfactants, consistent essentiellement en des esters partiels d'acides gras et de polyols et/ ou d'acides organiques. On distingue : les mono- et diglycérides, qui constituent la principale catégorie d'émulsifiants à usage alimentaire, les dérivés de monoglycérides, les lécithines qui sont des mélanges plus ou moins purifiés de phospholipides généralement extraits de soja ou d'œuf, les esters de sorbitol et leurs dérivés polyoxyéthyléniques, plus connus respectivement sous leurs noms commerciaux Span et Tween. Ils présentent une large gamme de HLB, permettant de multiplier les applications comme agents émulsifiants d'émulsions H/E ou E/H. Par contre, les esters de propylène glycol, les sucroesters et sucroglycérides sont rares en alimentaire en raison de leur coût de fabrication élevé.

Emulsifiants macromoléculaires

Cette classe d'émulsifiants est majoritairement constituée par des protéines, des polysides, ou des lipoprotéines comme celles présentes dans le jaune d'œuf.

La conformation des biopolymères aux interfaces huile-eau s'établit de façon à minimiser le nombre de contact entre domaines polaires et apolaires (McClement, 1999). Une corrélation entre l'hydrophobie de surface des protéines et leurs propriétés émulsifiantes a été proposée par certains auteurs, mais d'autres réfutent ce lien (Walstra & Roos, 1993). Certains résultats

montrent en effet que l'hydrophobie de surface n'est pas toujours un facteur déterminant de l'aptitude des protéines à s'adsorber aux interfaces (Leman & Kinsella, 1989).

Plusieurs expériences et de nombreux modèles théoriques (Dickinson & Euston, 1990) indiquent qu'une partie seulement de la protéine s'adsorbe à l'interface (Dickinson, 1996). Ces changements sont bien sûr fonction des conditions de milieu : pH, force ionique, température (Walstra & Roos, 1993).

En règle générale, on peut distinguer le comportement des protéines « flexibles » (exemple, le caséinate de sodium) des protéines globulaires (exemple la β -lactoglobuline). Les protéines « flexibles » (dans notre étude, le caséinate de sodium), se positionnent à l'interface de sorte que leurs segments apolaires soient au contact de la phase lipidique, et que leurs segments polaires restent dans la phase aqueuse. Elles adoptent une structure caractéristique organisée selon le modèle « chaîne-boucle-queue » (Figure 17).

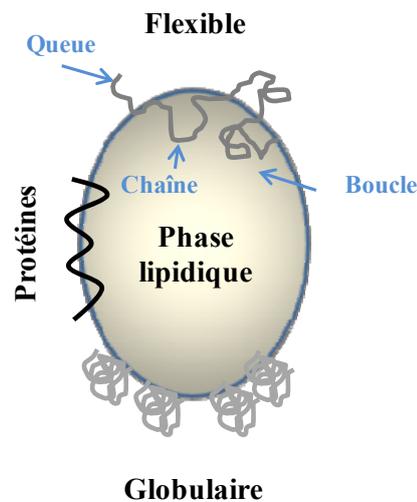


Figure 17 : Positionnement à l'interface d'émulsifiants polymériques : flexible et globulaire

Les protéines flexibles perdent donc, quand elles s'adsorbent aux interfaces H/E, leur structure tertiaire, voire secondaire. A faible concentration, elles sont très étalées à l'interface et l'épaisseur du film est de l'ordre de 2 à 5 nm (Graham & Philips, 1979). En revanche, quand leur concentration augmente, les segments protéiques sont davantage compactés latéralement, les segments hydrophiles s'insèrent plus profondément dans la phase aqueuse, et l'épaisseur de la couche adsorbée augmente (12 - 15 nm).

Les protéines globulaires (dans notre étude, la β -lactoglobuline), étant plus compactes et plus rigides, conservent une part importante de leur structure tertiaire à l'interface. Le modèle « chaîne-boucle-queue » n'est donc plus adapté. Dans le cas de la β -lactoglobuline, elle s'adsorbe très près de l'interface et présenterait plus de protubérance dans la phase aqueuse (Dalglish & Leaver, 1990). Ces polymères forment des films interfaciaux relativement épais, avec des structures plutôt ouvertes (McClement, 1999). Après adsorption, des changements conformationnels interviennent encore. Ils maximisent les contacts entre les groupes de même polarité portés par les différents polymères. Ces changements de conformation ne sont pas immédiats et l'équilibre thermodynamique est long à s'établir.

Le film interfacial formé par ces biopolymères est dense et possède des propriétés viscoélastiques qui sont mises en jeu dans la protection contre la coalescence et la floculation. Par ailleurs, les interactions et/ou répulsions stériques et électrostatiques, pour lesquelles les conditions de pH et de force ionique sont déterminantes, permettent de protéger les gouttelettes de l'agrégation (McClement, 1999).

Agents de texture

Les agents de texture utilisés en agroalimentaire sont pour la plupart des polysides. Ils maintiennent les gouttelettes en suspension dans l'émulsion en modifiant les propriétés rhéologiques de la phase aqueuse. Les agents épaississants augmentent la viscosité de la phase aqueuse, ralentissant ainsi l'effet des forces gravitationnelles. Les agents gélifiants créent un réseau tridimensionnel qui emprisonne les gouttelettes. En limitant les mouvements des gouttelettes, les agents de texture ralentissent les phénomènes de floculation, crémage ou sédimentation.

III.1.2 Influence de l'interface huile-eau sur le développement de réaction de peroxydation

L'interface relève d'une organisation complexe comprenant les émulsifiants, mais également d'autres composés qui peuvent y avoir migré par attraction électrostatique ou du fait de leur polarité. Les travaux réalisés ces dernières années démontrent clairement que les cations métalliques, même quand ils ne sont présents qu'à l'état de traces, jouent un rôle clef dans la peroxydation des émulsions comme en système contenu. Les études récentes se sont donc focalisées sur les interactions solutés-interface et aussi sur l'influence de la composition et des

propriétés de l'interface. Une attention particulière a été portée sur l'impact des interactions des métaux avec l'interface.

III.1.2.1 L'interface : contrôle la peroxydation

L'interface est un endroit clé pour le contrôle de l'initiation de la réaction de peroxydation. Son rôle a été confirmé et précisé : il ne se limite pas aux seules interactions électrostatiques avec les métaux présents. L'implication de l'interface tient autant à ses propriétés physiques qu'à sa réactivité chimique pour l'orientation de groupements chimiques (Villier & Genot, 2006). C'est un lieu d'échange facilitant ou freinant la pénétration et la diffusion des métaux ou des radicaux hydrosolubles (Bondet, 1999). En outre, dans les systèmes émulsionnés, les phénomènes de migration et de ségrégation des constituants amènent à la localisation des étapes de l'oxydation en un lieu bien précis : l'interface. Par exemple, en raison de la relative polarité des peroxydes, l'initiation de la réaction se produirait au niveau de l'interface huile-eau (Frankel *et al.*, 1994), c'est-à-dire de manière très localisée (forte concentration locale).

L'interface est un lieu stratégique car le déroulement de l'oxydation des lipides dans les émulsions est largement réagi par les échanges entre substrat lipidique et phase aqueuse. C'est le lieu de rencontre d'une part entre les acides gras ou les triacylglycérols insaturés et, l'oxygène diffusant du milieu extérieur (via phase aqueuse) et d'autre part, entre les espèces pro-oxydantes, comme les ions métalliques solubilisés dans la phase aqueuse et la matière grasse.

III.1.2.2 L'aire interfaciale

Les données bibliographiques concernant l'influence de l'aire interfaciale sur l'intensité et la vitesse d'oxydation des lipides émulsionnés sont assez limitées. D'après certains auteurs, l'aire interfaciale semblerait jouer un rôle considérable (Coupland & McClements, 1996 ; Frankel, 1998b).

Généralement, il est admis que l'oxydation lipidique est favorisée dans les systèmes comportant de fines gouttelettes, c'est-à-dire avec une aire interfaciale très grande. En effet, la diffusion et l'accès de l'oxygène et des catalyseurs métalliques au contact de la phase lipidique est d'autant plus facile. Pourtant, aucun effet de la taille n'a été observé par Osborn

et Akoh (2004) sur la peroxydation des lipides dans des émulsions huile-dans-eau. Aucun effet n'a été aussi observé par Roozen *et al.* (1994) pour des gouttelettes dont le diamètre moyen variait de 0,45 à 1,01 μm .

De manière plus convaincante, Lethuaut *et al.* (2002) ont observé que dans les émulsions huile-dans-eau stabilisées par une protéine, plus le diamètre moyen des gouttelettes est faible et plus l'oxydation se développait rapidement. Néanmoins, Villier (2005) et Dimakou *et al.* (2007) ont rapporté que la taille de gouttelettes d'émulsions huile-dans-eau stabilisées par des protéines (SAB, sodium caséinate) et/ou par le Tween 20, était sans effet sur la stabilité oxydative. Kiokias *et al.* (2007), ont alors conclu que l'oxydation est davantage contrôlée par la vitesse propre des réactions chimiques, que par la cinétique de diffusion aux interfaces.

III.1.2.3 Nature et épaisseur à l'interface

La nature de l'émulsifiant utilisé conditionne plus ou moins la stabilité oxydative de la phase lipidique. Les protéines pourraient influencer l'amorçage d'oxydation en fonction de l'épaisseur et de la résistance du film interfacial (Strahm & Neukom, 1981). Elles joueraient également un rôle par leur capacité à attirer ou repousser les agents pro-oxydants et antioxydants et à former une barrière physique entre les deux phases (Villiere *et al.*, 2005). Le développement de l'oxydation a été comparé dans des émulsions pH 6,5 stabilisées soit par SAB (sérum albumine bovine), soit par le caséinate de sodium. Contrairement à la SAB, qui est une protéine globulaire de masse moléculaire élevée (69 kDa), le caséinate de sodium est un mélange de protéines plus moins phosphorylées, de faible degré d'organisation et de masse moléculaire faible (entre 20 et 25 kDa). L'expérience sur la peroxydation des émulsions stabilisées par ces protéines a été répétée en présence et en absence d'un chélateur de métaux (EDTA). La présence d'EDTA dans la phase aqueuse augmente la stabilité chimique des émulsions quelle que soit la protéine émulsifiante, confirmant ainsi l'implication des métaux dans l'oxydation. En effet, l'EDTA, chélate les métaux dans la phase aqueuse donc loin de l'interface où ils sont peu disponibles pour initier ou propager la peroxydation. Dans ce cas, ce sont les émulsions stabilisées par la SAB qui s'oxydent beaucoup plus vite que celles stabilisées par le caséinate de sodium. En l'absence d'EDTA, l'oxydation est plus rapide avec le caséinate de sodium qu'avec la SAB. Cette inversion est expliquée par les propriétés anti-radicalaires des caséines. Les métaux étant chélatés par l'EDTA dans la phase aqueuse, le caséinate de sodium révèle ses propriétés anti-radicalaires et limiterait la formation des

radicaux, ou capterait les radicaux formés empêchant la réaction de peroxydation de se propager. Ainsi, un même émulsifiant protéique peut se comporter comme un pro-oxydant en attirant les métaux présents à l'interface ou inversement se comporter comme un antioxydant en révélant des propriétés anti-radicalaires lorsque les métaux présents sont chélatés dans la phase aqueuse (Figure 18).

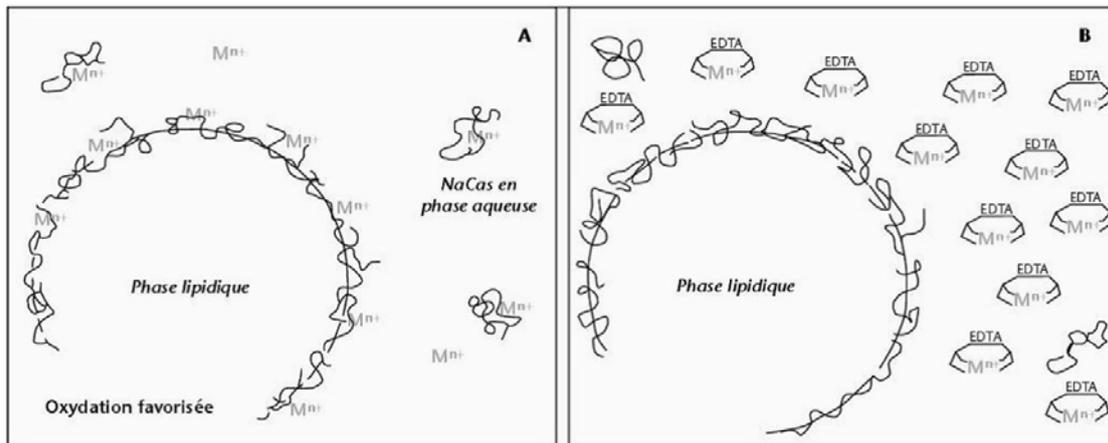


Figure 18 : Représentation schématique de l'implication des protéines émulsifiantes dans l'oxydation d'émulsion stabilisées par le caséinate de sodium en absence (A) ou en présence (B) d'EDTA. pH de la phase aqueuse 6,5 (d'après Villier et Genot(2006))

La taille de l'émulsifiant et sa HLB peuvent également être déterminantes pour la stabilité oxydative des émulsions. Si la tête hydrophile de l'agent tensio-actif est grosse, l'effet « barrière physique » vis-à-vis des catalyseurs de l'oxydation présents dans la phase aqueuse peut être important (Chaiyasit *et al.*, 2000 ; McClements & Decker, 2000). Chaiyasit *et al.* (2000) ont comparé le Brij-stéarate (polyoxystéaryl éther) et le Brij-laurate (polyoxylauryl éther), deux émulsifiants structurellement identiques mais avec une chaîne hydrophobe constituée de 18 et 12 atomes de carbone, respectivement. Ils ont constaté que dans des émulsions à base de linoléate de méthyle ou d'huile de poisson, le Brij-stéarate ralentissait davantage l'oxydation que le Brij-laurate. Ces résultats suggèrent que la présence d'une longue chaîne hydrophobe (C : 18) diminue la capacité des radicaux libres à atteindre la cible que sont les résidus d'acides gras insaturés.

Notons qu'un excès d'émulsifiant peut contribuer à réduire l'oxydation des émulsions sans doute du fait de la formation de micelles mixtes protégeant les substrats oxydables (Ponginebbi, 1999).

III.1.2.4 Charge électrique de surface

Les propriétés électriques de surface sont définies en termes de densité de charge (nombres de charge par unité de surface) et de potentiel de surface (énergie requise pour charger la surface) (Hunter, 1993). Une surface chargée électriquement attire des ions de signes opposés (Young *et al.*, 2002). Plus la densité de charge des gouttelettes est élevée, plus ces dernières vont attirer des contre-ions. Les attractions et répulsions électrostatiques vont donc influencer significativement l'action des pro- et anti-oxydants (Huang *et al.*, 1996a).

Pour exercer son activité oxydative sur les résidus d'acides gras insaturés des triacylglycérols ou les résidus de peroxydes, les ions de fer ou d'autres métaux transitionnels doivent approcher la phase lipidique. Les métaux à l'état ionique étant chargés positivement, cette approche est fortement dépendante des interactions électrostatiques avec l'interface.

Il est alors possible de contrôler la vitesse des oxydations, en maîtrisant le signe et le nombre de charges de surface. Mei *et al.* (1998b) ont aussi démontré qu'une émulsion d'huile de saumon dans l'eau s'oxyde beaucoup plus vite en présence de fer si l'émulsion était stabilisée par un émulsifiant anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), plutôt que par un émulsifiant cationique, le bromure de dodécyltriméthylammonium (DTAB) ou le polyoxyéthylène 10 lauryl éther (Brij35) non ionique. A l'inverse, l'addition de NaCl ou d'un chélateur hydrosoluble dans le milieu, en présence de SDS, réduit la vitesse d'oxydation par les ions fer. Dans ce cas, les ions Na^+ , attirés au niveau de l'interface chargée négativement empêcheraient l'approche du fer de la zone de contact avec la phase lipidique (Mei *et al.*, 1998b). De même, à 20 °C, des émulsions d'huile de poisson stabilisées par des protéines de lactosérum, s'oxydent moins vite à pH 3,0 qu'à pH 7,0 (Hu *et al.*, 2003a). L'interprétation proposée par les auteurs repose à nouveau sur les interactions électrostatiques des métaux avec l'interface. Dans le cas des émulsions stabilisées par des protéines, la charge portée par l'interface est déterminée par le pH de la phase continue et du pI de la protéine. Lorsque le pH est inférieur au point isoélectrique (pI) de la protéine, celle-ci est chargée positivement. Les interactions des métaux avec l'interface seraient alors minimisées du fait de répulsions électrostatiques, ce qui limiterait le développement de l'oxydation. A l'inverse, quand le pH est supérieur au pI de la protéine, les ions fer interagiraient avec les protéines à l'interface.

Par contre, des résultats montrent que la charge des gouttelettes ne suffit pas toujours à expliquer le déroulement de l'oxydation dans les émulsions stabilisées par des protéines. A

pH 3,5, c'est-à-dire en dessous du pI des protéines, la charge portée par les gouttelettes va dans le sens : lactosérum doux < protéines de lactosérum (WPI) < α -lactalbumine < β -lactoglobuline alors que le niveau de peroxydes formés lors de l'oxydation des émulsions va dans le sens : protéines de lactosérum (WPI) < α -lactalbumine < lactosérum doux < β -lactoglobuline (Hu *et al.*, 2003a).

III.1.3 Influence de la nature et des propriétés de la phase lipidique

Concernant la phase lipidique (phase dispersée), la stabilité chimique des lipides insaturés diminue lorsque le degré d'insaturation augmente comme dans une phase huileuse unique (Cho *et al.*, 1987). Pourtant, cette règle ne semble pas s'appliquer aux triacylglycérols de résidus d'acides gras polyinsaturés. Une étude de Duh *et al.* (1999) a montré que dans des émulsions huile-dans-eau stabilisées par un surfactant de type Tween 20, 60 ou 80, les résidus d'acide arachidonique (C20:4), éicosapenténoïque (C22:5) et docosahexaénoïque (C22:6) étaient moins oxydables qu'en phase lipidique continue (Duh *et al.*, 1999). Une diminution de l'oxydabilité des acides gras polyinsaturés à chaîne longue a également été observée lorsque ils sont sous la forme des micelles mixtes dans une solution aqueuse (Miyashita *et al.*, 1993). L'explication proviendrait de la structure spatiale de ces acides gras très repliés sur eux-mêmes et créant un cœur hydrophobe. En effet, l'accessibilité des doubles liaisons d'acides gras aux agents initiateurs de réactions radicalaires et à l'oxygène conditionne l'oxydabilité.

De ce point de vue, un autre facteur à prendre en compte est le positionnement des tensioactifs à la surface des gouttelettes, qui dépend de leur concentration. Coupland et McClements (1996) ont étudié l'oxydation (initiée par le fer) d'émulsions de linoléate d'éthyle stabilisées par du Tween 20. A faible concentration, les molécules de linoléate s'orientent parallèlement à l'interface, exposant leurs doubles liaisons à l'initiateur hydrosoluble (Figure 19). L'oxydabilité du système croît alors avec la concentration du tensioactif, le linoléate. Mais à partir d'une concentration limite, par manque de place, les molécules d'acide gras qui jouent le rôle de tensioactif, s'orientent perpendiculairement à l'interface et deviennent moins accessibles au catalyseur (Figure 19). L'oxydabilité de la matière grasse diminue alors. Par la suite, à l'intérieur de la goutte, la concentration en substrat oxydable serait faible et les chances de collisions avec les radicaux peu importantes : la propagation de la réaction est alors limitée.

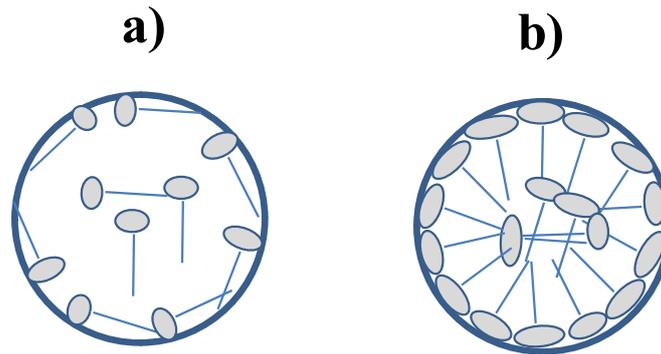


Figure 19 : Représentation schématique de la répartition du substrat oxydable dans la phase dispersée d'une émulsion : **a)** à faible proportion en linoléate d'éthyle, **b)** à forte proportion en linoléate d'éthyle. D'après (Coupland & McClements, 1996)

D'après ces résultats, la concentration et la nature des lipides oxydables déterminent leur répartition à l'intérieur et en surface de gouttelettes, leur accessibilité à l'oxygène et aux initiateurs de la peroxydation et déterminent donc leur vitesse de la peroxydation.

III.1.4 Influence de la phase aqueuse

Les émulsions alimentaires ont pour la plupart une phase aqueuse relativement complexe contenant un grand nombre d'ingrédients comme des sels, des oses, des épaississants, des protéines, etc. On observe la même complexité pour l'interface avec autant d'éléments susceptibles d'exercer un pouvoir pro- ou antioxydant. Outre sa composition, la phase aqueuse peut influencer la stabilité d'une émulsion par différents paramètres physico-chimiques tels que le pH, force ionique et/ou la viscosité qui vont agir sur les vitesses des réactions de peroxydation et radicalaires plus généralement.

III.1.4.1 Influence du pH

Pour rappel, comme nous l'avons déjà écrit précédemment d'une manière générale, l'oxydation des lipides est plus rapide à pH acide (Frankel, 1998b ; Mancuso *et al.*, 1999). Par exemple, il a été montré qu'une huile de poisson (émulsion huile-dans-eau stabilisée par des Tween 20) était plus rapidement oxydée par le fer à pH acide (Donnelly *et al.* (1998). Au contraire, Ruth *et al.* (1999) ont obtenu des quantités de composés volatils libérés (ex. hexanal) plus importantes pour les émulsions constituées de 40 % d'huile de tournesol, stabilisées par le Tween 60 et incubées à 60 °C à pH 6 et qu'à pH 3.

Mais le pH influence aussi l'état électrique des constituants du milieu et rejoint l'effet de charge. Ainsi, la même émulsion d'huile de poisson stabilisée par des protéines du lactosérum s'oxyde plus vite à pH 7 qu'à pH acide, car les protéines chargées positivement repoussent les ions fer, tandis qu'au dessus de leur point isoélectrique, elles les attirent, favorisant alors l'action des pro-oxydants. Donc pour ce cas, le facteur prédominant devient la concentration en ion fer du milieu et non plus le pH.

III.1.4.2 Influence du chlorure de sodium sur la stabilité d'une émulsion

III.1.4.2.1 Sur la coalescence et la floculation

Une émulsion stabilisée par de la caséine β en présence de NaCl (0,1 M) résiste moins bien à la coalescence lors d'une centrifugation qu'en absence de sel (Cayot & Lorient, 1998c). La réduction de densité de charge entraînerait une diminution des répulsions électrostatiques entre globules gras et augmenterait la probabilité de floculation (Dickinson, 1996). L'addition de sel après fabrication de l'émulsion à l'aide de caséinate déstabilise aussi celle-ci (Cayot & Lorient, 1998b).

Pour les émulsions faites à base de caséine α_S -CN (caséine α_S), l'effet de NaCl sur la résistance à la coalescence est moins évident (Cayot & Lorient, 1998b). Néanmoins, les émulsions préparées à l'aide de cette caséine vont floculer en présence de NaCl et de CaCl_2 à des concentrations dépassant 2 M ou 0,005 mM, respectivement (Gu *et al.*, 2005).

III.1.4.2.2 Sur l'oxydation

Le chlorure de sodium (NaCl) est un important additif dans l'industrie alimentaire. Il a été signalé comme inhibiteur d'oxydation dans des émulsions à base d'huile de maïs stabilisée par le SDS et dans des émulsions stabilisées par un émulsifiant cationique (DTAB) ou non ionique (Brij) (Mei *et al.*, 1998b). Ce fait est expliqué par la compétition à l'interface entre le fer et le sodium. La concentration du sodium, 3000 fois plus importante que celle du fer empêcherait l'accumulation de ce dernier à l'interface et limiterait son activité catalytique.

Cependant, McClements et Decker (2000) rapportent que dans certaines conditions, le NaCl se révèle pro-oxydant en raison de la capacité de l'ion chlorure à augmenter l'activité catalytique du fer par le fait d'augmenter sa solubilité (Kanner *et al.*, 1991 ; Osinchak *et al.*, 1992).

D'après Harel (1994), le NaCl inhibe l'oxydation de l'acide ascorbique et les réactions qui produisent d' $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et HO^{\cdot} , par l'empêchement des métaux de transition d'interagir avec l'oxygène. Si les métaux de transition sont chélatés par un ligand faible, tel que l'acétate ou l'ADP (adénosine 5'-diphosphate), le NaCl va empêcher l'interaction entre l'oxygène et les métaux transitionnels. Toutefois, si l'ion métallique est chélaté par un ligand fort tels que le citrate ou EDTA, l'effet du NaCl n'est pas responsable de l'inhibition de l'interaction des ions métalliques (Fe, Cu) avec H_2O_2 et la génération de radicaux hydroxyles à partir d' H_2O_2 .

III.1.4.3 Présence d'émulsifiants en excès dans la phase aqueuse

L'effet de la présence d'émulsifiants en excès dans la phase aqueuse a été mis en évidence par Donnelly *et al.* (1998). Selon ces auteurs, un excès d'isolats de protéines de lactosérum ou de Tween 20 pourrait favoriser l'oxydation des lipides. Solubilisées ou dispersées dans la phase aqueuse sous forme de micelles, ces molécules seraient susceptibles de réagir avec les pro-oxydants présents dans la phase aqueuse. A l'inverse, lorsque les deux types d'émulsifiants, protéines de lactosérum et Tween 20 sont présents simultanément en excès dans la phase aqueuse, il en résulte une inhibition de l'oxydation. Ces auteurs évoquent alors la capacité des surfactants à modifier la structure de la protéine rendant davantage accessible les sites de chélation de métaux, ou de piégeage de radicaux.

Au contraire, Faraji *et al.* (2004) montrent que la présence des protéines sériques dans la phase aqueuse favorise la stabilité des émulsions huile-dans-eau à pH 7, par rapport aux émulsions huile-dans-eau qui ne contenaient de protéines sériques à l'interface. Les auteurs ont expliqué ce phénomène par la capacité de la protéine à chélater les métaux en éloignant les ions pro-oxydants de l'interface de gouttelettes d'huile, ou par le piégeage des radicaux (par exemple la présence dans la protéine des acides aminés comme le tryptophane, méthionine et tyrosine) (Young *et al.*, 2002 ; Faraji *et al.*, 2004). De plus, les propriétés antioxydantes des protéines sériques de la phase aqueuse peuvent être augmentées par le traitement thermique, en facilitant l'exposition des groupes de résidus d'acides aminés responsables de la chélation des métaux (Elias *et al.*, 2007). Le même mécanisme conduisant à inhiber l'oxydation des lipides dans des émulsions huile-dans-eau a été remarqué en présence de micelles de surfactant (Brij) (Cho *et al.*, 2002).

III.1.4.4 Influence de la viscosité et de la présence de glucides

Les polysaccharides sont souvent ajoutés comme agent de texture dans les aliments. Selon différents auteurs, leur addition dans la phase aqueuse d'une émulsion limiterait l'oxydation. La première hypothèse proposée pour expliquer ces observations serait que l'augmentation de la viscosité entraîne une diminution de la vitesse d'oxydation, en réduisant les probabilités de rencontre entre réactifs et substrats (Coupland & McClements, 1996). Par ailleurs, la diminution de la concentration en oxygène dans la phase aqueuse résultant de l'oxydation des lipides n'est pas compensée par l'apport d'oxygène extérieur car la diffusion des gaz est moins rapide en milieu très visqueux. Ces modes d'action ont été évoqués pour expliquer l'effet inhibiteur de l'addition des protéines et d'oses ou de polysaccharides sur l'oxydation d'émulsions (Matsumura *et al.*, 2003). Toutefois, d'autres travaux privilégient plutôt l'hypothèse de la chélation des métaux par les agents épaississants ou gélifiants (Shimada *et al.*, 1992 ; Sirendi *et al.*, 1998 ; Ker *et al.*, 2005). En effet, certains possèdent des fonctions carboxyliques (pectine, alginate) ou sulfate (carraghénane). Les interactions entre les deux types de biopolymères (protéines et polysaccharides) *via* les groupes fonctionnels de charges opposées peuvent conduire à l'augmentation de la stabilité physique et chimique des émulsions (Dickinson, 1998 ; Jourdain *et al.*, 2008) et piéger des métaux.

L'ajout de saccharose (14, 22 et 31 % en masse) dans la phase aqueuse d'une émulsion d'acide linoléique stabilisée par le Tween 20, diminue l'oxydation de l'acide gras, sans effet de la concentration, malgré son effet sur la viscosité de la phase continue (Ponginebbi, 1999). Ainsi, l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse et la baisse de la mobilité des substrats et produits de la réaction qui devrait en résulter n'est pas la seule explication. D'autres auteurs évoquent des possibilités de rétention des métaux, de piégeage de radicaux libres et de peroxydes. La capacité à piéger des radicaux s'explique par la possibilité de certains polyosides de donner un hydrogène, conduisant ainsi à la formation des radicaux plus stables (Shimada *et al.*, 2002 ; Paraskevopoulou *et al.*, 2007).

IV. Activité des antioxydants dans les milieux lipidiques émulsionnés

Un antioxydant peut être défini comme « toute substance capable de retarder ou ralentir le rancissement, ou l'apparition de saveurs indésirables dues à l'oxydation ». Ainsi, un antioxydant peut augmenter la durée de vie d'un aliment, réduire les pertes en vitamines ou en résidus d'acides gras essentiels. Mais de fortes concentrations pourraient être responsables d'un effet pro-oxydant, comme cela a été démontré pour l' α -tocophérol (Cillard & Cillard, 1980 ; Huang *et al.*, 1994).

Les antioxydants primaires (de type I ; i/ de nombreux phénols : butylhydroxytoluène (BHT), butylhydroxyanisole (BHA), ii/ des acides phénols, acides chlorogénique et rosmarinique etc.) agissent par voie radicalaire et mettent fin à la réaction de propagation en cédant un atome d'hydrogène aux radicaux alkyles, alkoxyles ou peroxyes, en les convertissant en produits plus stables (Réaction 22, Réaction 23 et Réaction 24).



On parle dans ce mode de fonction antioxydant de capture de radicaux. De nombreux phénols, caroténoïdes et certains tocophérols sont des capteurs de radicaux. Ces molécules une fois radicalaires sont stabilisées par résonance. Les antioxydants les plus efficaces sont ceux qui ont les énergies de liaisons les plus faibles au niveau du groupe donneur d'hydrogène. Par exemple, l'efficacité des antioxydants phénoliques est due en particulier à la stabilisation des radicaux phénotypiques par la délocalisation des électrons autour de cycle aromatique, en présence de groupes alkyle ou hydroxyle (Figure 20). Plus il y a de groupes hydroxyles plus les phénols seront efficaces (la stabilité par résonance s'accroît avec le nombre de groupe hydroxyle). L'activité antioxydante des phénols est influencée par de nombreux facteurs comme leur volatilité, la température et le pH, qui peuvent varier pendant le processus de transformation ou de stockage des aliments.

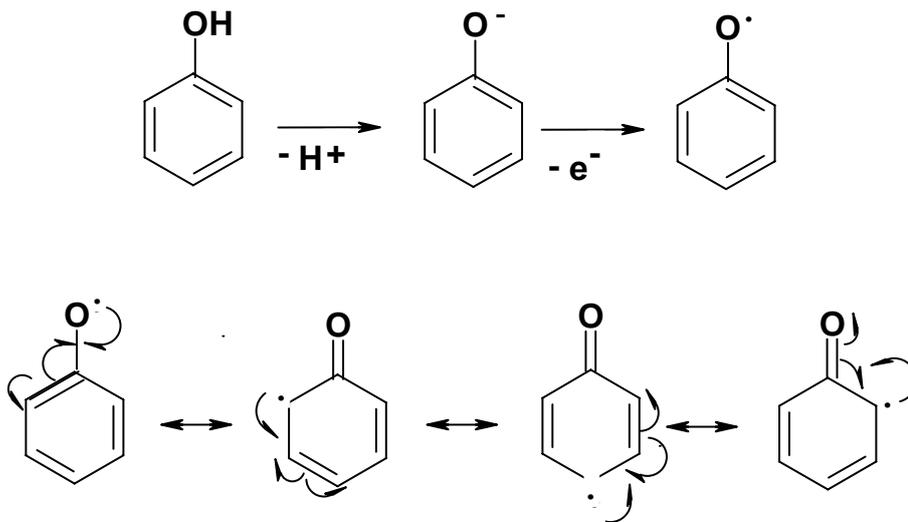


Figure 20 : Mécanisme de transfert d'électron d'un phénol et formes mésomères du radical phénoxy formé (stabilisation par résonance)

Les antioxydants secondaires (de type II ; l'acide phosphorique, l'acide citrique et l'acide ascorbique) préviennent la formation de radicaux libres et peuvent intervenir par différents mécanismes. Certains chélatent les ions métalliques, réduisant l'effet pro-oxydant des ions.

Pour améliorer la biodisponibilité du fer, la supplémentation en acide ascorbique est recommandée.

L'acide ascorbique a une activité antioxydante multifonctionnelle, en agissant comme antioxydant (*in vivo*), ou pro-oxydant (lorsqu'il est exposé dans un milieu où le fer n'est pas complexé), ou comme chélateur de métaux, ou encore comme agent réducteur. L'activité antioxydante de la vitamine C dépend des conditions de la réaction et du substrat radicalaire (Frankel, 1995 ; Almaas *et al.*, 1997).

À pH physiologique, l'acide ascorbique existe prioritairement sous forme d'anion ascorbate ($AscH^-$). L'oxydation de l'anion ascorbate en acide déhydroascorbique, implique un processus réversible avec la formation d'un composé intermédiaire sous forme de radical ascorbyle ($AscH^{\cdot-}$) (Figure 21).

La nature délocalisée de l'électron non apparié dans le radical ascorbyle ($AscH^{\cdot-}$) le rend relativement inactif, et étant totalement réduit, il réagit avec d'autres radicaux libres, ce qui permet de mettre fin à la propagation des réactions des radicaux libres dans le système dans lequel il est impliqué (Bendich *et al.*, 1986).

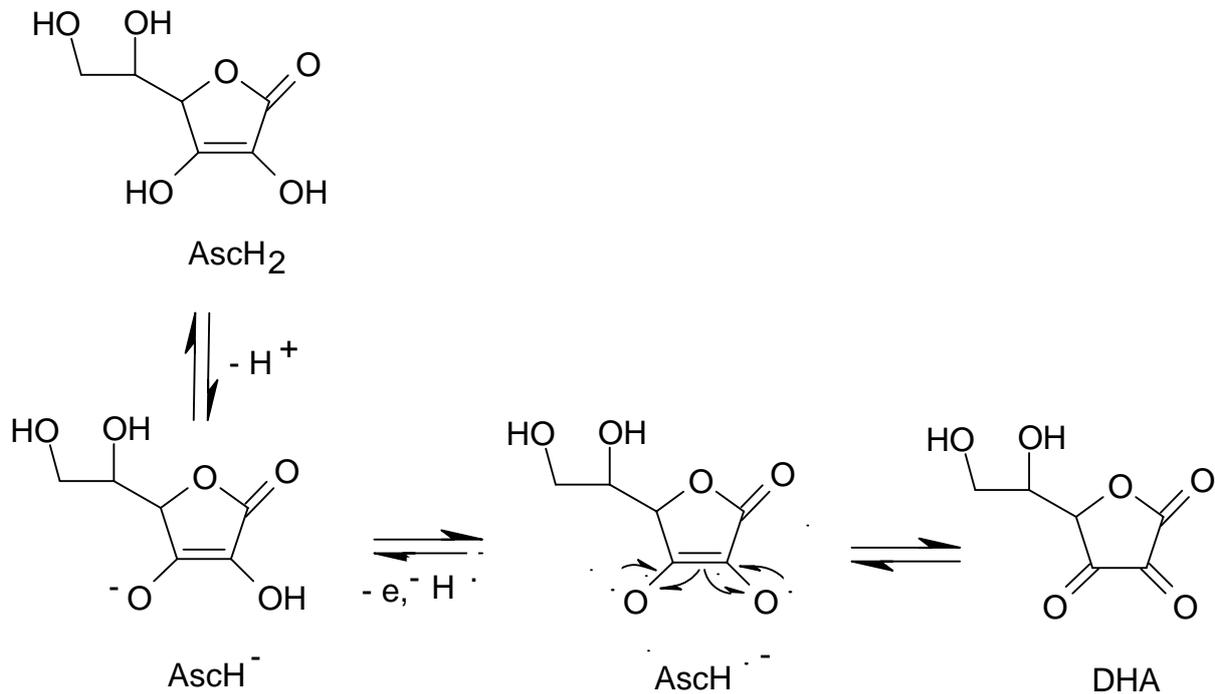
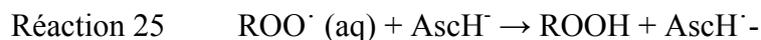


Figure 21 : L'oxydation d'acide ascorbique en acide déhydroascorbique. DHA = acide déhydroascorbique

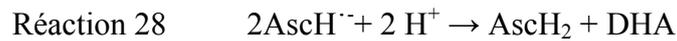
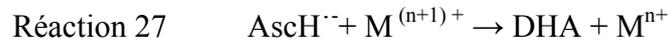
Un autre mécanisme responsable des propriétés antioxydantes de l'acide ascorbique, est sa capacité à former des chélates avec les métaux (Fukuzawa *et al.*, 1993) ou à piéger l'oxygène singlet (Bendich *et al.*, 1986 ; Lee *et al.*, 1997). L'acide ascorbique peut aussi capter des radicaux peroxydes ou des radicaux libres hydrosolubles comme les hydroxyles ou peroxydes (Réaction 25) (Bendich *et al.*, 1986).



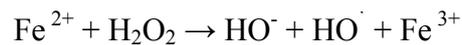
L'effet pro-oxydant de l'acide ascorbique est expliqué par deux faits. Tout d'abord, il possède un pouvoir réducteur des métaux (Fe, Cu, Co), amenant les ions d'un état d'oxydation élevé à un état d'oxydation moins élevé (Réaction 26). L'ion est alors plus réactif dans la décomposition homolytique d'hydroperoxyde. Puis cette décomposition conduit à la formation de radicaux alcoxyles qui sont encore plus réactifs (Réactions 10 et 11).



Le radical ascorbyle ($\text{AscH}^{\cdot-}$) intermédiaire va réduire à son tour un autre ion ferrique (Réaction 27). La réaction peut ainsi conduire à la formation de l'acide ascorbique et déhydroascorbique (Réaction 28).



Le peroxyde d'hydrogène est également produit lors de l'oxydation de la vitamine C en présence d'oxygène (Réaction 29) : la présence de peroxyde d'hydrogène est à la base de la réaction Fenton (Réaction 11).



Le pouvoir pro-oxydant ou antioxydant de l'acide ascorbique dépend de sa concentration. D'après Decker & Xu, (1998), l'acide ascorbique à des concentrations supérieures à 0,5 % possède un effet anti-oxydant tandis qu'il possède un effet pro-oxydant à plus faible concentration : 0,02-0,03 %. Des résultats contradictoires ont été obtenus par Almaas *et al.* (1997).

Une autre caractéristique cruciale dans l'activité des antioxydants, est la solubilité de ces composés. Elle est très différente quand les antioxydants sont utilisés dans une phase lipidique continue ou dans un milieu dispersé (Huang *et al.*, 1996b). Dans une phase lipidique continue, un antioxydant hydrophile (ex. trolox ou acide ascorbique) est généralement plus efficace qu'un antioxydant lipophile (ex. α -tocophérol ou palmitate ascorbyl), alors que dans les systèmes émulsionnés, l'inverse est observé (Frankel *et al.*, 1994 ; McClements & Decker, 2000). Cette différence d'activité des antioxydants en fonction de la nature des systèmes dans lesquels ils agissent, se nomme *le paradoxe polaire de Porter* (Porter, 1993). Il s'explique par leur répartition et leur affinité pour l'interface air-huile et l'interface huile-eau au sein de ces systèmes.

Cependant, le paradoxe polaire de Porter ne prend pas en compte l'influence du type et de la quantité de l'émulsifiant présent aux côtés des antioxydants. Les tensioactifs peuvent modifier

drastiquement la distribution des espèces. En effet, la charge électrique des antioxydants et de l'interface est un paramètre d'importance cruciale pour la distribution de l'antioxydant dans l'émulsion. En conséquence, son efficacité pour inhiber l'oxydation lipidique varie avec sa capacité à accéder à l'interface qui est contrôlée par les tensioactifs. Un exemple de ce type d'interaction a été montré par Mei *et al.* (1999). Dans leur système, la vitesse d'oxydation lipidique des émulsions de type huile de saumon-eau stabilisées par un émulsifiant anionique (dodécylsulfate de sodium, (SDS)) ou non ionique (Brij 35), a été mesurée afin de déterminer l'influence de l'addition d'un antioxydant chargé négativement (acide gallique), non chargé (gallate de méthyle) et chargé positivement (gallamide). A pH 7, l'ordre d'efficacité des antioxydants (capacité à inhiber l'oxydation lipidique), avec une interface chargée négativement est le suivant : gallamide > gallate de méthyle > acide gallique. Cela suggère que les antioxydants qui sont attirés à l'interface de l'émulsion par des forces électrostatiques sont plus efficaces pour inhiber l'oxydation lipidique que ceux qui n'y ont pas accès facilement.

L'antioxydant non chargé a été quant à lui également efficace compte tenu de sa faible solubilité dans l'eau. En effet, cela l'a probablement conduit à se concentrer dans la phase grasse. A pH 3, dans un système stabilisé avec le SDS, l'ordre d'efficacité est en revanche : gallate de méthyle > acide gallique > gallamide. La raison la plus probable de ce comportement est que la solubilité du Fe^{3+} dans l'eau est plus élevée à pH bas et par conséquent, l'antioxydant est capable de régénérer le fer dans sa forme la plus active (Fe^{3+} vers Fe^{2+}). En outre, à ce pH, il y a une quantité suffisante de Fe^{3+} et de gallamide à l'interface pour que la régénération décrite précédemment puisse avoir lieu justement à l'interface. L'efficacité des antioxydants dans un système où l'interface est non chargée se produit selon l'ordre : gallate de méthyle > gallamide > acide gallique. Dans ce dernier cas, l'antioxydant non chargé s'avère le plus performant probablement parce qu'il est principalement situé dans la phase lipidique.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I. Matières premières

I.1 La phase lipidique

L'huile de tournesol et l'huile de colza, de qualité alimentaire, sont utilisées au cours de l'étude. Elles proviennent d'un distributeur local (Carrefour, France). A chaque nouvelle expérimentation, une bouteille neuve d'huile était utilisée. Lorsque plusieurs bouteilles étaient nécessaires, celles-ci provenaient du même lot (même date et même heure de conditionnement). Différents lots d'huile ont été utilisés au cours de ce travail.

L'huile de tournesol, relativement stable à la peroxydation, a été choisie pour l'étude concernant l'analyse des propriétés interfaciales des protéines observées par tensiométrie à goutte. Pour l'analyse de la cinétique d'oxydation (produits primaires et secondaires) et les études de zétamétrie, granulométrie, et indice de crémage, l'huile de colza a été préférée en raison de sa facilité à se peroxyder.

I.1.1 Huile de tournesol

L'huile de tournesol possède une composition relativement simple en résidus d'acide gras. Selon les informations fournies par le distributeur, l'huile de tournesol contient 11 % (m/m) de résidus d'acide saturés, 44 % (m/m) d'acide gras monoinsaturés et 45 % (m/m) d'acide gras polyinsaturés, et une teneur en vitamine E (tocophérols) de 0,09 % (m/m).

Avant toute utilisation, l'huile a été purifiée par passage sur colonne de verre remplie de silicate de magnésium (Florisil®). Ceci a permis d'éliminer une grande partie des substances tensioactives qui peuvent être présentes dans l'huile (mono- et di-acyl glycérides, acides gras). La purification permet également d'éliminer les tocophérols, antioxydants naturels de l'huile. Cette méthode de purification (50 g d'huile pour 2 g de silicate de magnésium) est inspirée de la méthode de Gaonkar, (1989). L'huile purifiée est ensuite conservée dans un flacon hermétique, à l'abri de la lumière et à une température de + 4 C° pendant 7 jours.

I.1.2 Huile de colza

L'huile de colza a été choisie pour l'étude car elle présente l'avantage de posséder de nombreux triglycérides polyinsaturés, susceptibles d'être aisément oxydés. L'hydrolysate de cette huile présente le profil en acides gras : 7,5 % (m/m) d'acide gras saturés, 63 % d'acide gras monoinsaturés, dont 58 % d'acide oléique et 32 % d'acides gras polyinsaturés, dont 23 % d'acide linoléique (ω -6) et 9 % d'acide alpha linoléique (ω -3), ainsi que 0,001 g de Na pour 100 g d'huile. Cette huile est connue pour son intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

I.2 Les protéines laitières

Pour l'ensemble des expérimentations, 2 types d'émulsifiants protéiques ont été utilisés : le caséinate de sodium et la β -lactoglobuline.

I.2.1 Le caséinate de sodium

Description succincte du caséinate de sodium ; rappels bibliographiques

Les caséines représentent la majeure partie des protéines du lait puisqu'elles composent 80 % (m/m) des protéines totales. Il existe 4 caséines : α_{s1} -CN (10 g.L⁻¹), β -CN (9,3 g.L⁻¹), κ -CN (3,3 g.L⁻¹), α_{s2} -CN (2,6 g.L⁻¹). La caséine γ -CN (0,8 g.L⁻¹) résulte de l'hydrolyse de la caséine β -CN par la plasmine (Cayot & Lorient, 1998c). Dans le lait de vache, les caséines sont associées pour former un ensemble supramacromoléculaire maintenu grâce à une partie minérale (essentiellement phosphate de calcium), et connu sous le nom de *micelles de caséine*. Néanmoins, il existe une petite quantité (environ 5 %) de caséines solubles, en équilibre avec la forme micellaire. Les micelles de caséine sont des particules colloïdales quasi-sphériques, pouvant renfermer jusqu'à 1000 molécules de caséine. Dans le lait il y a environ 34 mmol.L⁻¹ de calcium dont 24 mmol.L⁻¹ appartiennent aux micelles.

Les caséines sont des protéines dont la structure est relativement peu ordonnée, et qui possèdent une faible masse moléculaire. Les micelles sont de dimension variable (diamètre compris entre 30 et 600 nm) selon l'espèce animale, l'état physiologique et le degré de maturation du lait. Elles ont la particularité d'être riches en résidus phosphoséryls impliqués

dans les mécanismes de chélation des métaux, ce qui leur confère parfois des propriétés antioxydantes. Elles sont également riches en résidus chargés, lysyls et glutamyls.

La cohésion des diverses molécules de caséines au sein de micelle est assurée par différents type d'interaction faisant intervenir notamment des ponts phosphocalciques, des liaisons ioniques, hydrogène et des interactions hydrophobes. Le Tableau 5 présente les principales caractéristiques des différents types de caséines. Les valeurs diffèrent selon les variantes et les sources bibliographiques (Gaucheron, 2004b). Les caséines, en raison de leur structure macromoléculaire très particulière sont facilement séparées par centrifugation ou par précipitation isoélectrique à pH 4,6. Après filtration puis neutralisation de la caséine acide, le caséinate de sodium, de calcium, ou autre, est obtenu selon que la neutralisation ait été réalisée par l'hydroxyde de sodium, de calcium, ou autre base.

Tableau 5 : Principales caractéristiques des caséines du lait de vache (Cayot & Lorient, 1998c) ; pI : point isoélectrique

Caséine	pI	MM (Da)	N (Raa*)	Pser	Cys**	Lys	Glu	Asp
α_{s1-CN}	4,94 à 4,97	22068 à 23614	199	8 à 9	0	14	24	7
α_{s2-CN}	5,19 à 5,39	25150 à 25400	207	10 à 13	2	24	25	4
β	5,19 à 5,30	≈ 24000	209	5	0	11	18	4
κ	5,37 à 5,43	19023	169	1 à 3	2	9	12	4

* Résidus d'acides aminés ; **Les résidus cystéyl sont sous forme disulfure.

Parmi les différents caséinates, le caséinate de sodium est particulièrement utilisé par l'industrie agroalimentaire, notamment pour ses propriétés émulsifiantes et liantes qui permettent une tenue des produits à chaud comme à froid (charcuteries de viande et poisson, sauces, pâtes fines, farces, etc.).

Caractérisation physico-chimique des caséinates utilisés dans l'étude

Le caséinate de sodium utilisé pour cette étude, fourni par la société Armor Protéines (France) et produit par précipitation, a une pureté protéique de 92,7 % m/m (données fournisseur).

Sa répartition en caséines est semblable à celle du lait (Tableau 5). La matière sèche est de $92,9 \% \pm 0,5$. Nos travaux préliminaires de caractérisation de cette protéine à l'aide de la spectroscopie d'absorption atomique (SAA) nous ont permis de déterminer la composition en minéraux: fer (5 mg.kg^{-1}), calcium (14 mg.kg^{-1}) et sodium (33 mg.kg^{-1}). Des traces de protéines de lactosérum ($7,3 \% \text{ (m/m)}$) ont été révélées par technique électrophorétique.

1.2.2 La β -lactoglobuline

Description succincte de la β -lactoglobuline ; rappels bibliographiques

La β -lactoglobuline est la protéine globulaire la plus abondante du lait et la protéine majoritaire du lactosérum, avec une concentration moyenne comprise entre 2 et 4 g.L^{-1} . Elle peut être isolée à partir du lactosérum par plusieurs méthodes. La stabilité de la β -lactoglobuline à faible pH ($< 4,0$) est souvent utilisée pour l'isoler du lactosérum. La détermination de la composition et de la séquence de résidus d'acides aminés, ainsi que des expériences d'isoélectro-focalisation ont permis de mettre en évidence l'existence de polymorphes génétiques de la protéine (Eigel *et al.*, 1984). Le polymorphisme génétique est une caractéristique de la β -lactoglobuline bovine et 7 variantes différentes (forme A, B, C, D, E, F et G) ont été identifiées, les plus abondantes étant les formes A et B. Toutes les variantes de la β -lactoglobuline possèdent 162 résidus d'acides aminés. Cependant, chaque variant peut différer de 1 à 4 résidus aminoacyles, généralement causé par des mutations de bases simples dans le gène codant pour cette protéine (Eigel *et al.*, 1984). La masse moléculaire de la β -lactoglobuline se situe autour 18 300 Da (Cayot & Lorient, 1998c). Le Tableau 6 présente les principales caractéristiques de deux formes génétiques les plus abondantes A et B.

Tableau 6 : Principales caractéristiques des variantes génétiques A et B de la β -lactoglobuline du lait de vache (Cayot & Lorient, 1998c)

BLG	pI	MM (Da)	N (Raa*)	Pser	Cys**	Lys	Glu	Asp
A	5,13	18363	162	0	5	15	16	11
B	5,13	18277	162	0	5	15	16	10

*Résidus d'acides aminés ; **Les résidus résidus cystéyls sont sous forme disulfure (2x2) et sulfhydryle (1).

Bien que les formes A et B ne diffèrent que par 2 résidus (Tableau 6), la substitution d'un résidu glycyle par un résidu aspartyle en position 64 dans la forme A est non négligeable car

cela accroît la possibilité d'un pont salin supplémentaire entre le groupe carboxylique des résidus aspartyles et un autre groupe basique de l'unité monomérique. Cette substitution particulière augmente les possibilités d'association des monomères du variant A par rapport au variant B (Pessen *et al.*, 1985).

Caractérisation physico-chimique de la β -lactoglobuline utilisée durant l'étude

Pour notre étude, la β -lactoglobuline est purifiée au laboratoire selon la méthode de Fox *et al.* (1967) à partir d'une poudre de lactosérum contenant 72 % (m/m) de β -lactoglobuline (32,8 % m/m B et 39,2 % A) (BIPRO, Davisco). La poudre ainsi obtenue est ensuite suspendue dans de l'eau ultra pure (73,5 g.L⁻¹). L'ajout d'acide trichloracétique à 31 g.L⁻¹ provoque la précipitation des autres protéines contenues dans la poudre initiale (immunoglobuline, α -lactalbumine, bovine sérumalbumine). Cette solution est centrifugée à 10 000 g pendant 30 min (centrifugeuse Sorvall[®] RC6 PLUS). Le surnageant contenant la β -lactoglobuline est placé dans des membranes de dialyse (seuil de coupure de 3500 Da) et la dialyse est réalisée en plusieurs étapes : i/ 3 dialyses d'une durée de 2 h chacune contre de l'eau distillée, puis ii/ 3 dialyses d'une durée de 2 h chacune contre du tampon acétate/imidazole 0,1 M à pH 6,5 ou pH 3,5.

La protéine dialysée est finalement récupérée et de l'azoture de sodium (0,02 % m/v), agent antimicrobien, est ajouté à la dispersion. La protéine se conserve à + 4 °C pendant 7 jours. La purification de la β -lactoglobuline est très fiable, et peu coûteuse (Loupiac *et al.*, 2006). Sa concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (JASCO V-530) à la longueur d'onde de 278 nm. Le coefficient d'extinction molaire de la protéine étant $\varepsilon = 17\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, la concentration est déterminée grâce à la loi de Beer-Lambert. La nature de l'ensemble des variants génétiques n'a pas été analysée.

I.2.3 Préparations des solutions aqueuses de protéines laitières

Le caséinate de sodium, ou la β -lactoglobuline, est dispersé dans une phase aqueuse (eau ultrapure, Millipore 15 M Ω) à la concentration finale de 0,86 mM. Pour éviter tout développement microbien, l'azoture de sodium (0,4 g.L⁻¹) est ajouté à la phase aqueuse. La suspension protéique est agitée 12 h à + 4 °C de sorte à assurer la complète dispersion des protéines.

Le pH de ces solutions est ensuite ajusté à pH 2, pH 3,5 ou pH 6,5. Ces valeurs de pH sont choisies afin de se situer dans les conditions de pH de l'estomac (pH 2) ou de conditions le plus souvent rencontrées dans des produits alimentaires. Le pH 6,5 est proche de celui du lait (6,7). Les valeurs de pH sont ajustées par ajout de HCl (1 M) ou NaOH (2 M).

I.3 Les sels de fer

Les sels (ou chélate) de fer utilisés sont :

1/ le sulfate de fer II (sel de Mohr, $\text{FeSO}_4 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (Prolabo, France) ;

2/ le bisglycinate de fer (Fe-BIS); Ferrochel® (60 % m/m biglycinate de fer, 33,5 % acide citrique, 4 % eau, 2 % maltodextrine, 0,5 % dioxyde de silicium, Ideactiv, France) ;

3/ l'éthylènediamine-tétracétate de sodium de fer (NaFe-EDTA) (Sigma Aldrich, France).

Les sels/chélates de fer sont dissous dans l'eau ultrapure barbotée avec de l'azote gazeux (agitation 20 min/20°C), puis immédiatement ajoutés dans la phase aqueuse protéique, de sorte que le ratio [protéines laitières/sels de fer] = 23/1 et 9/2, ce qui correspond à une teneur en sels de fer de respectivement 0,36 mM (0,86 mM suspension protéique) et 1,78 mM (0,86 mM suspension protéique).

II. Préparation de l'émulsion

L'émulsion est fabriquée à partir d'huile de tournesol et/ou de colza (30 %, v/v) et de la solution aqueuse protéique (70 %, v/v) contenant différentes quantités de sels de fer. Les quantités d'huile et de solution aqueuse protéique sont prélevées par pesée en tenant compte de la densité de l'huile (0,925) et de la phase aqueuse ($\approx 1,000$). L'émulsification est réalisée en 2 étapes :

- **1^{ère} étape** : les deux phases aqueuses et lipidiques, sont pré-émulsionnées 3 fois à 21 000 tr/min pendant 1 min avec un repos de 10 min entre les homogénéisations à l'aide d'un mélangeur haute vitesse Polytron 3100 (Kinematica, Allemagne), équipée d'une tête de 12 mm de diamètre.

- **2^{ème} étape** : l'obtention de l'émulsion finale se fait en homogénéisant la pré-émulsion à l'aide d'un homogénéisateur à pompe haute pression (N° 918486, Stansted, Sodexim S. A., Angleterre). Les émulsions sont obtenues après 4 passages à l'homogénéisateur à une pression de 35 MPa. Ce mode de fabrication conduit à des distributions de taille de gouttelettes très étroites, avec un diamètre moyen ($d_{3,2}$) de l'ordre de 1 à 3 μm (déterminé par granulomètre laser ; voir chapitre II.2.) Pour chaque formulation d'émulsion (pH, émulsifiant, présence des sels/chélates du fer), trois émulsions ont été préparées indépendamment, afin de réaliser trois répétitions vraies pour chaque type de condition.

II.1 Conditions de vieillissement oxydatif des émulsions

Pour suivre la cinétique d'oxydation des émulsions au cours du temps, celles-ci sont incubées à 30 °C durant 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 jours, immédiatement après obtention. La température de 30 °C a été choisie de sorte à maintenir l'intégrité physique des émulsions. Les émulsions (4 mL) sont réparties dans des tubes de 7 mL fermés hermétiquement contenant un espace de tête de 0,5 mL (air). Les tubes sont ensuite placés dans l'étuve, à l'obscurité, pour éviter le phénomène de photo-oxydation, pour toute la durée de suivi de peroxydation.

II.2 Caractérisation des émulsions : méthodes d'analyses physico-chimiques

II.2.1 Mesure du pH

Le pH des émulsions est mesuré au cours du temps à l'aide d'un pH-mètre (MetroLab, PHM210, France) équipé d'une électrode adaptée aux mesures dans les milieux complexes, dispersés et partiellement non aqueux (électrode de pH HI 1131B ; corps verre).

II.2.2 Détermination de la taille des gouttelettes d'huile

Objectif

La taille des gouttes d'huiles constitutives des émulsions est mesurée par granulométrie à laser (Malvern Mastersizer Hydro 2000 SM, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, U.K.). La taille des gouttelettes d'huile et la structure physique d'une émulsion sont susceptibles d'influencer la stabilité physique et la cinétique d'oxydation (Coupland & McClements, 1996) ce qui rend cette mesure indispensable pour un bon contrôle des effets peroxydants du fer. La

distribution de taille des gouttelettes d'huile est mesurée en fonction de la quantité et du type de sel du fer pour les deux types de protéines laitières utilisées dans les émulsions.

Principe

La granulométrie laser repose sur la mesure de l'intensité de diffraction d'un rayonnement incident par les particules de matière grasse présentes au sein de l'échantillon. Un faisceau laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$ de 18 mm de diamètre) pénètre dans l'échantillon circulant et l'angle de diffraction des particules qui dévient la lumière lors de leur passage en face du rayon lumineux est ainsi détecté (Figure 22). Le rayon lumineux rencontrant une particule peut effectivement être absorbé, diffusé ou transmis. Comme les particules restent totalement opaques à la température d'analyse ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), la lumière ne les traverse pas. Le cas particulier du phénomène de diffusion de la lumière (dispersion dans toutes les directions de l'espace liée à la rencontre de l'obstacle, et décrite par la théorie de Mie) étant évité, la théorie de Fraunhofer de diffraction de la lumière s'applique si la dimension des particules excède la longueur d'onde utilisée ($> 1 \text{ }\mu\text{m}$).

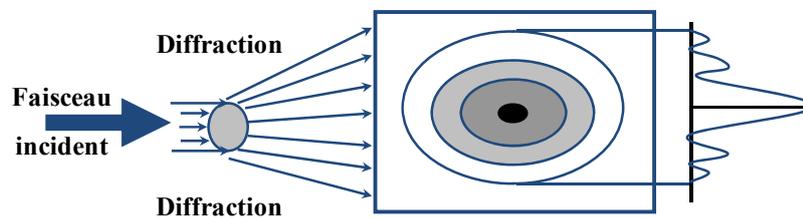


Figure de diffraction

Figure 22 : Schéma de principe de la granulométrie laser

Le principe de Fraunhofer s'applique donc pour l'ensemble des mesures en vue de convertir le profil angulaire en dimension de particules, en supprimant la nécessité d'introduire l'indice de réfraction de la phase dispersée. L'angle de diffraction dépend à la fois de la grandeur des particules, de leur forme et de la longueur d'onde de la lumière incidente. Il est inversement proportionnel à la dimension des particules. Le diamètre des particules se trouve ainsi déterminé suivant l'hypothèse de particules sphériques. L'intensité du rayonnement diffracté est une fonction du rayon de la particule, l'angle de diffraction étant d'autant plus grand que les particules sont plus petites. L'analyse des particules dans leur ensemble fournit la distribution de leurs dimensions, avec le nombre de particules de chaque grandeur, par la

mesure d'un « diamètre équivalent de diffraction ». De plus, ce type d'analyse permet d'obtenir une distribution mathématique de la dimension des particules à partir de laquelle un diamètre moyen peut être déduit.

Les analyses ont été réalisées avec un granulomètre laser Mastersizer 2000 SM (Malvern Instrument Ltd, Wo, France) utilisé en voie liquide et équipé d'une cuve échantillonneur pouvant contenir 100 mL de dispersant (tampon imidazole/acétate à pH : 3,5 et 6,5) et d'une interface reliée à un microordinateur. L'optique du système doit être parfaitement propre avant de débiter une mesure ainsi que la cuve échantillonneur. Quelques gouttes d'émulsion sont introduites dans la cuve échantillonneur jusqu'à atteindre un obscurcissement compris entre 10 et 12 %. Une agitation est maintenue (20 rpm) dans la cuve durant la mesure.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

Les résultats sont présentés généralement sous forme d'histogrammes, la proportion relative exprimée en fréquence des différentes classes de dimensions de la population. L'instrumentation utilisée autorise des mesures allant de 0,1 à 2000 μm . Trois déterminations ont été réalisées et moyennées pour chaque échantillon. De cette distribution, deux moyennes sont calculées : le diamètre moyen en surface ($d_{3,2}$ ou diamètre Sauter) et le diamètre moyen en volume ($d_{4,3}$ ou diamètre de Brouckere), (Équation 2 et Équation 3) :

$$\text{Équation 2} \quad d_{3,2} = \frac{\sum nidi^3}{\sum nidi^2}$$

$$\text{Équation 3} \quad d_{4,3} = \frac{\sum nidi^4}{\sum nidi^3}$$

Le $d_{3,2}$ représente la « finesse » de l'émulsion en termes de rapport de surface. Il correspond au diamètre équivalent-surface projeté de la sphère théorique se comportant de la même manière que la particule considérée. Quant au diamètre moyen $d_{4,3}$, il exprime le diamètre équivalent-volume, caractéristique du volume équivalent des particules supposées sphériques (Rawle, 2002). La répétabilité se révèle de l'ordre de $\pm 1\%$ lorsque le même échantillon subit l'analyse plusieurs fois. La reproductibilité de fabrication des émulsions, associée aux effets du type de sel/chélate du fer et de la protéine, ainsi que du pH, est vérifiée par l'analyse de trois échantillons issus de deux lots de fabrications différentes.

II.2.3 Mesure de degré de peroxydation des lipides

Dans de nombreux aliments transformés (produits laitiers, charcuterie, pâtés et mousses, mayonnaises, sauces, soupes, ...), la fraction triglycéridique est sous forme de gouttelettes dispersées dans une phase aqueuse. Comme nous l'avons déjà dit les émulsions huile-dans-eau constituent donc un modèle représentatif de nombreux produits alimentaires.

L'oxydation des lipides dans les milieux émulsionnés met en jeu globalement les mêmes réactions que celles qui se produisent quand les lipides constituent une seule phase continue. Mais, au sein d'une émulsion, outre la possibilité d'intervention d'autres réactions mettant en jeu les constituants non lipidiques, le déroulement de l'oxydation des lipides *stricto sensu* est largement influencée par de nombreux paramètres liés à la composition de la phase dispersante (aqueuse) et à l'organisation macro et microscopique du système (voir la revue bibliographique, § III. 1.2, III. 1.3, III. 1.4).

Lors des études de cinétique d'oxydation des lipides, l'état d'avancement de la réaction peut être évalué par la mise en évidence de la disparition des substrats de l'oxydation. Afin de déterminer l'état d'oxydation d'un aliment, il est nécessaire de mesurer simultanément les quantités des produits primaires et secondaires résultant de l'oxydation des lipides. Une grande variété de méthodes est disponible en fonction de l'information et de la précision recherchées et du substrat étudié (Dobarganes & Velasco, 2002).

Les techniques de dosage choisies pour l'étude de l'oxydation de nos systèmes émulsionnés sont :

- i/ l'indice de peroxyde qui permet de déterminer les produits primaires de la réaction d'oxydation des lipides,
- ii/ le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) (AFSSA., 2005 ; Laguerre *et al.*, 2007).

II.2.3.1 Produits primaires de la réaction d'oxydation des lipides : l'Indice de peroxyde

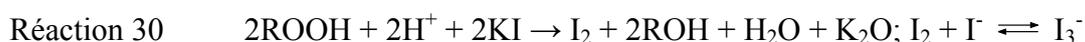
Objectif

Rappelons que la formation des peroxydes (ROO[·]) affecte la valeur nutritionnelle des huiles, corps gras ou lipides alimentaires car les résidus d'acides gras essentiels (polyinsaturés) sont alors partiellement détruits. Les peroxydes sont des produits intermédiaires instables qui sont rapidement dégradés pour donner des composés hydroxylés (ROH) et carbonylés (R-C=O). Dans la mesure où quasiment tous les lipides contiennent des traces de peroxydes, les études d'oxydation sur les lipides dans les systèmes colloïdaux suggèrent que, pendant l'étape de propagation, il existerait une action réciproque entre les peroxydes lipidique (ROOH) trouvés à proximité de la surface des gouttelettes de lipide et les métaux de transition présents dans la phase aqueuse. Ce serait même la cause la plus commune d'instabilité oxydative (Frankel, 1998a ; Mei *et al.*, 1998b). Il est donc crucial de doser les peroxydes pour notre étude sur le fer.

Les concentrations en peroxydes peuvent être déterminées à l'aide de nombreuses méthodes, à adapter en fonction du substrat étudié. Les méthodes les plus utilisées pour déterminer les teneurs en peroxydes sont les méthodes iodométriques et colorimétriques. Dans notre cas, la cinétique d'oxydation suivi par le dosage des produits primaires (H₂O₂ ; ROOH) a été réalisée à l'aide de l'iodométrie (technique nommée parfois d'indice de peroxyde).

Principe

La détermination de l'indice de peroxyde est basée sur la réduction des hydroperoxydes (ROOH) provoque l'oxydation de l'iodure (I⁻) en di-ode (I₂). Le di-iode formé par oxydation réagit avec I⁻ en excès pour former I₃⁻. I₃⁻ (ion iodine) est titré par une solution de sodium thiosulfate normalisé (Na₂S₂O₃) (Réaction 30 et Réaction 31). La quantité formée de di-iode est proportionnelle à celle des peroxydes présents au départ (Shahidi & Wanasundara 1998).



Le point d'équivalence est visualisé par la disparition de la couleur bleu-violette du complexe d'inclusion de I_3^- dans l'hélice d'amylose de l'amidon, alors utilisé comme indicateur coloré. La réaction de dosage concerne des composés moléculaires solubles dans les solvants organiques (les hydroperoxydes) et l'iodure soluble dans l'eau. La réaction se fait donc en milieu hétérogène. Le solvant de la matière grasse est un mélange de chloroforme (non-miscible dans l'eau) et d'acide acétique (miscible dans l'eau). Cependant, cette méthode est délicate, d'une part, car l'iode libéré peut se fixer sur les doubles liaisons des acides gras ou résidus d'acide gras insaturés, entraînant une surestimation de l'indice de peroxyde. D'autre part, l'oxygène du milieu peut réagir avec l'iodure et produire de l'iode (I_2 métal), générant une surestimation. Cependant, beaucoup de ces désavantages ont été pris en considération d'après la méthode AOCS («American Oils Chemists' Society'») Cd-8-53 (Rossel, 1994).

L'indice de peroxyde est une méthode très largement utilisée pour la détermination de l'oxydation lipidique. Elle permet une bonne corrélation entre l'indice obtenu et les qualités sensorielles d'un grand nombre des huiles végétales (Frankel, 1993). Toutefois, il est recommandé d'utiliser des méthodes analytiques complémentaires (Coupland & McClements, 1996).

Mode opératoire

L'indice de peroxyde des émulsions stabilisées par le caséinate de sodium et/ou la β -lactoglobuline en présence de sel/chélates de fer a été déterminé, selon la méthode Cd-8-35 d'après l'AOCS (Nielsen, 1994).

L'émulsion (2 g) est dispersée dans 25 mL de chloroforme/acide acétique (2:3, v/v), et le mélange est maintenu sous agitation. 3 mL d'une solution aqueuse saturée en iodure de potassium (KI) est ensuite ajoutée. Le mélange est agité 1 min, puis placé à l'obscurité pendant 5 min. Le di-iode formé est titré avec une solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) 0,0005 N (dosage en retour avec empois d'amidon (1 %) utilisé comme indicateur coloré, jusqu'à la disparition complète de la couleur bleu-violette). Un essai blanc a été conduit à chaque fois.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

L'indice de peroxyde (PV = peroxide value) est exprimé en mmol (peroxyde).kg⁻¹ d'émulsion, et calculé comme suit (Équation 4) :

$$\text{Équation 4} \quad PV = \frac{(V_{ech} - V_b) \times N(Na_2S_2O_3) \times 1000}{m_{ech}}$$

avec :

V_{ech} , volume de thiosulfate 0,0005 N utilisé pour titrer l'échantillon à analyser

V_b , volume de thiosulfate 0,0005 N utilisé pour titrer l'essai à blanc

m_{ech} , la masse d'échantillon prélevée (g)

La reproductibilité de la mesure de l'indice de peroxyde, associée aux effets de type de sel/chélate du fer, et de la protéine, et du pH, est vérifiée par l'analyse de trois échantillons issus de deux lots de fabrications différentes. Les résultats énoncés correspondent à la moyenne de ces six déterminations.

II.2.3.2 Formation de produits secondaires par décomposition des peroxydes : Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA)

Objectif

Les peroxydes sont des composés qui n'ont ni goût, ni odeur (Belitz *et al.*, 2004) , et qui, par conséquent, n'affectent pas les qualités olfactives et gustatives des aliments. En revanche, ils se décomposent en composés secondaires en présence de traces de métaux ou sous l'effet de la chaleur. Les composés secondaires volatils qui sont alors produits sont responsables des dégradations de l'odeur des aliments oxydés (Frankel, 1985).

La méthode de dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique est la méthode la plus couramment utilisée pour le dosage des composés secondaires de l'oxydation des lipides, notamment pour les huiles contenant des acides gras polyinsaturés. La méthode utilisée pour notre étude est adaptée des travaux de McDonald & Hultin (1987).

Principe

Le test à l'acide 2-thiobarbiturique repose sur la formation d'un complexe coloré rose résultant de la réaction entre une molécule d'aldéhyde (en première simplification le malonaldéhyde issu de la décomposition d'hydroperoxyde de résidu d'acide gras polyinsaturé) et deux molécules d'acide 2-thiobarbiturique (Figure 23). Le complexe coloré formé absorbe à 532-535 nm. Des aldéhydes tels que le 4-hydroxy-alcénal, le 2,4-alcadiénal, le 2-alcénal réagissent également avec l'acide 2-thiobarbiturique pour former un complexe coloré (Sun *et al.*, 2001).

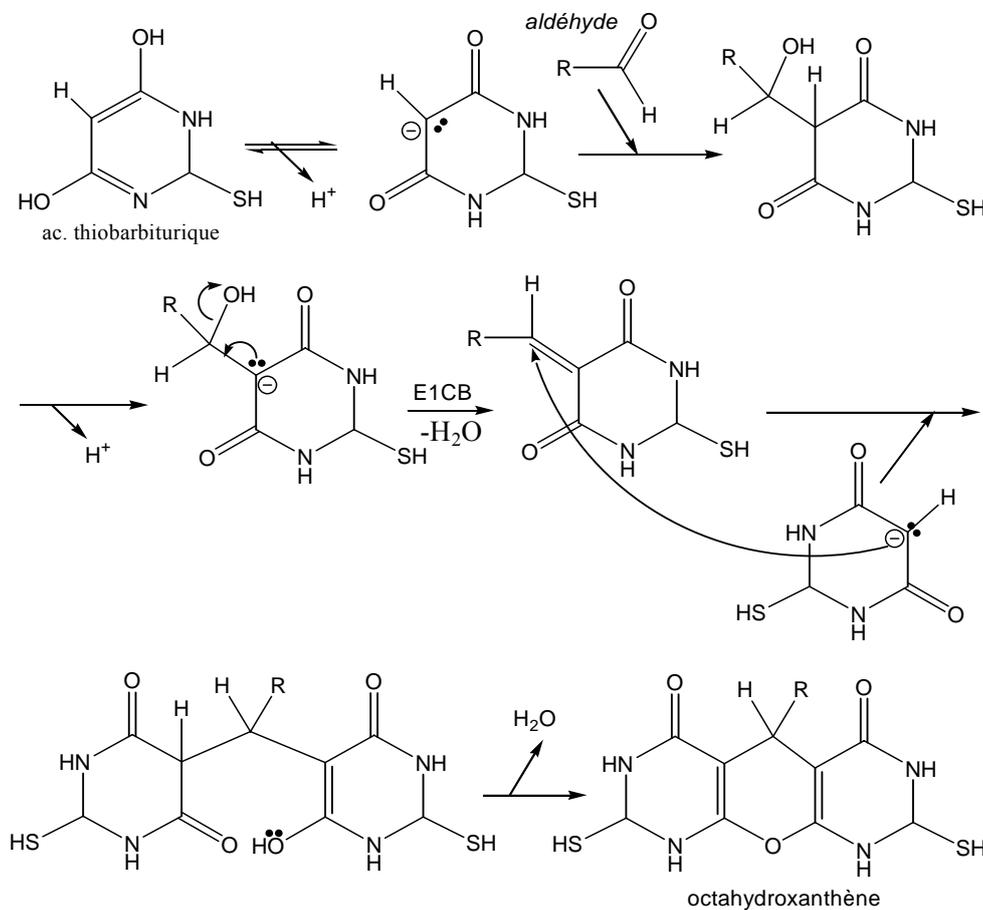


Figure 23 : Produits de la réaction entre un aldéhyde et l'acide thiobarbiturique (E1cB-élimination unimoléculaire par base conjuguée) (Bors & Buettner, 1997)

C'est la raison pour laquelle le terme de « substances réactives à l'acide thiobarbiturique » (sr-TBA) est employé. La réaction du TBA est réalisée en milieu acide (pH 1-2) et à haute température (70 à 100 °C) pour accélérer la vitesse de réaction et augmenter la sensibilité. La concentration en substances réactives au TBA (sr-TBA), exprimée en $mmol.kg^{-1}$ d'émulsion,

est évaluée par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre visible des sr-TBA extraites des échantillons par l'acide trichloracétique (TCA).

Mode opératoire

Les substances réactives au TBA (sr-TBA) ont été déterminées en mélangeant 0,3 mL de l'émulsion à doser et 2,0 mL d'agent TBA [15 % (m/v) d'acide trichloroacétique (TCA), 0,375 % d'acide thiobarbiturique, 0,1 % d'éthylenediamine-tétraacétate et 0,1 % n-gallate de propyl dans 0,25 M HCl] dans des tubes à essai. Les tubes sont ensuite chauffés au bain-marie à 100 °C, pendant 15 min puis immédiatement placés à température ambiante pendant 20 min. Ils sont ensuite centrifugés à 1000 g pendant 15 min, à température ambiante. Le surnageant est prélevé délicatement et sa teneur en substances réactives au TBA est évaluée par la lecture de l'absorbance ($\lambda = 532$ nm) au spectrophotomètre visible.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

Une gamme étalon est réalisée à partir de solutions (0 - 0,25 mM) de 1,1,3,3-tetraéthoxypropane. Le 1,1,3,3-tétraéthoxypropane se décompose en malonaldéhyde dans l'eau. La concentration en sr-TBA est déduite de l'absorbance mesurée à $\lambda = 532$ nm. La reproductibilité de l'indice des substances réactives au TBA, associée aux effets du type de sel/chélate du fer, de la protéine et du pH, est vérifiée par l'analyse de trois échantillons issus de deux lots de fabrications différentes. Les résultats énoncés correspondent à la moyenne de ces six déterminations.

Chaque expérience a été répétée trois fois et les résultats énoncés correspondent à la moyenne de ces trois déterminations.

II.2.4 Etudes complémentaires dans la compréhension de la stabilité oxydative : Détermination du potentiel Zéta

Objectif

La stabilité des dispersions colloïdales, des émulsions ou des suspensions est fortement dépendante de la charge électrique existante à l'interface entre la particule et le milieu liquide comme semble l'indiquer notre étude bibliographique.

Les contre-ions multivalents, comme Ca^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+} , peuvent être séquestrés par liaison avec des agents chélatant (EDTA, citrate, phosphates, etc.) ou par des biopolymères (caséines, certaines protéines sériques, phosvitine, ferritine, etc.) (Keowmaneechai & McClements, 2002 ; Cho *et al.*, 2003 ; Diaz *et al.*, 2003 ; Hu *et al.*, 2003b). Or, dans notre étude, des protéines de lait se situent à la surface des gouttelettes d'huile, et des agents chélatants se trouvent dans la phase aqueuse. La charge portée par les gouttelettes d'huile dans une émulsion est donc susceptible d'influencer leur oxydation en créant des interactions électrostatiques entre les protéines laitières situées à l'interface des globules gras et les entités chargées présentes dans la phase aqueuse, tels que les cations métalliques pro-oxydants. Afin d'évaluer la stabilité des chélates de fer tels que le NaFe-EDTA et le bis-glycinate de fer, par rapport au sulfate ferreux (FeSO_4), il nous a semblé pertinent de mesurer la charge de surface des globules gras constitutifs de nos émulsions par la mesure du potentiel zéta.

Principe

La détermination du potentiel zéta permet : (i) d'appréhender la contribution électrostatique et électrocinétique à la stabilisation des dispersions ; (ii) d'évaluer la charge d'une particule au niveau du plan glissant qui correspond au plan à partir duquel les ions présents en solution ont une vitesse égale à la vitesse de la particule (Figure 24) séparant la double couche électrique qui entoure la particule chargée électriquement, du milieu environnant (potentiel ζ ou zéta). La zétamétrie est basée sur la détermination de la vitesse de déplacement des particules dans un champ électrique. Elle nous a ainsi permis d'accéder à la charge de gouttelettes d'huile dans les émulsions stabilisées par les protéines. L'apparition d'une charge à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale.

Dans le cas de particules dispersées en milieu liquide, cette charge est essentiellement liée à l'ionisation de groupes chimiques situés à la surface ou à l'adsorption de surfactants ioniques. Elle conduit à une augmentation de la concentration en contre-ions près de la surface. Chaque particule est donc entourée d'une double couche électrique (dite double couche de Stern ; Figure 24). Cette couche de liquide qui entoure la particule peut en fait être modélisée sous la forme de deux couches :

- La première couche correspond à la région la plus proche de la surface et comporte des ions solidement liés à cette dernière (contre-ions).

- La seconde, externe, est plus diffuse et présente une distribution ionique déterminée par les forces électriques mais aussi par les mouvements thermiques aléatoires.

Lorsqu'on applique un champ électrique dans une suspension contenant ces particules chargées, les particules acquièrent une mobilité dépendante de leur charge et de leur environnement ionique. Le plan séparant les ions qui accompagnent la particule dans son mouvement de ceux qui s'en séparent est appelé « plan de cisaillement ». Le potentiel au niveau de ce plan est appelé zéta (ζ). Ce potentiel est proportionnel à une densité de charge (coulomb.m^{-2}). Il dépend, entre autres de la force ionique et du pH de la solution. Ce potentiel est accessible expérimentalement par les mesures électrostatiques : dans un champ électrique, les particules chargées se déplacent vers l'électrode de charge opposée par le phénomène d'électrophorèse.

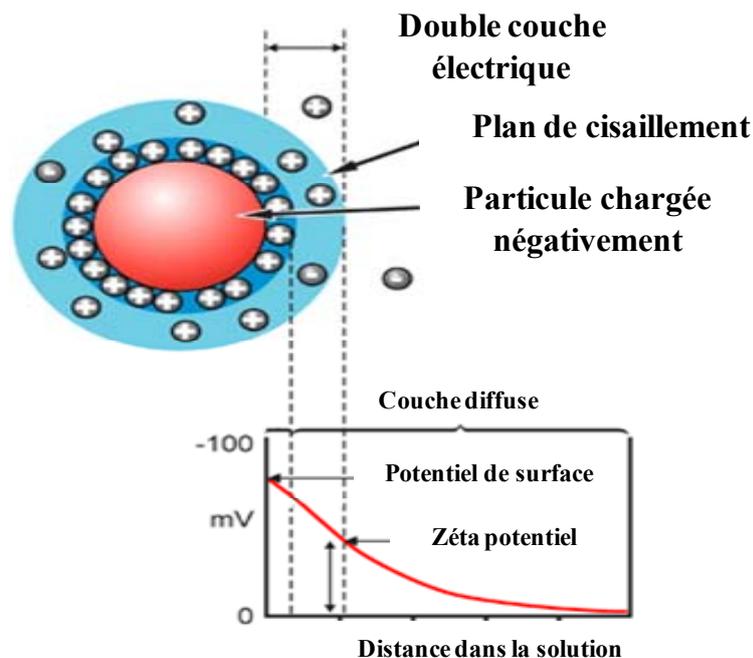


Figure 24 : Schéma de la double-couche d'une particule (Puisieux & Seiller, 1983)

Les parois de la cellule, en contact avec de l'eau, sont chargées négativement. Sous l'action du champ électrique, les ions compensateurs de charge induisent un flux de liquide le long de la paroi, contrebalancé par un flux de sens opposé au centre de la cellule. Ce phénomène, appelé électro-osmose, implique qu'en tout point de la cellule la vitesse observée est la somme de la vitesse de la particule soumise à l'action du champ (électrophorèse) et de la vitesse du solvant (électro-osmose). Les mesures sont effectuées dans le plan dit stationnaire, dans lequel la

vitesse de déplacement de la solution est nulle. On obtient donc que la vitesse propre de déplacement des particules chargées.

Par mesure de la vitesse V et la connaissance du champ électrique appliqué E , il est possible de déduire la mobilité électrophorétique U (Équation 5) :

$$\text{Équation 5} \quad U = \frac{V}{E}$$

U , mobilité électrophorétique ($(\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1})/(\text{V}\cdot\text{cm}^{-1})$)

V , vitesse de migration ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

E , champ électrique ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Cette mobilité électrophorétique permet d'accéder au potentiel zéta (en V), selon la loi de Smoluchowski, qui considère que le champ électrique est uniforme et que le mouvement des particules est parallèle aux parois de la cellule. Dans le cas de particules sphériques, on obtient (Équation 6) :

$$\text{Équation 6} \quad U = \frac{\varepsilon \times \zeta}{\eta}$$

Avec : ζ , potentiel zéta (V), ε , constante diélectrique (sans unité), η , viscosité ($\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$)

Mode opératoire

Les mesures ont été réalisées avec un zétamètre ZétaCOMPACT (model Z8000 CAD instruments, 78690 Les Essarts le Roi, France) équipé d'un éclairage haute performance associé à une acquisition vidéo qui permet d'observer le comportement des particules. La cellule en quartz pour milieux aqueux est constituée de deux paires d'électrodes Palladium, non sensibles à l'oxydation, positionnées symétriquement dans la chambre de mesure. Un champ électrique de 80 volts est appliqué dans un canal contenant les gouttelettes en suspension, les émulsions (fraction volumique 30 % v/v) ayant été, préalablement, diluées au $1/1000^{\text{ème}}$ dans le cas des émulsions stabilisées par le caséinate de sodium et $1/500^{\text{ème}}$ dans le cas des émulsions stabilisées par la β -lactoglobuline. Le pH du milieu de dilution est préalablement ajusté à celui de l'émulsion étudiée. Un faisceau laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) éclaire les gouttelettes sur le plan stationnaire du canal. La caméra enregistre des images du plan

stationnaire agrandies grâce à un microscope. La mise au point du microscope est réalisée de façon à ce que seules les particules de ce plan soient visibles. Un logiciel d'analyse d'image ZétCAD permet d'estimer la viscosité η , le potentiel ζ et la conductivité σ , sous forme de tableau pour chaque échantillon passé.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

Le logiciel utilisé calcule la mobilité moyenne ($(\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1})/(\text{V}\cdot\text{cm}^{-1})$) et le potentiel zéta moyen (mV) à partir de la moyenne des valeurs obtenues sur l'ensemble des particules dont le déplacement a été enregistré, ainsi que les déviations standards de la mobilité et du potentiel zéta. Pour chaque émulsion, les mesures ont été réalisées en triple et la valeur arithmétique moyenne est calculée.

II.3 Étude de l'interface

Objectif

Les protéines sont largement utilisées pour la stabilisation physique de nombreux produits alimentaires de base comme les émulsions ou les mousses. La formation et la stabilisation de ces émulsions et mousses est fortement liée aux propriétés interfaciales des protéines utilisées. L'interface relève d'une organisation complexe comprenant les émulsifiants (dans notre étude, le caséinate de sodium ou la β -lactoglobuline), mais également d'autres composés qui peuvent y avoir migré par attraction électrostatique ou du fait de leur caractère amphiphile. Les travaux réalisés (Gaonkar, 1989 ; Frankel *et al.*, 1994 ; Villier & Genot, 2006) ces dernières années démontrent clairement que, à la fois « frontière » et « zone d'échange » entre les milieux aqueux et lipidique, l'interface est le lieu privilégié de l'amorçage de l'oxydation. Ces travaux démontrent également que les cations métalliques, même quand ils ne sont présents qu'à l'état de traces, jouent un rôle clef dans les émulsions comme dans les systèmes continus (Bos & Van Vliet, 2001). Pour l'analyse de l'interface des émulsions huile-dans-eau utilisées dans notre étude, deux approches sont prises en compte :

- La tensiométrie interfaciale.
- La rhéologie dilatationnelle.

II.3.1 Tension interfaciale

Principe

Les tensions dites de surface et interfaciale sont des paramètres importants dans les domaines de l'étude des surfaces, de l'électrochimie et de la chimie des colloïdes. L'objectif de la détermination de la tension interfaciale est double : (i) voir si la présence des sels/chélate du fer peut influencer les propriétés tensioactives des émulsifiants protéiques (et par la suite les propriétés fonctionnelles), (ii) prédire et comprendre le phénomène d'oxydation dans un système émulsionné enrichi en fer à l'aide d'une technique non-invasive.

À la surface d'un milieu dense (liquide ou solide) ou à l'interface entre deux milieux denses, la matière n'est pas rigoureusement dans le même état du moins localement. Ce nouvel état local est à une énergie légèrement supérieure. À l'interface est donc associée une certaine énergie par unité de surface (exprimée en $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$). En d'autres termes, il existe, au voisinage de la surface (ou interface), une certaine contrainte de tension dans le milieu : c'est une force par unité de longueur, exprimé en $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$. On parle donc indifféremment d'énergie ou de tension. Il est coutume d'utiliser pour l'interface entre deux milieux denses (par ex. deux liquides non miscibles) le terme « tension interfaciale » ou « énergie interfaciale ». Cette tension correspond à une force de contraction spontanée agissant sur l'interface, due aux forces d'attraction qui agissent sur les molécules à l'interface. Lorsque deux liquides non miscibles A et B sont en contact l'un avec l'autre pour former une interface, une force d'attraction existe entre les molécules A et B. Ceci compense plus ou moins partiellement l'excès d'énergie libre qui existe au sein des molécules de surface des liquides A et B, et par conséquent réduit les tensions de surface respectives. Si, l'on appelle σ_{AB} l'énergie de cohésion entre les molécules A et B, l'équation de la tension interfaciale peut s'écrire sous la forme :

$$\text{Équation 7} \quad \gamma_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - 2 \sigma_{AB}$$

Ainsi plus la valeur de cohésion est importante entre les deux phases (σ_{AB} élevée) plus la tension interfaciale est faible. Dans le cas extrême de force de cohésion forte entre A et B, les liquides sont dits miscibles et l'interface disparaît au profit d'une solution vraie. Pour des tensions élevées, les molécules à l'interface sont très fortement attirées vers l'intérieur de la phase dispersée et dans ce cas l'aire de l'interface tend à être la plus petite possible. Si, à

l'aide d'une seringue, une gouttelette d'une phase est formée sans qu'elle ne se détache, dans une autre phase non miscible, la forme de cette gouttelette va être influencée par la tension interfaciale. Plus sa tension interfaciale est élevée et plus sa forme se rapproche d'une sphère. Ainsi, il est possible de quantifier cette valeur de tension interfaciale d'après la forme de la gouttelette en analysant son profil au moyen de l'équation de Laplace (Équation 8 ; Figure 25).

$$\text{Équation 8} \quad \frac{1}{x} \times \frac{d(x \sin \theta)}{dx} = \frac{2}{b} - \left[\frac{g \times \Delta \rho}{\gamma} \right] \times z$$

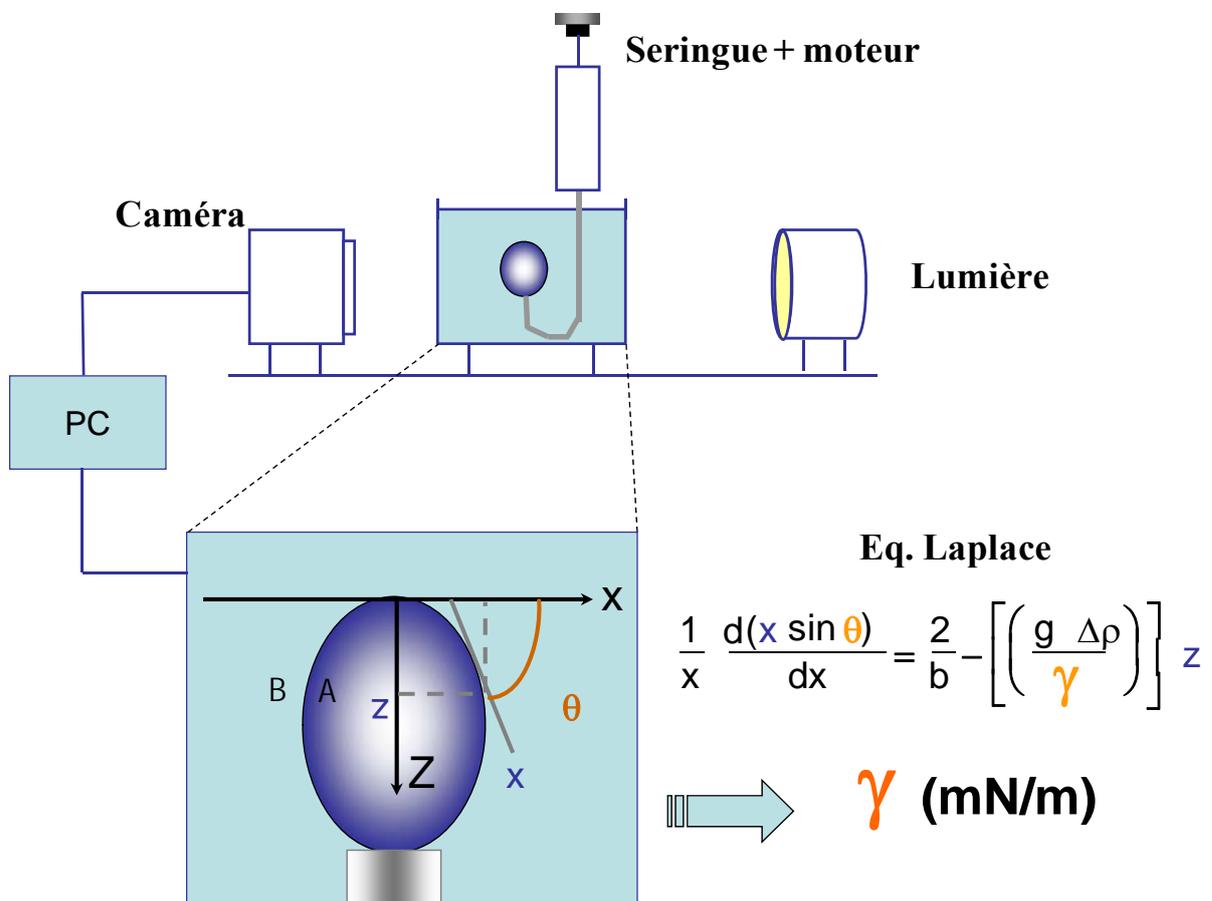


Figure 25 : Détermination de la tension interfaciale à partir du profil de la goutte

Avec x et z , les coordonnées cartésiennes en chaque point de la gouttelette, b , le rayon de courbure à l'apex de la goutte ; θ , l'angle de la tangente en chaque point de la goutte ; $\Delta \rho$, la différence de densité entre les deux phases ; g , l'accélération de l'attraction terrestre ($9,81 \text{ m.s}^{-1}$) ; γ , la tension de surface (N.m^{-1}).

La Figure 25 représente schématiquement, le tensiomètre à goutte et son mode de fonctionnement. A l'aide d'une seringue contenant la première phase, on forme une goutte dans la seconde phase se trouvant dans une seconde cuvette thermostatée. La seringue est reliée à un moteur qui permet de contrôler la taille de la goutte formée. Une source lumineuse et une caméra placées de part et d'autre de la cuvette, permet de filmer cette goutte et de transmettre l'image à un ordinateur. A l'aide d'un logiciel, l'image est digitalisée et analysée en appliquant l'équation de Laplace (Figure 25) au contour de la goutte.

A partir de l'analyse du demi-profil de la goutte, différents paramètres sont calculés : son aire, son volume et sa tension interfaciale entre les deux phases.

Mode opératoire

Le tensiomètre à goutte permet d'étudier des gouttes dites « tombantes » ou « montantes ». Dans le cas d'une interface entre deux fluides, l'attraction terrestre n'est plus la seule force à prendre en compte, il faut aussi considérer la différence de densité entre les fluides. Ainsi une goutte d'eau dans l'huile (moins dense) a tendance à « tomber » alors qu'une goutte d'huile dans l'eau a tendance à « monter ».

Afin d'étudier des gouttes montantes, on adapte à l'extrémité de la seringue une canule courbée qui permet de former la goutte à la base de la cuvette. La seringue est reliée à un moteur qui permet de contrôler le volume de la goutte formée. Ce volume est en effet un facteur très important. Dans le cas d'une goutte tombante, cette dernière est soumise à deux forces principales qui sont le poids (décomposé entre la gravité et les forces d'Archimède) et la tension interfaciale. Le rapport entre ces deux forces est appelé nombre de Bond et est souvent exprimé sous la forme suivante (Équation 9).

$$\text{Équation 9} \quad \frac{\Delta\rho \times g}{\gamma \times \left(\frac{1}{b}\right)^2}$$

avec: $\Delta\rho$, la différence de densité (g.cm^{-3}) ; b , le rayon de courbure à l'apex de la goutte (m) ; g , l'accélération de l'attraction terrestre ($9,81 \text{ m.s}^{-2}$) ; γ , la tension de surface (N.m^{-1}).

Afin de pouvoir appliquer l'équation de Laplace à une goutte, ce nombre de Bond doit être supérieur à 0,1. Les valeurs de \mathbf{b} , $\Delta\rho$, γ et \mathbf{g} étant toutes positives, la goutte formée doit, par conséquent avoir un rayon de courbure vérifiant l'Équation 10 :

$$\text{Équation 10} \quad b > \sqrt{\frac{(0,1) \times \gamma}{\Delta\rho \times g}}$$

Dans le cas hypothétique d'une goutte sphérique, le rayon r est égal à (Équation 11) :

$$\text{Équation 11} \quad r = \sqrt[3]{\frac{3 \times V}{4 \times \pi}}$$

avec V , le volume de la goutte.

En présence d'émulsifiant, la goutte va être étirée. Le rayon de courbure \mathbf{b} à l'apex sera donc toujours supérieur ou égal au rayon d'une goutte sphérique (Équation 12). Ainsi si on peut écrire :

$$\text{Équation 12} \quad r = \sqrt[3]{\frac{3 \times V}{4 \times \pi}} > \sqrt{\frac{(0,1) \times \gamma}{\Delta\rho \times g}} \Leftrightarrow V > \frac{4 \times \pi}{3} \times \left(\sqrt{\frac{(0,1) \times \gamma}{\Delta\rho \times g}} \right)^3$$

Cela permet d'obtenir le volume minimal de la gouttelette. Dans toutes les expériences de tensiométrie présentées ici, le volume de la goutte est fixé à 25 μL . Ce volume est en effet supérieur au volume minimal nécessaire estimé.

La dernière étape avant d'effectuer une mesure est de vérifier que tout le matériel utilisé est propre, c'est-à-dire exempt de toutes traces de matériels tensioactifs, susceptibles de parasiter nos mesures. Pour cela, il suffit de faire la mesure d'une bulle d'air dans de l'eau (goutte montante) ou d'une goutte d'eau dans l'air (goutte pendante) et de comparer la valeur obtenue à la valeur de la tension de surface de l'eau à la température étudiée, par exemple 72 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ à 20 °C. Si la valeur obtenue est inférieure, cela signifie que des émulsifiants sont présents soit dans la seringue, soit dans la cuve, et il est alors impératif de s'en débarrasser par lavages successifs à l'eau.

Les mesures d'activité interfaciale déployées par les émulsifiants sont réalisées à trois valeurs de pH différentes : 6,5 ; 3,5 ; et 2, et à une concentration protéique finale de $0,4 \cdot 10^{-6}$ M.

Lorsque les sels de fer sont étudiés, ils sont préalablement dissous dans de l'eau ultra pure (Milli-Q, 15 MΩ.cm) puis ensuite introduits dans la suspension protéique de sorte que la concentration finale soit de $0,2 \cdot 10^{-6}$ M ou $1,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

L'acquisition de valeurs d'aire de la goutte, de son volume et de sa tension interfaciale au cours du temps permet de déterminer à l'équilibre thermodynamique entre les deux phases la tension interfaciale à partir de l'équation Laplace (Équation 8) :

$$\gamma = \frac{\left[\frac{2}{b} - \frac{1}{x} \times \frac{d \sin \theta}{dx} \right]}{g \Delta \rho}$$

Ainsi, plus **b** (le rayon de courbure à l'apex de la goutte est important), plus la tension interfaciale est faible. La différence de densité entre les deux phases $\Delta \rho$ est également un paramètre important.

II.3.2 Rhéologie dilatationnelle

Principe

La deuxième approche du comportement de protéines dans une émulsion est la rhéologie interfaciale, qui consiste à modéliser l'interface qui existe entre les gouttelettes (de la phase dispersée) et la phase dispersante et d'appliquer une déformation à cette interface dite plane. En général, le comportement rhéologique du système colloïdal dépend principalement des facteurs suivants : viscosité du milieu dispersant, concentration en particules, taille et forme des particules, interaction particules/ particules et particules/milieu dispersant.

La rhéologie est définie comme la science de la déformation et du flux de matière. En appliquant une déformation à un système ou un matériau, il est possible d'obtenir en suivant la réponse à la déformation, des informations sur la structure. Les comportements rhéologiques les plus extrêmes, sont d'une part ceux des fluides visqueux de type Newtonien et, d'autre part, ceux de solides élastiques de type Hookéen. Cependant, la plupart des matériaux, et particulièrement ceux de nature colloïdale, ont un comportement mécanique qui se situe entre ces deux extrêmes, avec des caractéristiques à la fois visqueuses et élastiques.

De tels matériaux sont dits viscoélastiques. La plupart des interfaces étudiées par la rhéologie interfaciale sont de nature viscoélastique.

La rhéologie interfaciale peut être définie comme une relation entre la contrainte, la déformation et le taux de déformation, sous forme de coefficients d'élasticité et de viscosité.

La technique que nous présentons correspond à une compression/dilatation et la réponse en terme d'aire d'une goutte d'une phase dans une autre non miscible. Ce type de rhéologie est donc appelée rhéologie dilatationnelle en trois dimensions, par opposition à des compressions/dilatations de surface, ce qui correspond à une rhéologie en deux dimensions.

Lois mathématiques de la rhéologie dilatationnelle

Dans le cas d'une compression/dilatation, la contrainte de surface, $\Delta\gamma$, résultant de la variation d'aire, ΔA , peut s'exprimer par la somme des contributions élastiques (ε') et visqueuses (ε''), cette dernière dépendant de la variation relative de l'aire (Équation 13) :

$$\text{Équation 13} \quad \Delta\gamma = \varepsilon' \Delta \ln A + \varepsilon'' \left[\frac{\ln A}{dt} \right]$$

Le coefficient élastique ε' est une mesure de l'énergie stockée à l'interface tandis que ε'' reflète la perte d'énergie sous l'effet des phénomènes de relaxation (c'est-à-dire de tout processus spontané qui affecte la tension de surface par unité relative d'augmentation de l'aire de surface), ce qui peut s'écrire (Équation 14) :

$$\text{Équation 14} \quad \varepsilon = \frac{d\gamma}{d \ln A}$$

Cette définition, initialement proposée par Gibbs dans le cas de l'élasticité de surface d'un film liquide stabilisé par du savon, s'est par la suite révélée applicable d'une façon générale pour exprimer les gradients de tension de surface de toute interface liquide. Les deux contributions ε' et ε'' peuvent être obtenues séparément en appliquant à l'interface de petites contractions et expansions périodiques à une fréquence donnée. Dans de telles expériences, si la déformation suit une loi sinusoïdale, on peut alors écrire le module viscoélastique ε comme étant un nombre complexe, avec une partie réelle égale à la composante élastique ε' et avec

une partie imaginaire égale à la composante visqueuse ε'' (Lucassen-Reynders, 1993) (Équation 15, Équation 16) :

$$\text{Équation 15} \quad \varepsilon' = \varepsilon \cos \varphi \quad \text{et} \quad \varepsilon'' = \varepsilon \sin \varphi$$

$$\text{Équation 16} \quad \varepsilon = |\varepsilon'| + i|\varepsilon''|$$

Expérimentalement, la contribution imaginaire au module ε est reflétée par un déphasage φ entre la contrainte appliquée (ΔA) et la tension mesurée ($\Delta \gamma$).

Mode opératoire

La tensiométrie à goutte nous permet également (en plus des mesures de tension interfaciales d'équilibre) d'obtenir des informations sur les comportements rhéologiques des films formés à l'interface. En effet, il est possible de mesurer le module de viscoélasticité de surface comme il a été défini dans l'équation (10) (Benjamins *et al.*, 1996). L'aire de la goutte peut être modifiée de façon sinusoïdale en imposant des variations du volume, à une amplitude et à une fréquence déterminées de 10 % (surfactive) et de 0,1 Hz, respectivement. On enregistre alors enregistrer à la fois les variations d'aire (dA) et les variations sinusoïdales de la tension de surface ($d\gamma$). Le logiciel trace alors la tension interfaciale en fonction des variations relatives de l'aire de la goutte. Ceci produit une ellipse dans le cas général d'un comportement de surface viscoélastique. Il est possible ensuite de déterminer la valeur absolue du module complexe ε , et l'angle de déphasage entre les variations de tension et les variations d'aire interfaciale à partir de l'excentricité et de l'inclinaison de ce type d'ellipse (Lucassen & Barnes, 1972). Les caractéristiques de la procédure expérimentale sont les suivantes : la goutte est formée en quelques secondes, la variation sinusoïdale de l'aire peut commencer immédiatement après la formation de la goutte, la variation d'aire peut être imposée du début à la fin de l'expérience mais peut être également interrompue, l'amplitude et la fréquence de cette variation peuvent être changées.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

Les modules viscoélastiques, ainsi que leurs composantes élastiques et viscoélastiques, ont été obtenues à partir des variations de la tension interfaciale, en fonction de la variation imposée de l'aire de la goutte. L'angle de déphasage est dû à des phénomènes de relaxation, tels que le

réarrangement des molécules adsorbées à l'interface ou la diffusion de surfactants vers l'interface pendant l'expansion, à partir de la phase environnante. Ces phénomènes de relaxation dépendent de la structure du film interfacial. Dans le cas d'une structure lâche, les réarrangements sont possibles et rapides, alors que dans le cas d'un film très rigide, ils ne pourront pas avoir lieu dans l'intervalle de temps de la modification, par effet d'encombrement stérique. Ainsi, un angle de déphasage élevé est représentatif d'une certaine flexibilité à l'interface alors qu'un angle faible ou nul, indique un taux de structuration élevée. D'après les précédentes équations, il est possible de déduire que plus l'angle de déphasage est faible, plus ε' est grand et ε'' petit. L'amplitude de variation de la tension interfaciale dépend également de la structure à l'interface. Plus le film est structuré, plus énergie stockée à l'interface est grande et s'oppose à la déformation.

Pour résumer, une forte valeur de module viscoélastique avec un angle de déphasage faible est la conséquence d'un film interfacial rigide alors qu'une valeur de viscoélasticité faible avec un angle de déphasage plus élevé est la conséquence d'une structure interfaciale plus lâche (Roth, 2001).

II.4 Etude des interactions chélate de fer - protéines

Afin d'expliquer pourquoi le Fe-BIS conduit à une oxydation beaucoup plus faible par rapport au sulfate ferreux, dans une émulsion huile-dans-eau stabilisée soit par la β -lactoglobuline, soit par le caséinate de sodium, nous allons utiliser les outils suivants :

- L'analyse enthalpique différentielle (AED)
- La spectroscopie d'absorption par rayons X (R-X)
- La spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ITRF)

Ces techniques vont nous permettre de comprendre si la présence du fer sous forme chélate (bisglycinate de fer) dans un milieu contenant des protéines comme la β -lactoglobuline peut induire des changements sur la structure.

II.4.1 Analyse Enthalpique Différentielle (AED)

Objectif

Quand un matériau subit un changement d'état physique tel une fusion ou une transition d'une forme cristalline en une autre, ou bien, qu'un composé réagit chimiquement, on observe un dégagement ou une absorption de chaleur. De tels processus peuvent être initiés simplement en augmentant la température du matériau. Dans notre cas, l'analyse enthalpique différentielle (AED) a été choisie pour suivre le changement de la structure de la β -lactoglobuline en fonction de la température et de déterminer si l'ajout du fer modifie son comportement lors d'une élévation de température, ce qui correspond à un changement de structure. En analysant les changements enthalpiques (ΔH) et la température de dénaturation de l'échantillon (T_d), on peut visualiser un éventuel changement de structure de la protéine suite à l'ajout des ions ferriques/ferreux et donc s'il y a ou pas des interactions entre la protéine et les ions ferriques/ferreux.

Principe

L'AED repose sur la mesure comparative des variations d'énergie fournie à une référence inerte et à l'échantillon étudié. Cela permet une analyse quantitative des transitions en terme d'énergie. La quantité de chaleur à fournir pour conserver l'échantillon et le témoin à une température identique est mesurée, tout en imposant une montée en température ou un refroidissement. Si on observe des différences de flux d'énergie en établissant un programme de température contrôlée, il devient dès lors aisé d'en déduire les changements d'état physique du système étudié et en particulier les modifications de la structure. Ainsi, l'AED s'applique à la détermination de phénomènes exothermiques (température de transition sol-gel, de cristallisation), ou endothermique (température de transition vitreuse, de fusion), l'échantillon exigeant plus ou moins de puissance que la référence pour maintenir une température donnée durant le balayage en température (Teyssède & Lacabanne, 1996).

Le dispositif expérimental, comporte deux enceintes identiques avec deux cellules de volume fixe (Figure 26). L'une de ces cellules est remplie avec l'échantillon à analyser tandis que l'autre contient le témoin (dans notre cas le tampon imidazole/acétate). Ce dispositif, dit à compensation de puissance, est muni de deux fours identiques. L'ensemble est thermostaté, et pour chaque variation de température, un système de mesure permet de suivre la quantité

d'énergie à apporter à la cellule échantillon pour garder la même température pour les deux cellules. L'appareil nous donne au final une courbe du flux de chaleur en f (T).

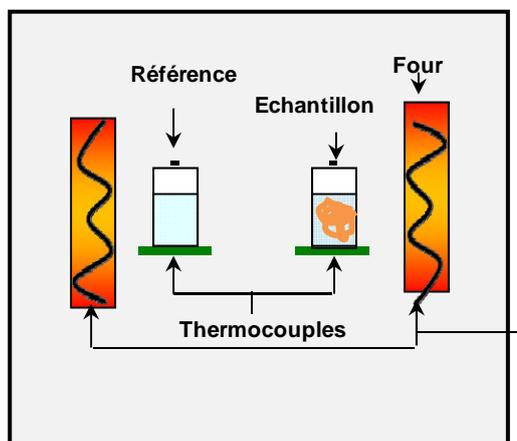


Figure 26 : Schéma du dispositif de mesure par AED

Mode opératoire

La caractérisation de l'état conformationnel des échantillons protéiques (β -lactoglobuline à 15,85 g.L⁻¹ avec et sans bisglycinate de fer) par analyse enthalpique différentielle a été conduite au moyen d'un microcalorimètre DSC III (Setaram Instrumentation, France) de très haute sensibilité. La gamme de température choisie pour l'étude est de 25 à 110 °C avec une vitesse de balayage de 0,5 °C.min⁻¹. Environ 600 mg d'échantillons sont placés dans une cellule fermée hermétiquement. La référence utilisée est le tampon imidazole/acétate 0,1 M (environ 600 mg placé dans une cellule identique).

Traitement des données et mode d'expression des résultats

La répétabilité des paramètres calorimétriques est établie à l'issue d'au moins trois répétitions différentes pour chaque échantillon.

Dans tout ce qui suit, nous ne nous sommes intéressés qu'aux variations du flux de chaleur (noté : ϕ) [mW.g⁻¹] en fonction de la température [°C] au niveau de la transition de phase de la β -lactoglobuline en présence et/ou sans bisglycinate de fer. La transition est caractérisée par deux paramètres principaux que nous allons analyser successivement : Td et ΔH , la température et l'enthalpie de dénaturation.

II.4.2 La spectroscopie d'absorption par rayons X

Objectif

L'obtention de matériaux aux propriétés nouvelles nécessite une connaissance de plus en plus précise de leur structure (distances, distribution radiale, nombre voisins) et de leur structure électronique dans le cas de métaux. Les instruments utilisés quotidiennement et communément au laboratoire ne suffisent pas toujours et de grands instruments, regroupés dans des laboratoires nationaux ou internationaux sont nécessaires pour des expériences plus lourdes : source de rayonnement synchrotron, de neutrons...

Un article récent de l'Actualité Chimique a fait le point sur les apports irremplaçables du rayonnement synchrotron en science de matériaux (Briois *et al.*, 2000). Notre but dans l'utilisation des Rayons-X est d'étudier la structure des éléments de transition (dans notre cas le Fe^{2+} et/ou Fe^{3+}) qui sont placés dans la matrice protéique (β -lactoglobuline) en phase aqueuse. La spectroscopie d'absorption par rayons-X permet la détermination de la structure locale autour d'un atome absorbant, quel que soit l'état du matériau (solide cristallin ou amorphe, solution, gaz...). Un avantage des rayons X est la résolution expérimentale supérieure à celle à laquelle on accède avec une spectroscopie de perte d'énergie d'électrons transmis. Les spectroscopies X sont essentiellement employées pour l'analyse qualitative et quantitative. Dans notre cas, nous l'avons choisie afin de déterminer les paramètres structuraux (tels que la symétrie locale autour de l'absorbeur et la distance métal-ligand) et les paramètres électroniques (tels que l'occupation de la couche de valence, l'état d'oxydation formel du métal et l'état de spin) de l'atome de fer dans le chélate de fer, en présence ou non de protéine (β -lactoglobuline).

Principe

Une expérience d'absorption X implique de mesurer le coefficient d'absorption d'un échantillon pour des rayons X dont l'énergie incidente est déviée vers une zone qui correspond à celle qui est nécessaire à la photoémission d'un électron du cœur (couche K ou L) d'un atome de l'échantillon. En d'autres termes, la spectroscopie d'absorption X correspond à l'excitation d'électrons au niveau du cœur d'un atome donné, par absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ (Figure 27). Il est nécessaire d'utiliser un faisceau très résolu en énergie et de haute intensité, ce qui signifie que la plupart des expériences d'absorption X

sont réalisées à partir de sources synchrotron. D'une façon générale, l'énergie d'un photon X inférieure à l'énergie E_0 de liaison d'un électron du métal n'est pas absorbée. En revanche, si l'énergie de ce photon est supérieure à E_0 , l'électron est éjecté vers les niveaux inoccupés. Le spectre d'absorption présente alors un seuil correspondant à la transition de cet électron vers l'orbitale moléculaire inoccupée de plus basse énergie (saut brutal du coefficient d'absorption). Quand l'atome métallique est engagé dans un complexe, le spectre d'absorption X au seuil (K, L, M,...) reflète le processus d'éjection du photoélectron de l'atome absorbant après diffusion multiple sur les atomes les plus proches. Au-delà du seuil, l'onde associée au photoélectron éjecté vient interférer avec l'onde rétrodiffusée par ces atomes voisins, ce qui provoque des oscillations d'absorption. Un spectre d'absorption X se compose donc de deux parties.

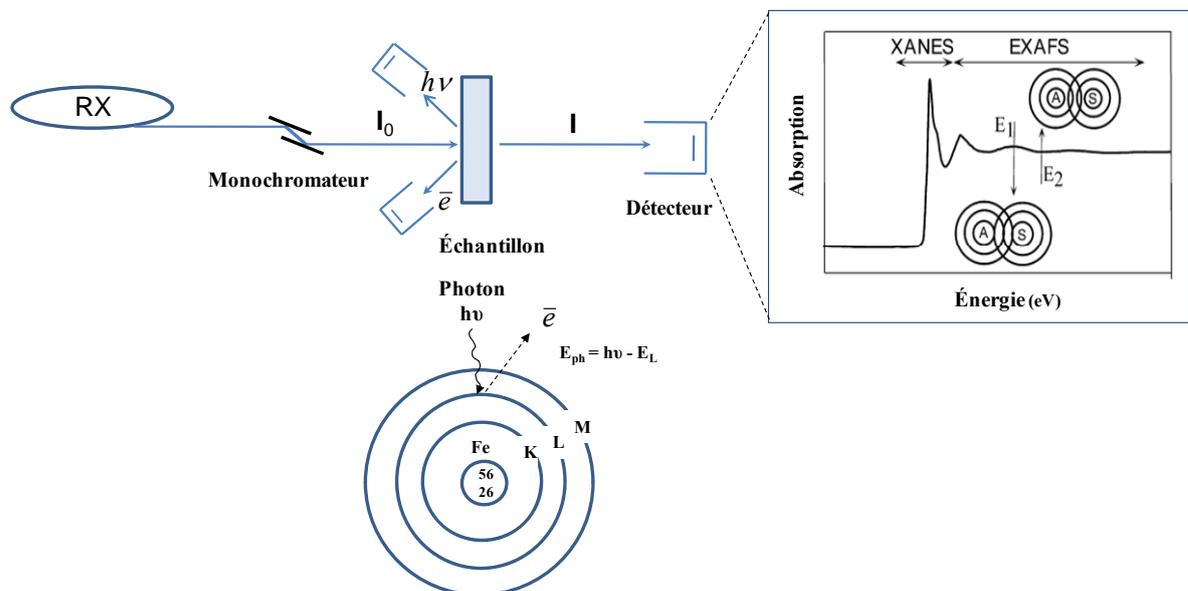


Figure 27 : Schéma de la spectrométrie d'absorption X, système ultraviolet (RX ; source synchrotron de rayonnement X) monochromateur (double cristaux de Bragg) ; détecteur ; détection des photons X transmis-chambre à ionisation ; puis système d'acquisition et de traitement des données

La structure fine avant et au voisinage du seuil constitue le XANES (X ray Absorption Near Edge Structure) et la structure fine après le seuil ou l'EXAFS (Extended X ray Absorption Fine structure). Les principales techniques de détection se distinguent suivant la nature du

processus physique mis en jeu pour la mesure du signal d'absorption X. Dans notre cas, on parle de la détection du signal par transmission, qui est aussi appelé la technique de volume. Elle implique, pour chaque énergie de photon E , la valeur du coefficient d'absorption $\mu(E)$ déterminée par mesure (grille chambre à ionisation) du flux de photons incidents I_0 et du flux de photons transmis par l'échantillon I . La loi d'absorption suit la loi de Beer-Lambert (Équation 17) :

$$\text{Équation 17} \quad \mu(E) = \frac{1}{\rho x} \ln\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

ρ , masse volumique d'échantillon ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

x , épaisseur de l'échantillon (cm)

Lorsqu'un faisceau de rayons X (R-X) pénètre dans un milieu matériel, on constate une diminution progressive de son intensité. Cette diminution du nombre de photons, appelée l'atténuation du faisceau, est due essentiellement à l'interaction des photons avec des électrons. Dans un tel processus, l'énergie perdue se trouve sous deux formes :

- Une partie E_A d'énergie est absorbée par le milieu ;
- Une partie E_D est diffusée et sort de la matière dans une direction différente de la direction du faisceau.

L'absorption de R-X peut exciter les électrons 1S (niveau K) ou 2S, 2P (niveau L) d'un élément et leur faire occuper des orbitales vides, ou pour des photons de R-X d'énergie supérieure, rejoindre le continuum.

En examinant l'énergie du niveau d'absorption de R-X, niveau où l'absorption commence, il est souvent possible de déterminer l'état d'oxydation de l'ion métallique étudié. Lorsque l'énergie du photon est légèrement supérieure à E_0 , surviennent les transitions vers l'état du continuum. Le photoélectron est alors émis avec une énergie cinétique faible et un libre parcours moyen important. Il est alors impliqué dans des phénomènes de diffusions multiples avec les atomes environnants (diffusion à n corps). Cette partie du spectre (XANES) s'étend de quelques eV en dessous du seuil à environ 50 eV au-delà.

Dans les cas favorables, les transitions des électrons d'une couche interne vers le niveau de valence, permettent également d'obtenir des informations sur la structure électronique. La modulation du spectre d'énergie par absorption de R-X, par diffusion en retour des atomes voisins, produit une structure fine étendue d'absorption des R-X (EXAFS) dont on peut tirer des détails sur la géométrie de coordination des métaux. Cette méthode a été largement appliquée aux études structurales des métalloprotéines, et elle présente l'avantage de permettre l'étude de solides non cristallins et même d'échantillons en solutions (Pin *et al.*, 1994). Cette partie du spectre d'absorption s'étend de 50 à 1000 eV au-delà du seuil d'absorption. Les informations sur la géométrie, obtenus en ajustant les données EXAFS à une structure modèle, peuvent être même fiables jusqu'à $\pm 0,001\text{\AA}$.

Pour résumer, un spectre d'absorption X se compose donc de deux parties. La structure fine avant et au voisinage du seuil constitue le XANES et la structure fine après le seuil ou l'EXAFS. Dans le cas particulier du fer, au seuil K, le domaine du XANES s'étend de 7090 à 7150 eV. Ce spectre d'absorption X est lié aux différentes transitions atomiques du fer. La région du pré seuil, de faible absorbance, en relation avec la transition 1s-3d de l'atome de fer reflète la symétrie du complexe et de l'encombrement des atomes entourant le métal. La forme et la position de cette raie d'absorption dépendent du degré d'oxydation du métal, de son état de spin et de la nature des éventuels ligands complexant le métal. Le domaine de plus haute énergie (de 7150 à 8000 eV) constitue le domaine EXAFS du fer, cette région est souvent utilisée dans la détermination des distances qui séparent l'atome de fer de ses atomes environnants.

Mode opératoire

Cette étude a été menée au synchrotron SOLEIL à Saclay sur la ligne de lumière SAMBA sur l'aimant de courbure DO9. Un monochromateur à deux cristaux à sortie fixe avec focalisation sagittale dans le plan horizontal et deux jeux de cristaux Si (111) et Si (220) focalisent le faisceau dans le plan vertical permettant de couvrir une gamme en énergie allant de 4,6 à 43 keV, et d'obtenir un faisceau (200 μm x 200 μm) de haute résolution. Les spectres XANES ont été enregistrés en mode de transmission avec des pas de 1 eV pendant 1,5 s de 7090 eV à 7100 eV, puis avec des pas de 0,3 eV par 3 s de 7100 à 7150 eV (c'est-à-dire autour de seuil), puis avec des pas de 0,5 eV par 3 s de 7150 à 7160 eV, puis avec des pas de

1 eV par 3 s de 7160 à 7220 eV. Une feuille de fer a été enregistrée avant chaque spectre XANES pour la calibration en énergie.

Traitement des données et mode d'expression des résultats.

Une ligne de base a été réalisée sur la partie pré-seuil (fit linéaire). Les spectres ont été calibrés en énergie par rapport aux valeurs obtenues avec la feuille de fer mesurée avant chaque spectre. La normalisation de l'absorption atomique a été réalisée pour chaque spectre XANES à partir de la valeur obtenue à la fin de la première oscillation EXAFS et chaque spectre a été multiplié par un certain facteur afin que la valeur d'absorbance au pic d'absorption soit de 1. Les spectres successifs identiques ont été moyennés, et leurs dérivées-première ont été calculées.

II.4.3 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ITFR)

Objectif

La spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge constitue un outil d'identification des types de liaisons chimiques existantes au sein d'une molécule, organique ou inorganique, sous les formes solide, liquide ou gazeuse.

La spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Depuis l'apparition des spectromètres à transformée de Fourier, la spectroscopie infrarouge est devenue une méthode de choix pour caractériser la structure secondaire des protéines. Cette structure secondaire nous intéresse car son changement peut indiquer une forte interaction avec les ions fer.

Les principales vibrations associées aux liaisons peptidiques, observées à l'aide de cette technique, correspondent aux bandes amides I et II, ainsi qu'aux harmoniques et bandes de combinaisons dans les régions $1350-1610\text{ cm}^{-1}$ et $2000-2200\text{ cm}^{-1}$. Les chaînes latérales de certains acides aminés, par leur structure chimique, présentent aussi des contributions dans ces domaines spectraux, ce qui peut perturber la forme des bandes d'absorption du squelette

polypeptidique des protéines (Dufour & Robert, 2000). Parmi différents résidus d'acides aminés, les résidus aspartyl (Asp) et glutamyl (Glu), sont ceux qui présentent plus d'intérêt pour notre étude. Ces résidus d'acides aminés pourraient être responsables d'interactions électrostatiques avec les ions métalliques (dans notre cas le fer bi- et/ou trivalent) (Sugiarto *et al.*, 2009). Les chaînes latérales d'Asp et Glu absorbent peu dans la région amide I mais donnent des bandes intenses entre 1580 et 1520 cm^{-1} . L'absorption dans cette région est due à la vibration d'élongation asymétrique du groupement COO^- .

Cet outil d'analyse va donc nous permettre de déterminer si l'ajout de Fe-BIS modifie la structure de la β -lactoglobuline selon les conditions de pH ainsi que les groupements affectés par cette interaction. Donc l'analyse du spectre d'absorption infrarouge identifie une « empreinte » moléculaire.

Principe

L'absorption dans l'infrarouge explore les relations entre atomes liés et leurs vibrations relatives ou en rapport avec l'ensemble des atomes voisins. Cette spectroscopie vibrationnelle utilise des énergies photoniques couvrant les longueurs d'onde de 1 à 100 μm . L'observation d'une absorption en infrarouge correspond au transfert d'énergie du rayonnement ayant contribué à la vibration du dipôle, de fréquence mécanique équivalent à la fréquence électromagnétique de l'onde. Ainsi le spectre infrarouge d'une molécule résulte de transitions entre ses différents états vibrationnels, associant les mouvements relatifs de deux atomes par une liaison. Les vibrations peuvent être liées à des élongations symétriques ou asymétriques lorsque la distance entre deux atomes croît ou décroît, à des oscillations quand la position de l'atome change par rapport à l'axe originel de la liaison (Smith, 1999). Un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR : Fourier Transformed Infrared) se compose d'une source infrarouge, d'un interféromètre (Interféromètre Michelson), puis de l'échantillon et du détecteur infrarouge (Figure 28). A son tour l'interféromètre de Michelson, dispositif central du système, comprend une séparatrice (miroir semi-transparent, diviseur de faisceau), un miroir fixe et un miroir mobile. Ici, le faisceau infrarouge polychromatique issu de la source, qui atteint la séparatrice avec un angle de 45° , se trouve réfléchi pour une moitié par la séparatrice tandis que l'autre moitié est transmise. D'une part, le faisceau réfléchi atteint un miroir mobile qui le renvoie vers la séparatrice pour sa transmission en direction de l'échantillon. D'autre part, un miroir fixe réfléchit le faisceau précédemment transmis, à

nouveau réfléchi par la séparatrice est dirigé vers l'échantillon. Les rayons renvoyés de chaque miroir (mobile et fixe) retournent au diviseur puis au détecteur. Les deux rayons réunis vont interférer de manière constructive ou destructive. La somme des flux interférents produit au niveau du détecteur un interférogramme (c'est-à-dire une signature de l'intensité) qui dépend de la position du miroir mobile. Le déplacement de ce miroir se mesure exactement à l'aide d'un laser dirigé sur le fond du miroir mobile.

Mode opératoire

Les spectres infrarouge de résolution 4 cm^{-1} , sur une échelle de nombre d'ondes allant de 4000 cm^{-1} à 800 cm^{-1} (Hind *et al.*, 2001), sont enregistrés avec un spectromètre modèle IFS Vector 22 (Bruker, Allemagne), comportant un laser He/Ne de faible puissance et de longueur d'onde monochromatique ($\lambda = 632,8\text{ nm}$), ainsi qu'un détecteur photovoltaïque MCT (alliage Hg/Cd/Te), semi-conducteur qui, sous l'effet du rayonnement, libère des électrons et induit une différence de potentiel. L'appareil est continuellement purgé avec de l'air comprimé (qui réduit en permanence la présence de vapeur d'eau à la surface de la cellule) et refroidi à l'azote. L'échantillon est placé à la surface d'un cristal en forme de prisme tronqué Zn-Se (matériau totalement insoluble dans l'eau), à l'intérieur duquel le faisceau lumineux subit de nombreuses réflexions. Le rayon infrarouge entré par un côté du cristal, est réfléchi à travers lui, puis dirigé vers un détecteur approprié.

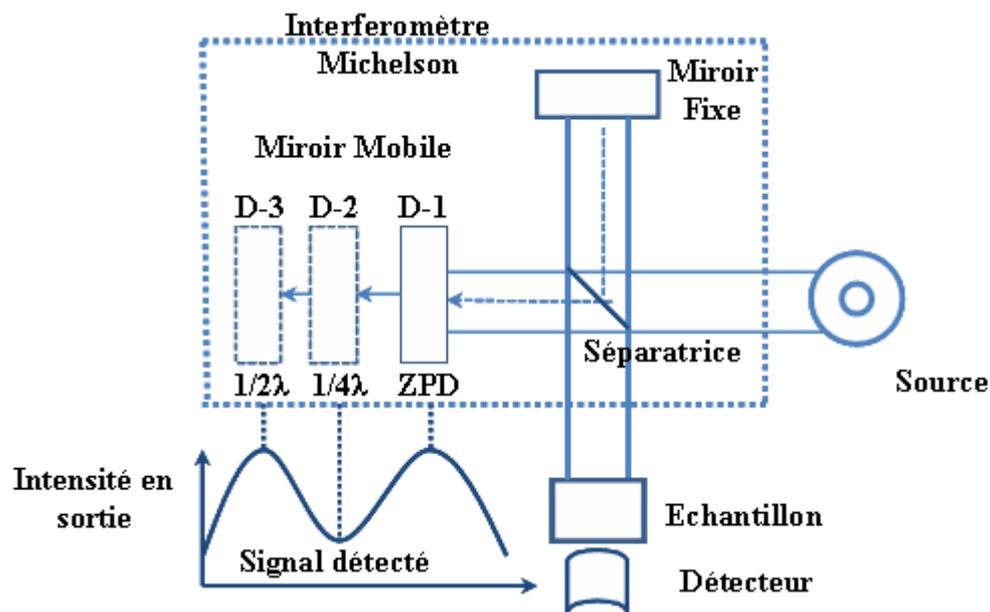


Figure 28 : Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier

Pour chaque spectre, la référence (tampon correspondant) est soustraite et le résultat est la moyenne de 256 scans avec une résolution de 4 cm^{-1} . La température d'étude se situe à $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Nous avons effectué trois mesures par échantillon et trois échantillons ont été analysés dans chaque condition (pH et quantité de fer). Les solutions protéiques à pH = 3,5 et pH = 6,5 sont préalablement préparées dans un système inerte puis le fer-bisglycinate est ajouté.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

Pour le traitement de l'ensemble des spectres acquis, le logiciel Origin 6.0 est utilisé. Pour l'étude de la bande amide I de la protéine un lissage avec la méthode Savitsky-Golay sur 5 points est appliqué. Ce lissage est nécessaire car il permet d'augmenter le rapport signal/bruit en se centrant sur un point. Puis on applique la dérivée seconde pour déterminer les différentes pentes de la bande amide I (allant de 1600 à 1700 cm^{-1}) afin de définir les composantes principales qui la composent (Dong *et al.*, 1990). Ce traitement est indispensable pour obtenir les informations sur la structure, car cette bande est de très faible intensité.

Hypothèse et objectifs

Hypothèse et objectifs

Tels que présentés dans l'introduction et la revue bibliographique, plusieurs travaux mettent en évidence que le déficit en fer constitue un problème nutritionnel important dans le monde avec de fortes conséquences sociaux-économiques. Parmi les solutions envisagées pour pallier ce problème de santé publique, le développement d'aliments enrichis en fer est actuellement la voie la plus exploitée. Cependant, cette approche ne conduit pas aux résultats escomptés en raison de la faible biodisponibilité du fer, notamment due à des interactions avec les autres nutriments ou à des réactions impliquant le fer dans l'aliment. Suite à ces interactions, un autre problème majeur apparaît : l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des systèmes de transport ou des fortifiants en fer susceptibles de protéger le fer et de le délivrer au niveau de la barrière intestinale pour optimiser sa biodisponibilité. Une alternative consiste en l'utilisation de composés où le fer est protégé. Ainsi, l'utilisation de chélates de fer, tel que (i) le bisglycinate de fer qui est *un fortifiant « naturel »* et (ii) l'éthylènediaminetétracétate qui est *un fortifiant synthétique*, constitue une voie intéressante dans la lutte contre la carence en fer. Dans de nombreux aliments transformés (produits laitiers, charcuteries, pâtes et mousses, sauces, mayonnaise, soupes, ...), la fraction triglycérique est sous forme de gouttelettes dispersées dans une phase aqueuse. Ainsi, on peut considérer qu'une émulsion huile-dans-eau constitue un modèle représentatif de nombreux produits alimentaires : yaourts, sauces, plats cuisinés. En outre, ces aliments sont habituellement consommés par la même population soumise au risque d'anémie. Pour la stabilisation de ces émulsions, les émulsifiants sont généralement de type protéique. Les protéines s'adsorbent à l'interface huile/eau en raison de leurs propriétés amphiphiles. Parmi les différentes protéines, celles du lait restent les plus exploitées, en raison de leurs bonnes capacités émulsifiantes et de leur praticité (soluble, neutre en goût et en couleur).

Hypothèse

Les travaux de cette recherche viseront donc à valider l'hypothèse suivante : « le bisglycinate de fer est un chélate de fer « naturel » qui est inerte vis-à-vis d'une matrice alimentaire riche en matières grasses ».

Objectifs

L'objectif général de cette thèse est d'approfondir la compréhension du déroulement de l'oxydation des lipides dans les milieux complexes tels que les émulsions enrichies en fer sous forme chélaté en s'attachant particulièrement à la formation *des produits primaires et secondaires* résultant de l'oxydation. Nous évaluerons également l'impact de deux chélates de fer (Fe-bisglycinate et NaFe-EDTA) sur les propriétés fonctionnelles des protéines en se focalisant sur l'étude de l'interface (lieu privilégié de l'amorçage de l'oxydation) ainsi qu'au niveau de la phase aqueuse des émulsions.

Objectif 1 : Etude de la stabilité oxydative d'une émulsion huile-dans-eau stabilisée par des protéines laitières en présence de chélate de fer. Cet objectif vise à comparer la stabilité oxydative des émulsions stabilisées par deux types de protéines laitières de structures différentes :

- Protéine avec groupes phosphoséryls, groupes possédant une forte affinité pour les ions bivalents, représentée par le caséinate de sodium ;
- Protéine sans groupe phosphoséryl, avec des groupes carboxyliques mais aussi avec deux groupes disulfures et un groupe thiol possédant une affinité moindre pour les métaux bivalents que les groupes phosphates, représentée par la β -lactoglobuline.

Plusieurs paramètres pouvant influencer la stabilité oxydative des émulsions tels que le pH de la phase aqueuse, la taille et la charge de surface des gouttelettes, la nature de la protéine, la nature et la concentration de chélate de fer, seront alors étudiés.

Objectif 2 : Etude de l'interface huile/eau stabilisée par des protéines laitières en présence de chélates de fer : rôle des groupes phosphate et du pH. Cet objectif vise à comprendre s'il y a un changement des propriétés interfaciales des protéines laitières (fonctionnalité importante) en présence de chélates de fer, et si ce changement pourrait expliquer (voire permettre de prédire) les différentes stabilités oxydatives des émulsions huile-dans-eau stabilisées par des protéines laitières. Les paramètres pris en compte sont : le pH de la phase aqueuse, la nature de la protéine et du chélate/sel du fer.

Objectif 3 : Etude de la phase aqueuse protéique en présence de chélate de fer. Cet objectif vise à expliquer pourquoi le bisglycinate de fer conduit à une oxydation

beaucoup plus faible par rapport au sulfate ferreux, dans une émulsion huile-dans-eau stabilisée par la β -lactoglobuline en la comparant avec celle stabilisée par le caséinate de sodium. Les outils utilisés seront : l'analyse d'enthalpie différentielle et la spectroscopie d'absorption par rayons X.

Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: transfer of iron from chelates to milk proteins at interface

Le contenu de ce chapitre a été soumis dans :

Food Chemistry 2009.11.002

Tatiana Guzun-Cojocaru, Chavdar Koev, Martin Yordanov,

Thomas Karbowski, Eliane Cases, Philippe Cayot

I. Résumé

La supplémentation en fer peut conduire aussi bien à l'oxydation des matrices alimentaires qu'à celles des lipides cellulaires. Dans cette étude, l'effet de la présence du Fe-bisglycinate, du NaFe-EDTA et du FeSO₄ a été étudié sur la stabilité oxydative des émulsions huile/eau stabilisées soit par la β -lactoglobuline (BLG), soit par le caséinate de sodium (CN). L'oxydation des lipides a été évaluée en suivant l'Indice de Peroxyde (IP) et les substances réactives de l'acide thiobarbiturique (SRATB ; des aldéhydes produits par la dégradation des lipides insaturés peroxydés) pendant 7 jours. À pH 6,5, en présence de chélate de fer, les valeurs intégrées dans le temps sur une période de 7 jours ($\int_0^t PV dt$ et $\int_0^t TBARS dt$), notées par iIP et iSRATB, sont plus faibles pour la BLG que pour le CN. Le CN possède des groupes phosphates ayant plus d'affinité pour les ions de fer que les résidus de carboxylate. Les émulsions stabilisées par le CN étaient plus oxydées si elles étaient enrichies avec le bisglycinate de fer ou le FeSO₄ qu'avec le NaFe-EDTA. Ces résultats indiquent que la compétition pour la complexation du fer entre les groupements fonctionnels des protéines et les contre-ions de sel (glycinate, sulfate ou de l'EDTA) apparaissent comme un facteur clé dans l'oxydation.

Mots-clés: Anémie, enrichissement en fer, oxydation des lipides, bisglycinate de fer, NaFe-EDTA.

II. Abstract

Iron supplementation can promote oxidation of food matrices as well as cell lipids. The oxidative stability of oil/water emulsions stabilized by β -lactoglobulin (BLG) or sodium caseinate (SC) was studied in the presence of Fe-bisglycinate, NaFe-EDTA or FeSO₄. Lipid oxidation was evaluated by following the peroxide value (PV) and the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) over 7 days. At pH 6.5, in the presence of iron complements, the integrated values at 7 days, namely iPV and iTBARS, were lower with BLG than with SC. SC possesses phosphate groups having more affinity for iron ions than carboxylate residues. SC stabilized emulsions were more oxidized with Fe-bisglycinate or FeSO₄ than with NaFe-EDTA. These results indicate that the competition for iron complexation between functional groups of protein and salt counter-ions (glycinate, sulfate or EDTA) appear as a key factor in oxidation.

Keywords: *Anemia, iron fortification, lipid oxidation, Fe-bisglycinate, NaFe-EDTA.*

III. Introduction

Iron is an essential trace element in animal and human nutrition. It plays an essential role in oxygen transport and storage as well as in redox reactions. A deficiency in iron in the diet can induce: (i) anemia, which concerns about 30 % of the world population (especially women, young children and teenagers); (ii) alteration in mental development (Pollitt, 1993); and (iii) decrease in immunity (Thibault *et al.*, 1992). Iron deficiency is widely spread in industrial as well as in developing countries (Hurrell *et al.*, 2002). Among the different strategies available today to fight against this public health problem, the development of iron fortified food appears as the most cost-effective, and the best appropriated long-term approach (Martinez-Navarete *et al.*, 2002). However, incorporation of iron into complex systems such as food products induces various problems such as oxidation and precipitation, and therefore a reduced bioavailability (Hurrell *et al.*, 2004). The main problem to achieve efficient iron fortification is to find an iron salt that gives good absorption without producing any sensory changes.

Lipid oxidation is often a key factor in the quality and shelf-life of fortified foods. Lipids in foodstuffs are often found as emulsions. Oxidation of emulsified lipids generally occurs at the oil/water interface. It mainly depends on the concentration levels of prooxidants, antioxidants and oxidizable lipid substrates in the two phases as well as on their physical location (Cho *et al.*, 2002). One of the oxidation mechanisms of emulsified lipids lies in the production of free radicals, catalyzed by iron ions (Zhiyong & Yuanzong, 2007). It results in rancidity with the well known development of unpleasant odor and flavor but also a potential lipid oxidation in stomach and intestinal cells.

According to Diaz, Dunn, McClements & Decker (2003), proteins, such as milk proteins, can bind iron ions and thus inhibit oxidative reactions in oil-in-water (O/W) emulsions. This suggests that milk proteins could act as natural antioxidants. This property can be explained by the presence of negatively charged groups such as phosphoseryl and the numerous carboxylate residues which constitute the main sites of interactions of milk proteins with bivalent cations (mainly calcium, iron and zinc). However, proteins which are able to complex metallic ions could also be responsible for oxidation initiation. It is related to their ability to strongly adsorb at the oil interface and to facilitate contact between adsorbed metallic ions and the oil phase (Villiere *et al.*, 2005 ; Guzun-Cojocar *et al.*, 2010).

Concerning food fortification with iron, the goal is also to protect iron against oxidation. Food industry aims at controlling the reactivity of metallic ions by chelating those (Diaz *et al.*, 2003). Chelating agents currently used are either ethylenediaminetetraacetate (NaFe-EDTA) or two glycines (ferrous bisglycinate). These are mainly used to fortify emulsions such as sauces (Thuy *et al.*, 2003) or flavored milk products (Osman A., 2002 ; Hurrell *et al.*, 2004). Iron is highly chelated both in NaFe-EDTA and in ferrous bisglycinate. Ferrous bisglycinate chelate is reported to be composed of two glycine units bound by a ferrous iron in a double heterocyclic structure (Ashmead *et al.*, 1985), which neutralizes the valence of the ferrous iron. These iron forms have two advantages: (i) iron is protected from reaction with dietary components that inhibit iron absorption, and (ii) irritation of the gastrointestinal surfaces by a reduction of cell oxidation is reduced. The bisglycinate chelate is very interesting because it leads not only to iron protection but also to an increase of its bioavailability thanks to its “nutritionally amino acid nature” (Ashmead, 2001). However, among the numerous studies dealing with chelates-iron bioavailability in human organism (Bovell-Benjamin *et al.*, 2000 ; Hurrell *et al.*, 2004), very few focus on the impact of iron chelates on the quality and functionality of food components. Oxidation is susceptible to occur, especially for foodstuffs rich in proteins and fats, such as dairy products. Besides, iron EDTA complex, that has often been chosen in iron deficiency treatment, is now not recommended because of its ability to capture other metallic cations, such as copper, zinc, lead, etc. (Viteri *et al.*, 1995 ; Hurrell *et al.*, 2004) and the risk of accumulation in the liver.

The aim of this study was to evaluate the ability of iron–chelates (NaFe-EDTA and ferrous bisglycinate) to avoid oxidation induced by iron ions in oil/water (O/W) emulsions stabilized by proteins. Two milk proteins, sodium caseinate (SC) and β -lactoglobulin (BLG) were used to stabilize O/W emulsions enriched in iron chelates. They were chosen for the presence or the absence of phosphorylated groups, respectively. The oxidative stability of these emulsified systems was followed by: i/ the formation of lipid hydroperoxides and ii/ the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). It therefore focused on the genesis of primary and secondary oxidation products, respectively. The electric net charge of emulsion droplets was also determined in order to better understand the impact of iron interaction with the interface and therefore the underlying effect of the chelating properties of the milk proteins.

IV. Materials and Methods

Materials

Canola (*Brassica campestris*) seed oil was purchased from a local grocery (Carrefour, France). Fatty acids were as follows: 8 % (w/w) saturated fatty acids, 60 % (w/w) monounsaturated fatty acids (58 % oleic acid residues) and 32 % (w/w) polyunsaturated fatty acids with 23 % (w/w) linoleic acid residues (ω -6) and 9 % α -linolenic acid residues (ω -3). This oil was chosen because of its large concentration in many polyunsaturated triglycerides, which can be easily oxidized. Moreover, this oil is also known for its health benefit in the prevention of cardiovascular diseases.

Sodium caseinate (SC) (91.35 % (w/w) of the total protein content) was purchased from Armor Protein (France). According to the supplier data, its weight distribution in casein was 38.46 % α _{S1}-CN, 35.77 % α _{S2}-CN, 12.77 % β -CN, 10 % κ -CN, and 3 % γ -CN. β -lactoglobulin (BLG) was obtained by selective precipitation of whey proteins with sodium acetate (Fox *et al.*, 1967), and stored in solution at +4 °C. A commercial whey powder (BIPRO Danisco, 92.4 % proteins among which 14.4 % α -lactalbumin, 4.1 % BSA and 72 % β -lactoglobulin) was used for this purpose. Dialysis bags (22 mm x 10 668 mm dry diameter; molecular weight cut-off of 3500 g·mol⁻¹) were purchased from SnakeSkinpectrum[®] (Pierce Chemical Company, U.S.A.) and used to desalt BLG solution according to the purification method optimized by Loupiac, Bonetti, Pin, & Calmettes (2006).

Sodium and Iron Ethylenediaminetetraacetic (NaFe-EDTA), ferrous sulfate (FeSO₄ • 6H₂O), and ferrous bisglycinate (Ferrochel[®] named in this paper Fe-BIS, and containing 20 % w/w of iron) were purchased respectively from Sigma Aldrich (France), Prolabo (France) and Idéactif (France).

Methods

Preparation, Characterization and Storage of Emulsions

O/W emulsions were done with 30 % (v/v) of canola seed oil and 70 % (v/v) of acetate-imidazole buffer (0.1 M each, pH 3.5 or 6.5). Proteins, SC or BLG, were added up to 0.86 mM. One day before use, SC was dissolved at pH 6.5, then pH was slowly adjusted to

pH 3.5 and the solution was gently stirred overnight at + 4 °C to dissolve entirely proteins and avoid foaming. The solutions were let warm up to room temperature just before use and pH was adjusted when necessary. O/W emulsions were prepared in two steps process: first a pre-emulsification and second a homogenization. In the first step, the oil and the aqueous phase were blended three times for 1 min at 21,000 rpm using a rotor-stator homogenizer equipped with a 12 mm diameter head (Polytron® PT 3100, Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland). In the second step, the coarse emulsions were homogenized four times at 35 MPa using a one-stage high-pressure valve homogenizer (Stansted, Fluid Power LTD, U.K.). The different iron salts were dissolved in ultrapure water (15 MΩ resistivity, Milli-Q system) previously bubbled with N₂ in order to remove dissolved oxygen and then dissolved in emulsions under stirring at room temperature. The iron salts were dispersed in the N₂ saturated buffer for final concentration of 0.36 mM and 1.78 mM iron in emulsions. For all solutions, 0.1 % (w/v) of sodium azide was added to prevent bacterial growth.

The particle size distribution ($d_{3,2}$) of the emulsions was measured using a Coulter LS 230 laser light scattering instrument (Malvern Instruments, Worcester, U.K.). Results are given in surface mean diameter $d_{3,2} = (\sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2)$. Droplet size distribution was measured at 0, 1, 5, 12, 24, 48 and 168 h after homogenization to monitor emulsion stability. At pH 3.5, the particle size distribution of the emulsion was bimodal, and the mean diameter of the major population was recorded only.

The emulsion droplet net charge (zeta-potential, ζ) was measured by direct injection of diluted oil/water emulsions (1:1000, sample: acetate-imidazole buffer, pH 3.5 or 6.5) into the measurement chamber of a ZEM 5003 Zetamaster (CAD instrumentation, Les Essarts Le Roy, France). Reported values of ζ -potential measurements were mean values of three separate injections, with five readings per injection.

The physical stability of the emulsion was checked by measuring the creaming index. Ten grams of emulsion were transferred into a test tube (internal diameter 16 mm, height 160 mm), and then stored for 168 h at 30 °C. After storage, the emulsion separation into a thin « creamed » layer at the top and a transparent « serum » layer at the bottom was measured through the total height of the emulsion (H_E) and the height of the serum layer (H_S). The

extent of creaming was characterized by the creaming index calculated as $\frac{H_S}{H_E} \times 100$.

Determination of Lipid Oxidation

Lipid peroxides were the primary oxidation products quantified using the protocol adapted from Nielsen (1994). To monitor the formation of lipid hydroperoxide during storage, emulsions (4 mL) were placed in test tubes with sealed screw-caps at 30 °C in the dark. Then, 2 g of emulsion were mixed with 25 mL of chloroform/acetic acid (2:3, v/v). The concentration in peroxide was determined by titration by sodium thiosulfate using starch indicator (Nielsen, 1994). This gives the peroxide value (PV) of the emulsion.

The formation of secondary oxidation products was monitored by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using the method of McDonald and Hultin (McDonald & Hultin, 1987). TBARS were determined by mixing 0.3 mL (final volume adjusted to 1.0 mL with deionised water) of emulsion with 2.0 mL of TBA reagent (15 % (w/v) trichloroacetic acid, 0.375 % (w/v) thiobarbituric acid, 0.1 % ethylenediaminetetraacetic acid and 0.1 % n-propyl galate in 0.25 M HCl) in test tubes. The tubes were placed in a boiling water bath for 20 min. The tubes were cooled to room temperature for 10 min and then centrifuged (1000 g) for 15 min. After 10 min incubation at room temperature, the absorbance was measured at 532 nm. Concentrations of TBARS were determined using a standard curve prepared using 1,1,3,3-tetraethoxypropane.

The evolution of PV and TBARS concentrations was followed during 7 days. The integrals at time $t = 7$ days, $iPV = \int_0^t PV dt$ and $iTBARS = \int_0^t TBARS dt$, were used as global indicators of oxidation.

For emulsions containing iron, the evolution of lipid peroxidation was followed and compared to the reference system without iron. For iPV , the relative increase in oxidation due to iron salts was calculated as follows: $\frac{iPV_{Fe} - iPV_0}{iPV_{Fe}}$, with iPV_{Fe} being the iPV at 7 days in the presence of iron salts, and iPV_0 being the iPV at 7 days without any iron salt.

The same calculation was done for $iTBARS$: $\frac{iTBARS_{Fe} - iTBARS_0}{iTBARS_{Fe}}$, with $iTBARS_{Fe}$ being the $iTBARS$ at 7 days in the presence of iron salts, and $iTBARS_0$ being the $iTBARS$ at 7 days without any iron salt.

In order to simultaneously compare the kinetics of primary and secondary products of oxidation that have been generated over time, normalized values of indices were also calculated as follows: iPV/iPV_{\max} with iPV_{\max} the maximum value measured for iPV during the 7 days experiment and $iTBARS/iTBARS_{\max}$ with $iTBARS_{\max}$ the maximum value measured for $iTBARS$ during the 7 days experiment.

Each sample (emulsion with or without iron in each condition) was made in duplicate and analyses (PV and TBARS) were done in triplicate.

V. Results and Discussion

Physical and chemical properties of SC and BLG stabilized emulsions without iron salts

This study focuses on O/W emulsions stabilized by two types of milk protein (sodium caseinate, SC and β -lactoglobulin, BLG) at two different pH (6.5 and 3.5). At pH 6.5 the distribution was monomodal whereas at pH 3.5 it was bimodal, both for SC and BLG. At pH 6.5 the surface diameter ($d_{3,2}$) was $0.82 \pm 0.07 \mu\text{m}$ for SC and $0.81 \pm 0.01 \mu\text{m}$ for BLG stabilized emulsions. At pH 3.5, close to the pI (4.94-5.43) of the two proteins, the droplet size was bimodal and the total particle surface slightly decreased ($S/V \propto 1/d$). As a consequence, the surface exchange available for iron ions between oil and aqueous phase was slightly lower at pH 3.5 than at pH 6.5. The droplet size distributions did not change during storage. Moreover, no phase separation (zero creaming index) was noticeable, both for proteins, neither at pH 6.5 nor at pH 3.5. The relative stability of the particle size diameter for each studied condition during the 7-days storage insured that the fat globule diameter factor was probably not implied in the observed oxidation kinetics (quasi-constant developed surface area).

The droplet net charge of particles is considered as an important factor in lipid oxidation because of electrostatic interactions with iron ions (Mei *et al.*, 1998b). At pH 6.5, i.e. at $pH > pI$, both SC and BLG proteins have a negative net charge. The SC stabilized oil droplets had a smaller negative charge (ζ potential = -43.6 ± 0.5 mV) than the droplets stabilized by BLG (ζ potential = -49.2 ± 0.08 mV) (Tableau 7). It was surprising because the anionic groups per mole of protein (glutamyl, aspartyl and phosphoseryl) were more numerous in SC. However, it could be explained by the presence of traces of trivalent, bivalent and/or monovalent cations in SC powders. Ca^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$ and Na^+ were found to be 14, 5 and 33 mg

per kg of powder, respectively. It could also be related to the different structures and surface rheologies of the adsorbed protein layer at the O/W interface between these two milk proteins (Dickinson, 2001). Similar trends were observed for sodium caseinate stabilized corn oil in water emulsions (Hu *et al.*, 2003b) and for β -lactoglobulin stabilized hexadecane in water emulsions (Kellerby *et al.*, 2006). At pH 3.5, the net charge value was also higher for BLG (ζ potential = $+38.0 \pm 2.4$ mV) than for SC (ζ potential = $+23.8 \pm 0.5$ mV) (Tableau 7). It usually led to an increase of Coulombic repulsive forces with cations such as Fe^{2+} . Considering this single parameter, at $\text{pH} < \text{pI}$, the emulsions stabilized by β -lactoglobulin should thus be less sensitive to oxidation by Fe^{2+} than emulsions stabilized by SC.

The oxidative stability of the emulsions in the absence of added iron salts was not perfect. The formation of lipid peroxide compounds was observed in small amounts: iPV (Tableau 8) and iTBARS (Tableau 9) values slowly increased during storage whatever the milk protein used. Therefore, all four emulsions stabilized by milk proteins without added iron salts were slightly oxidized after 7 days. The oxidation was less important for pH 3.5 compared to pH 6.5, maybe because of a lower total interface.

V.1 Effect of iron salts on the primary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 6.5

Among the various means currently proposed by the food industry to control the reactivity of metallic ions, chelation seems interesting (Diaz *et al.*, 2003). NaFe-EDTA and Fe-BIS salts are good examples of chelates.

It is rather difficult to evaluate the effect of pH, proteins at interface and complex type independently of the rate of oxidation. As an example, BLG emulsions containing FeSO_4 gave a PV value that increased in the first days of storage and then decreased after 4 days, while TBARS reached a plateau after 4 days (Figure 29a and Figure 29b). In order to compare all results, we firstly considered the integrated values at 7 days, namely iPV and iTBARS. It gave a better understanding of the mean oxidative behavior over the 7-days storage (Tableau 8 and Tableau 9).

At pH 6.5, i.e. when the interface was negatively charged (Tableau 7), the iPV values obtained appear to depend as well on the protein as on the iron salt (nature and amount) used in the emulsion (Tableau 8).

Tableau 7 : Zeta Potential (mV) of O/W emulsions stabilized by sodium caseinate (SC) and β -lactoglobulin (BLG) at two pH and at 20 °C after addition of different iron salts (NaFe-EDTA/Fe-bisglycinate (Fe-BIS)/FeSO₄) for two different concentrations

pH	Protein type	Without iron salts	NaFe-EDTA		Fe-BIS		FeSO ₄	
			0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM
6.5	SC	-43.6 ± 0.5	-43.1 ± 0.3	-44.5 ± 1.1	-40.9 ± 0.2	-32.4 ± 0.5	-38.8 ± 0.4	-29.2 ± 1.2
	BLG	-49.2 ± 0.2	-48.8 ± 0.6	-48.9 ± 0.1	-47.5 ± 0.5	-47.7 ± 0.4	-45.6 ± 1.5	-40.5 ± 3.1
3.5	SC	+23.8 ± 0.5	+22.0 ± 0.7	+23.0 ± 0.4	+25.0 ± 0.5	+26.0 ± 0.3	+24.0 ± 0.2	+27.0 ± 0.2
	BLG	+38.0 ± 2.4	+36.9 ± 3.5	+37.6 ± 0.7	+37.6 ± 2.0	+37.8 ± 2.5	+37.0 ± 2.5	+40.9 ± 1.7

For SC, in the presence of 0.36 and 1.78 mM of NaFe-EDTA, iPV was 0 as it was 7.15 for the emulsion without added iron salt. These results could be explained by two factors:

- Firstly, the iron in the NaFe-EDTA cage was strongly chelated. The affinity constant of EDTA for iron ions was higher than for the clusters of phosphoserine residues (Furia, 1972). As a consequence, there was no free iron from this chelate.

- Secondly, using NaFe-EDTA as the iron source also brought small quantities of Na₂EDTA. Part of the EDTA which was not associated to bivalent ion complexed the free iron traces from SC. EDTA complexed also Ca²⁺ thus inducing a “disorganization” of sodium caseinate (Ward, Goddard, Augustin, & McKinnon, 1997). As a consequence, the acid residues that were more active were exposed and gave an increased free-radical-scavenging activity (Diaz *et al.*, 2003).

For all these reasons, the use of NaFe-EDTA led to a complete inhibition of lipid oxidation, as previously reported by Jacobsen *et al.* (2001) and Hu, McClements, & Decker .

Conversely, the addition of Fe-BIS to SC led to a significantly higher iPV than the reference, whatever the amount added (0.36 or 1.78 mM).

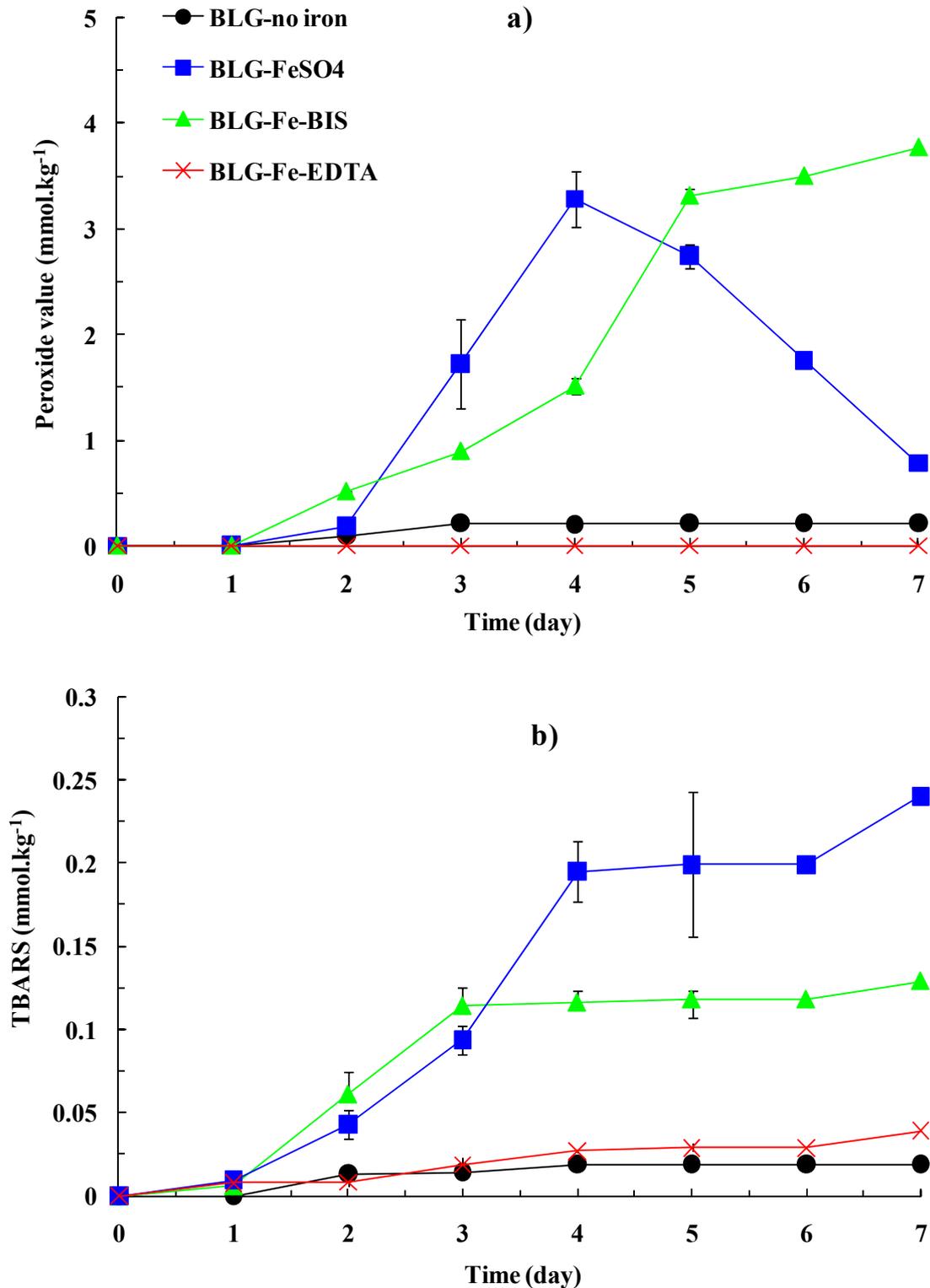


Figure 29 : Evolution of the oxidative state of β -lactoglobulin (BLG) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 3.5: a) Peroxide value and b) TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size

This indicated that Fe-BIS was less efficient to bind iron than NaFe-EDTA. The complex formed by the two glycines and the ferrous iron was certainly broken in presence of SC. This observation confirmed previous results related to the effect of Fe-BIS and NaFe-EDTA on the viscoelastic characteristics at the oil interface stabilized by SC (Guzun-Cojocaru *et al.*, 2010). It was observed that Fe-BIS allowed a contact between the iron and the protein interface of the fat oil droplets. The increase of lipid oxidation observed in the present study could be explained by the access of iron to the interface. Surprisingly, the addition of Fe-BIS to the interface stabilized with SC at pH 6.5 produced very similar results (iPV) as the addition of FeSO₄ (Tableau 8). This was disappointing as bis-glycinate was considered as a promising chelate for iron fortification.

The iPV for BLG stabilized emulsions evolved differently to SC stabilized emulsions. The addition of NaFe-EDTA (0.36 or 1.78 mM) to the BLG stabilized emulsions did not induce any change in the oxidation state (Tableau 8). It was explained here above that the iron traces (or any other transitional metal) were complexed by EDTA. Atomic absorption analysis showed that BLG did not contain any transition metal (Fe or Cu). The slight oxidation observed for BLG stabilized emulsions without added iron salts (Tableau 8) could be attributed to some metal contamination during the emulsifying process. In fact, the homogenizer was made in stainless steel and could release some metal traces.

Tableau 8 : *Integrated Peroxide Value (iPV) at 7 days for O/W emulsions stabilized by sodium caseinate (SC) and β -lactoglobulin (BLG) at two pH after addition of different iron salts: NaFe-EDTA/Fe-BIS (Fe-bisglycinate)/FeSO₄ = iron sulfate (two amounts). Samples held at 30 °C during 7 days*

pH	Protein type	Without iron salts	NaFe-EDTA		Fe-BIS		FeSO ₄	
			0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM
6.5	SC	7.15 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	9.50 ± 0.10	11.00 ± 0.06	10.10 ± 0.01	11.70 ± 0.02
	BLG	2.45 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.50 ± 0.07	3.30 ± 0.02	2.50 ± 0.07	13.10 ± 0.04
3.5	SC	3.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.50 ± 0.00	5.70 ± 0.01	9.00 ± 0.14	4.80 ± 0.08	9.40 ± 0.23
	BLG	1.06 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.06 ± 0.01	11.60 ± 0.09	2.60 ± 0.04	10.10 ± 0.06

The addition of Fe-BIS (0.36 or 1.78 mM) to BLG stabilized emulsions did not significantly modify the iPV as compared to the reference (BLG emulsion without any added iron salt;

Tableau 8). On the contrary, iPV dramatically increased in the presence of FeSO₄ at the highest amount level of Fe²⁺ (1.78 mM). In this case, iPV was found four times higher than the reference BLG emulsion (Tableau 8).

To better understand the evolution of iPV as a function of the milk protein used to stabilize the O/W interface, it was interesting to consider the electrical net charge of the emulsion droplets (Tableau 7). Interactions between adsorbed proteins at the oil drop interface and iron ions would decrease the net charge of fat globule at pH 6.5. This net charge decrease would lead to a rapid lipid oxidation (Mei *et al.*, 1998a ; Decker *et al.*, 2005). The addition of NaFe-EDTA (0.36 or 1.78 mM) was the only case which displayed any modification of the global net charge of the fat globules stabilized by the two types of milk proteins. In the presence of Fe-BIS and FeSO₄ respectively, the net charge of droplets stabilized by SC was reduced by 6 % and 11 % for 0.36 mM and by 26 % and 33 % for 1.78 mM (Tableau 7).

The presence of Fe-BIS in BLG stabilized emulsions decreased the negative net charge only by 3 %, for both amounts. With FeSO₄, the negative net charge decreased by 7 % for 0.36 mM and by 18 % for 1.78 mM.

At pH above *pI*, the iPV was strongly correlated to the change in the net charge of the interface after addition of various iron salts (Figure 30). The oxidation increased as the interface net charge of the emulsion became less negative. The different affinities of the various residues of proteins for ferrous iron also explained the differences observed in oxidation levels for the two studied protein systems. Sodium caseinate has more negative sites able to bind iron than β-lactoglobulin does. Additionally, the affinity of the phosphate groups of sodium caseinate for iron is higher and stronger than that of carboxylate groups ((Sugiarto *et al.*, 2009); for memory, β-lactoglobulin has no phosphoserine residues). It was worthy to note that the increase in iPV with Fe-BIS was observed with SC but not with the BLG interface. The phosphate groups of SC explained the high degree of oxidation obtained for emulsions stabilized by SC in comparison to BLG.

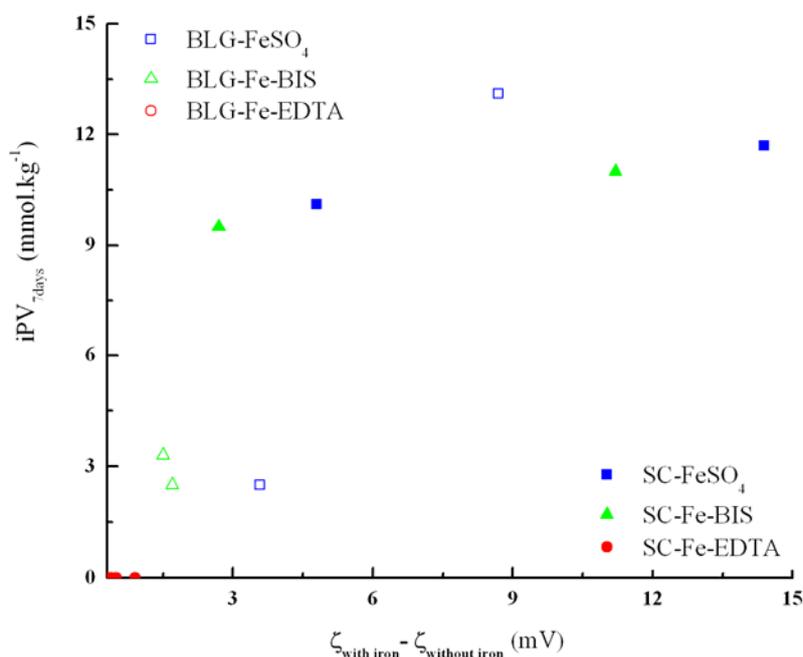


Figure 30 : Evolution of the oxidation state of BLG stabilized O/W emulsion as a function of the change in the interface net charge ($\zeta_{\text{with iron}} - \zeta_{\text{without iron}}$) of the emulsions after addition of various iron salts at pH 6.5

V.2 Effect of iron salts on the primary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 3.5

Proteins can create cationic O/W interface: to that purpose, pH should be inferior to pI. In such a case, we hoped to avoid contact between iron and O/W interface. Generally, the emulsions stabilized with protein in acidic medium exhibit high oxidative stability (Hu *et al.*, 2003b ; Surh *et al.*, 2005).

In this work, the iPV at pH 3.5 with SC and BLG, with or without iron salts, was always lower than at pH 6.5 (Tableau 8). According to Sugiarto & Singh (2009), a change in pH generally modifies the complex formation between metallic ions and proteins: hydrogen ions compete with metallic ions to bind the protein. At low pH, the anionic groups of aminoacyl residues tend to become protonated. As a consequence, their affinity for cations decreases, and therefore reduces their complexation with the protein.

At pH 3.5, the addition of NaFe-EDTA to the SC stabilized emulsions reduced the iPV (Tableau 8). The iPV for NaFe-EDTA was still lower than the iPV obtained with other added iron salts: 0 for 0.36 mM, as at pH 6.5, but 1.5 for 1.7 mM at pH 3.5 although it was 0 at

pH 6.5 (Tableau 8). The fact that iPV is not zero could be due to a possible partial dissociation of the chelate under acidic conditions ($FeEDTA \Leftrightarrow Fe^{2+/3+} + EDTA$) (Drago & Valencia, 2008). This could explain this incomplete inhibition of oxidation by EDTA at pH 3.5. The use of a high concentration of NaFe-EDTA in acidic conditions corresponded to a non negligible concentration in free iron ions that could interact with phosphoserine groups at the interface and could thus increase lipid oxidation rate.

iPV increased with Fe-BIS addition in acidic conditions, compared to the reference (Tableau 8). It could be hypothesized that Fe-BIS was more destabilized than NaFe-EDTA in acidic conditions because the stability constant is weaker than for NaFe-EDTA (Drago & Valencia, 2008). By adding Fe-BIS at pH 3.5, the iPV increased by 47 % for 0.36 mM and by 66 % for 1.78 mM, compared to the system without any iron salt (Tableau 8). The presence of $FeSO_4$ also modified iPV, depending on the iron concentration. For 0.36 mM of $FeSO_4$, the iPV increased by 37 % compared to the reference SC stabilized emulsion without any iron salt; 68 % with 1.78 mM (Tableau 8).

The oxidative effect of the three iron salts on BLG stabilized emulsions was totally different than those observed for SC emulsions. The iPV decreased at pH 3.5, from 1.06 (without added iron) to 0, whatever the amount of NaFe-EDTA. In the presence of the two other iron salts, the iPV of the BLG emulsions increased: by 65 % for 0.35 mM and 91 % for 1.78 mM of Fe-BIS; by 59 % for 0.36 mM and 89.5 % for 1.78 mM of $FeSO_4$.

Contrarily to what was previously observed at pH 6.5, no clear correlation was established between iPV and variations in the interface net charge of the emulsions due to the addition of the various iron salts. The electrostatic interactions between surfactant and iron salts from aqueous phase were not the only parameter implied in the mechanism of oxidation. These observations under acidic conditions showed that the “freedom” of iron ion was also a key parameter. The increase in PV is due to an increase of iron solubility at acidic pH (Mei *et al.*, 1998b). The slight difference observed between the iron salts Fe-BIS and $FeSO_4$ could be explained by the different stability of these iron chelates in acidic conditions and the concentration of the resulting “free” iron ion concentration. This result could be connected to those obtained from previous studies on the effect of iron chelates at O/W interface stabilized by milk proteins: the viscoelastic behavior of BLG at the O/W interface changed in the presence of iron salts except with NaFe-EDTA (Guzun-Cojocar *et al.*, 2010).

V.3 Effect of iron salts on the secondary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 6.5

TBARS represents the end products of lipid hydro-and alkylperoxides decomposition. In the time scale of the oxidation phenomenon, oxidized species as given by TBARS analysis usually appear after the peroxide compounds. This TBARS method can be used when the oil fatty acids contain three or more double bonds and when emulsions contain low amounts of aldehydes as reductive carbohydrates.

At pH 6.5, there was no significant changes of the TBARS in the presence of NaFe-EDTA compared to the SC stabilized emulsion without salt. The addition of 1.78 mM of Fe-BIS chelate or FeSO₄ highly increased the iTBARS, by 69 % or by 54 %, respectively, as previously noticed for iPV results.

The value of iTBARS for BLG stabilized emulsions at pH 6.5 strongly depended on the nature of iron salts added. The addition of 1.78 mM NaFe-EDTA gave a similar pattern to the control sample, in the same range of what was measured with SC stabilized emulsions (Tableau 9). It was also in the same range to what was measured for SC stabilized emulsions. However, iTBARS for 1.78 mM Fe-BIS or FeSO₄ in BLG stabilized emulsions was quite different. The intensity of iTBARS increased by 57 % for Fe-BIS and by 70 % for FeSO₄.

For all samples the global secondary products formation (iTBARS) were in good correlation with the global primary oxidation products formation (iPV) (Tableau 8 and Tableau 9). It was definitively possible to conclude that the oxidative stability of the emulsion in the presence of iron at pH 6.5 was higher for BLG than for SC.

V.4 Effect of iron salts on the secondary products of oxidation in SC and BLG stabilized emulsions at pH 3.5

The iTBARS for SC emulsions was in the following increasing order: NaFe-EDTA < no added iron salt < FeSO₄ < Fe-BIS (Tableau 9), whereas the iPV was: NaFe-EDTA < no added iron salt < Fe-BIS < FeSO₄ (Tableau 8). The evolution in TBARS for BLG stabilized emulsions containing different iron salts at 1.78 mM at pH 3.5 was slightly different than that measured with iPV (Figure 29b). The oxidation degree was as follows: no added iron salt <

NaFe-EDTA < Fe-BIS < FeSO₄ (Tableau 9); whereas the formation of hydroperoxide compounds was: NaFe-EDTA < no added iron salt < FeSO₄ < Fe-BIS (Tableau 8).

For emulsions containing NaFe-EDTA, the formation of the secondary products was always the lowest. According to Alamed, McClements, & Decker, (2006), the slight oxidation observed with TBARS analysis could be explained by a reduced chelating activity of EDTA during the heating phase of the method (Tableau 9).

Tableau 9 : *Integrated TBARS (iTBARS) at 7 days for O/W emulsions stabilized by sodium caseinate (SC) and β-lactoglobulin (BLG) at two pH after addition of different iron salts: NaFe-EDTA/Fe-BIS (Fe-bisglycinate/FeSO₄ = iron sulfate (two amounts)). Samples held at 30 °C during 7 days*

pH	Protein type	Without iron salts	NaFe-EDTA		Fe-BIS		FeSO ₄	
			0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM
6.5	SC	0.043 ± 0.004	-	0.037 ± 0.001	0.060 ± 0.050	0.140 ± 0.020	-	0.094 ± 0.004
	BLG	0.036 ± 0.010	-	0.042 ± 0.001	0.056 ± 0.004	0.084 ± 0.001	-	0.121 ± 0.017
3.5	SC	0.025 ± 0.001	-	0.037 ± 0.003	-	0.065 ± 0.006	-	0.038 ± 0.002
	BLG	0.010 ± 0.002	-	0.038 ± 0.002	0.043 ± 0.001	0.084 ± 0.013	-	0.187 ± 0.032

In our case, TBARS determination was performed in boiling water and can thus explain the observed residual oxidative. Fe-BIS, as an example, could dissociate during the boiling step of the TBARS analysis, which could contribute to the inversion of the order of oxidation activity between PV and TBARS for Fe-BIS and FeSO₄.

The partial dissociation of NaFe-EDTA in acidic conditions could partly explain such differences in the oxidative stability. A second factor could be the increase of the antioxidant activity of BLG during the heating process (Taylor & Richardson, 1980 ; Elias *et al.*, 2007).

The improved activity could be attributed to an increase in the solvent accessibility for sulfhydryl group (Taylor & Richardson, 1980). The sulfhydryl group is typically buried when the protein is in its native conformation. The sulfhydryl groups are radical scavenger that can inhibit lipid oxidation. Therefore, this hypothesis could also explain the observed differences in the oxidative stability between the two proteins. Contrarily to BLG, casein is poor in

cysteinyll residues. The SC stabilized emulsions was more oxidized than the BLG stabilized emulsions at pH 3.5, probably because of the lack of antioxidative sulfhydryl groups. It is noticeable that other antioxidant residues (such as methionyl, tryptophyl) exist and can be exposed when milk proteins are thermally modified (Elias *et al.*, 2007).

As recommended by the AOAC (Association of Official Agricultural Chemists), it is necessary to combine analyses of primary and secondary products of oxidation that are generated to account for the whole kinetic aspects of the oxidation phenomenon that occurs in the system. Figure 32 displays a combination of the results obtained by the two methods. It illustrates the effect of the iron complements on the kinetic of oxidation in O/W emulsions stabilized with BLG at pH 3.5. It was noteworthy (Figure 32) that, in the presence of FeSO_4 or Fe-BIS, the oxidation kinetics was the fastest for both primary (iPV/iPV_{\max}) and secondary products ($iTBARS/iTBARS_{\max}$).

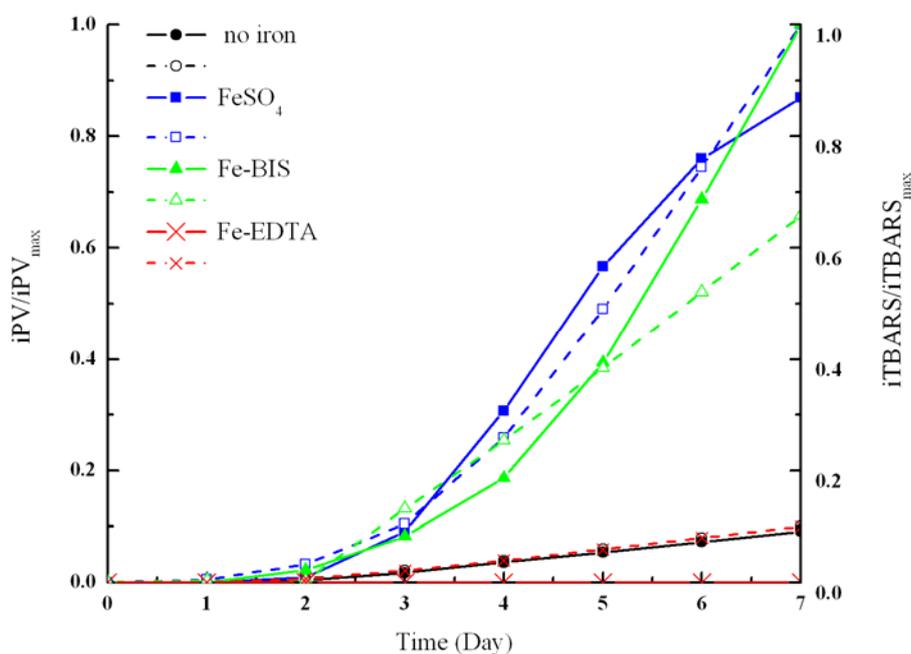


Figure 31 : Evolution of the global oxidative state of β -lactoglobulin (BLG) stabilized O/W emulsions after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 3.5. This representation combines the evolution in normalized primary and secondary products of oxidation, expressed as the iPV/iPV_{\max} (full lines) and the $iTBARS/iTBARS_{\max}$ (dashed lines) for each iron forms studied

The iPV at 7 days indicated a similar oxidized state for the system with Fe-BIS and FeSO₄. The combined plot PV/TBARS indicated that the formation of primary products of oxidation with FeSO₄ reached a quasi-plateau with a rapid apparition of secondary products of oxidation, whereas the initiating reaction with Fe-BIS was still increasing with a much lower and slower formation of secondary products of oxidation than with FeSO₄. Combined kinetics analysis allowed concluding that the initiating and propagating reactions in the presence of Fe-BIS led to a larger formation of decomposed hydro or alky peroxides with time, whereas these reactions were almost finished for FeSO₄.

VI. Conclusions

These results demonstrate that the nature of the proteins and the iron salts play a crucial role in the oxidative stability of emulsions enriched in iron. The affinity of milk proteins to bind free iron is the first factor that controls its transfer to the oil/water interface. Sodium caseinate possesses more binding sites for ferric ion than β -lactoglobulin because of the presence of phosphoserine residues. The more compact structure of β -lactoglobulin (globular protein), compared to the more flexible and open structure of caseinate, could also influence the binding affinity for iron. In the presence of Fe-BIS, at pH 6.5 (above the *pI* of the proteins), the oxidative stability of BLG stabilized emulsions is higher than that of SC stabilized emulsions. The ability of the complex to retain iron ion and to avoid “free” ferric ion is the second important factor to be controlled. It is obvious that the presence of “free” ion in bulk influences the oxidation rate. The difference between ionic salt (FeSO₄) and chelates (Fe-BIS and NaFe-EDTA) is governed by the pH and the protein type used to stabilize emulsion which can destabilize the complex by competition for chelation. A third key factor in oxidation of such systems could be the amount and presence of antioxidant groups in the protein structure, which brings to the system an additional free radical scavenging activity. Nevertheless such a mechanism was not demonstrated in the present study. To sum up, the competition for iron ions between functional groups of protein and salt counter-ions (glycinate, sulfate or EDTA) governs the oxidation state of the system in neutral conditions. In acidic medium, the oxidation is mainly governed by the stability of the complex and the possibility to free iron in bulk. It is really difficult to obtain highly bioavailable iron without any side effects. In fact, a very strong complexation of iron could inhibit the absorption of iron in the intestine. Further investigations of the stability of Fe-bisglycinate are needed to ensure its potential to protect food products or stomach and intestinal cells against iron

without inducing oxidation. This work leads to two relevant questions: is it better to consume food enriched in iron at the end of a meal when stomach pH is higher than at the beginning of the meal? Is it sufficient to stabilize emulsion with non-phosphorylated protein or neutral surfactant to avoid oxidation when iron supplements are added?

**Effect of iron chelates on oil-water interface, stabilized by milk proteins: the role of phosphate groups and pH.
Prediction of iron transfer from aqueous phase toward fat globule surface by changes of interfacial properties**

Le contenu de ce chapitre a été publié dans :

Food Hydrocolloids, 24: 364-373

Tatiana Guzun-Cojocaru, Philippe Cayot, Camille Loupiac, Eliane Cases

I. Résumé

Le fer intégré dans des systèmes complexes tels que des aliments induit divers problèmes, comme l'oxydation des lipides ou la précipitation des autres composés présents dans la matrice alimentaire. Par conséquent, ces modifications réduisent sa biodisponibilité et peuvent conduire à la modification fonctionnelle des autres composants alimentaires comme les protéines. L'utilisation de chélates du fer, comme le bisglycinate ferreux, dans un aliment constitue une voie intéressante : en effet, le fer serait protégé et ainsi n'interagirait pas avec la matrice alimentaire. L'objectif de cette étude est d'analyser les effets des chélates de fer sur les propriétés rhéologiques d'une interface de type huile/eau stabilisée par deux protéines de lait ; la β -lactoglobuline, ou le caséinate de sodium, dans différentes conditions environnementales, à 20 °C. Les études concernant l'interface huile/eau ont été effectuées à l'aide d'un tensiomètre à goutte pendant 5000 s. La phase aqueuse était constituée d'un tampon imidazole/acétate de 0,1 M (pH 2, 3,5 et 6,5) contenant la protéine ($0,4 \cdot 10^{-6}$ M) et le sel/chélate de fer ($0,2 \text{ M} \cdot 10^{-6}$ M). Les résultats montrent que, à pH neutre, l'ajout de sels/chélate de fer, tels que le NaFe-EDTA ou le bisglycinate de fer ne modifie pas la structure de l'interface stabilisée par une protéine ne contenant pas de groupes phosphates (β -lactoglobuline). Lorsque le caséinate de sodium est utilisé comme émulsifiant, à pH 6,5, le NaFe-EDTA augmente la vitesse d'abaissement de la tension interfaciale de la protéine à l'interface huile/eau, contrairement au bisglycinate de fer où elle a été inhibée. Le faible transfert des ions de fer vers l'interface stabilisée par la β -lactoglobuline est confirmé par les mesures de zétamétrie et par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Ces résultats permettent de définir les conditions de milieu (physique et chimique) pour un enrichissement efficace et sûr en fer, dans une émulsion huile-dans-eau stabilisée par des protéines.

Mots-clés: *Enrichissement en fer, émulsions huile-dans-eau, protéines, groupes phosphates, activité émulsifiante.*

II. Abstract

Iron incorporated into food systems induces oxidation and precipitation. The consequences are reduced bioavailability and a functional modification of other food components such as proteins. The iron-chelates such as ferrous bisglycinate represent a possibility to avoid side effects, since the iron is protected. The aim of this study is to investigate the effects of iron-chelates compounds on the properties of an oil/water interface stabilized by caseinate or β -lactoglobulin, under environmental conditions at 20 °C. Analyses were performed using dynamic drop tensiometry during 5000 s. The aqueous bulk phase is an imidazole/acetate buffer (0.1 M), containing $0.4 \cdot 10^{-6}$ M protein, and $0.2 \cdot 10^{-6}$ M iron-chelates compounds. The results indicate that, under neutral conditions, the addition of some irons salts (NaFe-EDTA or Fe-bisglycinate) does not change the structure of the interface stabilized by a protein containing no phosphate groups (β -lactoglobulin). In the case of caseinate, NaFe-EDTA addition increases the lowering rate of surface tension at pH 6.5. On the contrary, the lowering rate of surface tension with caseinate is inhibited by Fe-bisglycinate at pH 6.5. Such an effect is not observed with β -lactoglobulin. The low transfer of irons ions from the bulk to the interface stabilized by β -lactoglobulin is confirmed by zetameter and FTIR measurements. These results indicate an effective strategy to follow for controlling the physical and chemical stability of an emulsion stabilized with proteins.

Keywords: *Iron fortification, oil-in-water emulsion, proteins, phosphate groups, emulsifying activity.*

III. Introduction

Iron deficiency is one of the major nutritional deficiencies in the world (Hurrell *et al.*, 2004 ; Stein *et al.*, 2007). 3.5 billions of humans have an iron deficiency (OMS-WHO, 2009). To improve the diet, the ideal strategy aims to include a large variety of iron-rich foods and to increase dietary iron absorption (Mason *et al.*, 2001). The incorporation of iron into many foods (ferrous sulfate generally) induces, however, various problems such as oxidation and precipitation. A consequence is a reduced bioavailability of iron (Wapnir, 1990 ; Hurrell, 1998 ; Hurrell *et al.*, 2004). Iron II salts may be the most important lipid prooxidant and the origin of chemical peroxidation can be simplified to the oxidation mechanism of ferrous ion in ferric ion: $\text{Fe}^{2+} + \text{RH} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^- + \text{RH}$. Chemical reactions are in reality more complicated (Cheng & Li, 2007). Adverse sensory changes result from these chemical reactions and decrease organoleptic quality of chosen food vehicles. Adding ferric sulfate to milk soy infant formula and baby cereals could led to undesirable color change, for example (Mellican *et al.*, 2003).

In order to increase the oxidative stability and to control metal reactivity, the food industry use divalent ion chelators. Several solutions are available, such as Na-EDTA (sodium ethylenediaminetetraacetate), different organic acids like citric and malic acids (Suzuki *et al.*, 1992), phytic acid (hexaphosphateinositol acid; (Li *et al.*, 1993) or antioxidants (Decker, 1998b ; Decker, 1998a). Chelators and antioxidants have an impact on the functionality of other food components: polyphosphates for example alter the functionality of proteins (Sofos, 1986).

Proteins themselves can be effective as natural antioxidants in foods because of their ability to complex divalent ions (Tong *et al.*, 2000) and to scavenge radical species of tyrosyl residues (Narváez *et al.*, 2002 ; Bougateg *et al.*, 2009 ; Nagai *et al.*, 2009). Their ionic groups (phosphoseryl and carboxylic groups) can interact with calcium, iron and zinc (Baumy & Brule, 1988 ; Bennett *et al.*, 2000 ; Gaucheron, 2004b). Nevertheless, the use of proteins as iron chelators could prevent a drawback. Proteins can be unfolded by the process and denaturation alters their metal-binding properties. Divalent ions can induce proteins aggregates and, consequently, loss of protein solubility (Diaz *et al.*, 2003 ; Pitkowski *et al.*, 2009). In conclusion, proteins are not suitable to be used for oxidative stabilization against iron salt in fortified food.

Another potential strategy is to use powerful iron chelators, such as sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid (NaFe-EDTA) or ferrous bis-glycinate chelate (Fe-BIS). These two iron complexes are used at present to fortify emulsions such as sauces (Garby & Areekul, 1974 ; Thuy *et al.*, 2003) or flavored milk products (Osman A., 2002 ; Miglioranza *et al.*, 2003). Due to the strong complexation, both NaFe-EDTA and ferrous bis-glycinate protect from ion exchanges with dietary components that inhibit iron absorption, such as phytic acid. Ferrous bis-glycinate chelate consists of a molecule of ferrous iron attached to two molecules of glycine (Ashmead *et al.*, 1985). Iron bounds to the carboxyl group of glycine through an ionic bound, and to the amino group through a coordinated, chemical bond, to form two heterocyclic rings. Despite numerous studies dealing with iron bioavailability for humans with these chelates (Bovell-Benjamin *et al.*, 2000 ; Hurrell *et al.*, 2004), few studies on the impact of iron chelates on functionality of proteins have been done.

On one hand, proteins are commonly used as emulsifiers. Proteins facilitate the formation and stabilization of oil-in-water emulsions. On the other hand, the ferrous bis-glycinate offers great perspectives in food fortification. Addition of ions, especially divalent ions, changes the emulsifying capacity of proteins (Dauphas *et al.*, 2008). The major for this is in a decrease of solubility and, more precisely, the state of aggregation of the non-adsorbed protein (Dickinson *et al.*, 2003). The structure of the interface made with protein in the presence of divalent ion is also of great importance. The question presented in this paper is to determine whether the ferrous bisglycinate, which is supposed to be a stable complex, changes or not the surfactant properties of milk proteins.

The other question consists of the possibility to avoid the transfer of iron to the oil/water interface in order to avoid lipid peroxidation. The location of iron ion in emulsion, at interface or not, is capital for the impact on lipid peroxidation (Cho *et al.*, 2002). The β -lactoglobulin at the interface could allow iron location at the interface and reduce peroxides already present in fat globules (Kellerby *et al.*, 2006). Whey proteins used to stabilize emulsion and protect against peroxidation in presence of oxygen are not equivalent: the fact that β -lactoglobulin is better than α -lactalbumin may be due to the charges of each protein (Hu *et al.*, 2003a). There is also other hypothesis regarding the effect of the charge: differences in aminoacyl residues that can scavenge free radicals (sulfhydryl group for example) or how the proteins impact the thickness of the emulsion droplet interface. In the present paper, we used protein at interface to protect lipid from peroxidation depending on the different iron chelates added.

For this purpose, the objective of the current study was to determine the impact of various iron chelates, especially Fe-bisglycinate compared with NaFe-EDTA and FeSO₄, on the surface activity of two milk proteins: casein and β -lactoglobulin, using three complementary methods. Firstly, we used the dynamic surface tension measurements to get into the involved mechanism of iron interaction with protein at the interface. Dynamic drop tensiometry, as a non-invasive technique, was applied for measuring proteins adsorption kinetics and viscoelastic modulus of oil/water interfaces.

Then, we used FTIR spectroscopy technique, allowing the investigation of the secondary structure of milk protein in aqueous solution without or with Fe-bisglycinate. Thirdly, ζ -potential measurements were also performed to investigate the impact of various iron salts to the surface charges of milk proteins stabilizing oil interface.

We decided to study both whey proteins and caseins because of their differences in chemical functions, which make them susceptible to bond iron ions: carboxylate groups both proteins, but only phosphate groups for casein.

The present paper will show that no major modification of interfacial activity has been obtained at pH 6.5 with β -lactoglobulin that possess no phosphate group, which is not the case with caseinate. At low pH, the paper will indicate that the two types of protein have had less difference in interfacial behavior. Our reasoning has been based on protonation of function responsible for interaction with iron ion and on the stability of the ferrous bisglycinate at very low pH, corresponding to stomach pH at the beginning of a meal.

Contrarily to other researchers who chose to complex the interface in order to avoid peroxidation of oil (Klinkesorn *et al.*, 2005), we focused our paper not only on the nature of the oil/water interface, but also on the action of different iron chelates on this interface.

IV. Materials and Methods

Materials

Sunflower oil (food grade) supplied by a local distributor (Carrefour, France) was silica-treated to reduce the amount of surface-active impurities, i.e. monoglycerides and fatty acids (Gaonkar, 1989). β -lactoglobulin (BLG) was purified in the laboratory according to Fox, Holsinger, Posati, & Pallansch, (Fox *et al.*, 1967) and was stored at + 4 °C for 7 days before

use. Protein purification was made from a commercial whey powder (BIPRO Danisco, 90.5 wt % of the total protein content; 14.4 % α -lactalbumin, 4.1 % BSA, 72 % β -lactoglobulin) produced with a low heat process in order to avoid protein denaturation as shown previously by Loupiac, Bonetti, Pin, & Calmettes (2006). The powder was suspended in distilled water (73.5 g.L^{-1}) and stirred at ambient temperature overnight. Then, addition of trichloroacetic acid (31 g.L^{-1}) caused the precipitation of whey proteins (α -lactalbumin, bovine serum albumin) except β -lactoglobulin. This suspension was centrifuged at $10,000 \text{ g}$ for 30 min. The supernatant containing β -lactoglobulin was placed in dialysis membranes (cut off 3500 Da). Firstly, this protein solution was dialyzed three times (for at least 2 hours) against distilled water to eliminate all initial and added salts. Secondly, the protein solution was dialyzed against buffered solution (0.1 M acetate/0.1 M imidazole); at pH 6.5, 3.5 and 2 respectively (dialysis buffer was changed at least three times). To prevent bacterial growth 0.1 % (wt/vol) sodium azide was added. The final concentration of protein was $0.4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Sodium caseinate was purchased from Armor Protein (France). The pH of the sodium caseinate solution was adjusted to pH 6.5; pH 3.5; pH 2.0 by the addition of NaOH (2 M) or HCl (2 M), respectively. Iron salt NaFe-EDTA was purchased from Sigma Aldrich, (France), $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ from Prolabo (France) and Fe-bisglycinate (Fe-BIS; Ferrochel ®, 77 % purity) from Idéactif (Paris, France). Iron salts were first dissolved in ultrapure water (electrical resistivity of $18 \text{ M}\Omega$, Milli-Q system) and then added to protein solution to have $0.2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ final concentration.

Methods

Interfacial measurements

Both dynamic surface tension measurements and dilatational rheological properties of the molecular film formed by milk proteins were performed with a drop tensiometer (Cagna *et al.*, 1992) (IT Concept, Longessaigne, France). The apparatus allowed calculating the interfacial tension (γ) by analyzing the profile of the drop according to the Laplace equation:

$$\text{Équation 18} \quad (1/x)[d(x\sin\theta)/dx]=(2/b)-cz$$

where x and z are the cartesian coordinates at any point of the drop profile, b the radius of curvature of the drop apex, θ the angle of the tangent to the drop profile, and c the capillary constant (equal to $g\Delta\rho\gamma$, where $\Delta\rho$ is the difference between the densities of the two liquids, g

the acceleration of gravity and γ the surface tension). A complete description of the experimental set up was proposed by Benjamins, Cagna, Lucassen-Reynders, (1996). Several times per second, the computer calculated three characteristic parameters of the drop, namely area, volume, and interfacial tension. The control unit can either record and plot the changes of γ as a function of time or make the volume of the drop change at a chosen amplitude and frequency in order to measure the surface viscoelastic modulus (ε) as defined by the expression,

$$\text{Équation 19} \quad |\varepsilon| = d\gamma / d \ln A$$

where A is the surface area of the drop. All measurements have been done at a frequency of 0.1 Hz with a drop volume of 25 μL . The variation amplitude of area was 10 %. Measurements were carried out as previously described by Cases, Rampini, & Cayot, (2005). The bulk phase temperature was controlled by water circulation from a thermostat and experiments were carried out at 20 ± 0.1 °C. In these experiments, data were collected beginning from 10 s after the formation of the oil/water interface. All interfacial and viscoelastic curves were plotted as the average of the results of three experiments.

Infrared Measurements and Amide I Spectra analysis

Infrared spectra were recorded with an IFS Vector 22 (Bruker, Germany) spectrometer equipped with mercury–cadmium-telluride detector. Spectral measurements were carried out at 4 cm^{-1} resolution. Interferograms from 250 scans were averaged to obtain one spectrum. All experiments were run on horizontal attenuated total reflectance (ATR) crystal (ZnSe) where solutions were passed. Spectra were collected in the wavenumber range 4000 cm^{-1} to 1000 cm^{-1} (under the control of a computer programmed using the OPUS 2.1 Software (Opus Software, San Francisco, Ca, USA)). The spectra are displayed in terms of absorbance, which was calculated from the reflectance-absorbance spectra using OPUS software. Three measurements were performed for every sample. The ASCII data were imported into Origin version 7.0 (Origin lab Corporation, Northampton, MA, USA). For the study of Amide I band of protein, a smoothing with the Savitsky-Golay method to 5 points is applied. This smoothing is necessary to increase the signal/noise ratio. We applied the second derivative to determine the various slopes of the Amide I band in order to characterize the position and the number of different components (Dong *et al.*, 1990). Preparation of β -lactoglobulin solution,

used for infrared measurements was the same as for tensiometer measurements, except for the final concentration which was $0.86 \cdot 10^{-3}$ M. The final iron concentration in protein solution was $0.36 \cdot 10^{-3}$ M. Iron-protein ratio is almost identical in FTIR analysis and tensiometry. We changed the concentration between the two analytical techniques in order to respect the concentration required to obtain information. The contribution of H₂O and buffered solution (0.1 M acetate/0.1 M imidazole) in the amide I region was eliminated by subtracting H₂O and buffered solution (0.1 M acetate/0.1 M imidazole) at the same temperature as that of the solution.

ζ-potential measurements

Emulsion droplet charge (zeta-potential, ζ) was measured by directly injecting diluted (1:1000, sample: acetate-imidazole buffer, pH 6.5) oil-in-water emulsions into the measurement chamber of a ZEM 5003 Zeta master (CAD instrumentation, Les Essarts Le Roy, France). The ζ-potential measurements are reported as the average of three separate injections, with five readings made per injection. For all solutions, 0.1 % (w/v) of sodium azide was added to prevent bacterial growth.

Samples of oil/water emulsions consisted of 30 wt % sunflower oil and 70 % acetate/imidazole buffer (0.1 M/0.1 M, pH 6.5) with a $0.86 \cdot 10^{-3}$ M protein. Oil/water emulsions were prepared in two steps: (1) pre-emulsification and (2) homogenization. In the first step, both the oil and the aqueous phases were blended three times for 1 min at 21,000 rpm using a rotor-stator homogenizer fitted with a 12 mm diameter head (Polytron[®] PT 3100, Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland). The coarse emulsions were then homogenized four times at 5,000 psi through a one-stage low-pressure valve homogenize (Stansted, Fluid Power LTD, U.K.). Iron salts were first dissolved in ultrapure water (18 MΩ, Milli-Q system) and immediately added to the protein solution to obtain $0.36 \cdot 10^{-3}$ M final emulsion concentration. Droplet-size distributions were measured using a Coulter LS 230 laser light scattering instrument (Malvern Instruments, Worcester, U.K.). The average volume-surface droplet diameter of each freshly prepared emulsion was $d_{3,2} = 0.78 \pm 0.07$ μm.

Determination of Metal Concentration in Caseinate Powder

The iron and calcium amounts of the caseinate powder were determined by atomic absorption spectroscopy (Varian, Spectra AA 100, Darmstadt, Germany). The analytical procedures were

performed according to the AOAC (Nielsen, 1994). The results were determined from the average of three readings for each sample.

Statistical Analysis

All analyses were performed on triplicate samples. Differences between samples were determined using the confidence interval ($p = 0.05$; (Nielsen, 1994)).

V. Results and Discussion

V.1 Effect of the type of iron salt on the surface activity of the milk proteins at pH 6.5

An overall observation indicates that the sodium caseinate (Figure 32) and β -lactoglobulin (Figure 33) do not induce the same kinetics of interfacial tension ($\gamma(t)$) decrease at oil/water interface at pH 6.5. The kinetics of sodium caseinate is clearly modified depending on the various types of iron salts (Figure 32), but iron salts have no major effect on the adsorption of β -lactoglobulin at pH 6.5. Caseins are a mix of four random coil proteins with phosphate groups; β -lactoglobulin is a globular protein without phosphate groups.

In order to observe in more detail the changes of $\gamma(t)$ with sodium caseinate without iron, we follow a rapid process, which could be divided into two stages: a rapid decrease from 25.00 mN.m^{-1} down to 15.40 mN.m^{-1} occurring during the first 500 s (stage 1) and then a slowing down (stage 2) to reach an apparent stabilization of the interfacial tension ($\gamma = 14.90 \text{ mN.m}^{-1}$). On the contrary, a long-term adsorption is observed with β -lactoglobulin without iron (Figure 33). Firstly, $\gamma(t)$ decreases rather rapidly from 25 mN.m^{-1} down to 20.50 mN.m^{-1} , and then decreases slowly to reach $\gamma = 16.40 \text{ mN.m}^{-1}$ at time 5000 s. No steady state is reached under our experimental conditions. These findings are in accordance with previous results (Leman & Kinsella, 1989 ; Patino *et al.*, 2001 ; Cases *et al.*, 2005). When iron salts are used, the interface stabilized by sodium caseinate at pH 6.5 is significantly modified both its magnitude of $\gamma(t)$ (Figure 32) and the initial slope $d\gamma/dt$ (Tableau 10). In the end, the influence on the interface is dependent on the nature of the iron salts. The initial slope $d\gamma/dt$ obtained by the injection of sodium caseinate solution is highly enhanced when NaFe-EDTA is used ($d\gamma/dt = 3.03 \pm 0.20 \text{ mN.m}^{-1}$), but is inhibited by the use of both Fe-BIS ($d\gamma/dt = 1.00 \pm 0.04 \text{ mN.m}^{-1}$) and FeSO_4 ($d\gamma/dt = 0.75 \pm 0.03 \text{ mN.m}^{-1}$) respectively

(Tableau 10). At $t = 5000$ s, the order of surface activity is: NaFe-EDTA > Fe-BIS > FeSO₄ (Figure 33).

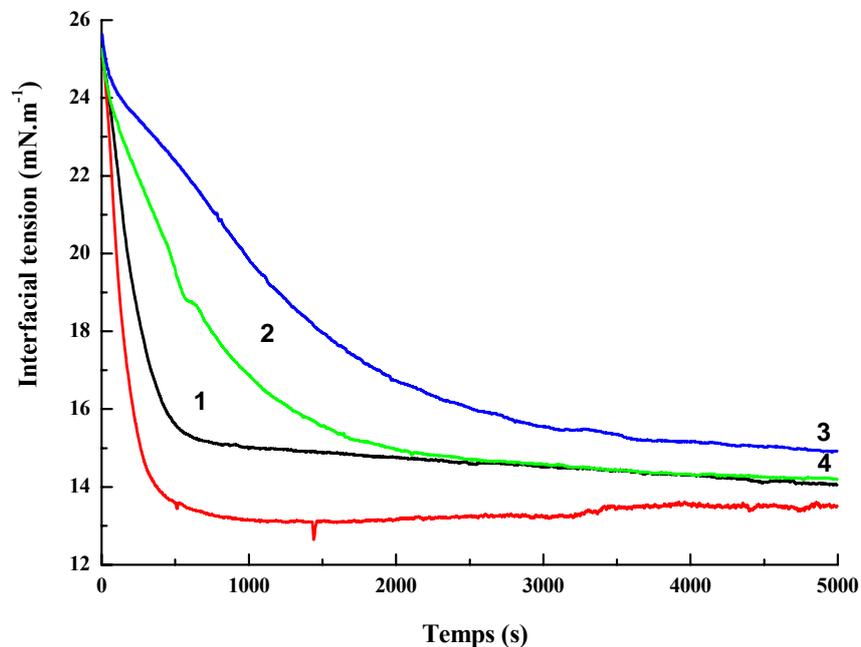


Figure 32 : Interfacial tension at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20 °C, $[Fe] = 0.2 \cdot 10^{-6}$ M, $[protein] = 0.4 \cdot 10^{-6}$ M. The curves correspond to the average values of 3 results of the interfacial tension. The differences between curves are up to confidence interval

This result leads us to conclude that sodium caseinate activity could be influenced by the presence of various iron salts (the used iron salts do not have surface activity (data not shown)). In the presence of NaFe-EDTA, the sodium caseinate is more surface active than in the presence of either Fe-BIS or FeSO₄ respectively, at pH 6.5. At this pH, sodium caseinate exists in aqueous solution as a mixture of casein monomers (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β and κ -casein) and small aggregates containing about 15 molecules (Farrell *et al.*, 1996). These aggregates (micelles) are probably due to association of the hydrophobic parts of the casein molecules. An analysis of the mineral content of sodium caseinate done for this study revealed that both iron and calcium ion are already present ($5 \cdot 10^{-3}$ g.kg⁻¹ and $14 \cdot 10^{-3}$ g.kg⁻¹ of powder respectively) without any addition, probably linked to casein molecules. Using NaFe-EDTA as iron source fortification therefore corresponds to a small addition of Na₂EDTA, which is a strong metal chelator. The chelating caused a “disorganization” of sodium caseinate by removing Ca²⁺ and Fe²⁺ bound to casein molecules, in agreement with previous studies (Holt,

1982 ; Ward *et al.*, 1997). Because of the destruction of the sodium caseinate structure, which becomes flexible and enhances the exposure of hydrophobic residues, the protein would adsorb to oil interface more easily, rising the interfacial protein concentration, as shown by the enhancement in dy/dt (Tableau 10).

Tableau 10 : Characterization of first stage dy/dt at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate and β -lactoglobulin in presence of different iron salts*. The order of the samples in the tables goes the same as in curves 1 to 6

		pH 6.5	pH 3.5	pH 2
Iron salts		$\left(\frac{dy}{dt}\right)$		
		(mN. m ⁻¹ . min ⁻¹)		
Sodium caseinate	1 Without iron	1.78 ± 0.02	0.83 ± 0.02	2.02 ± 0.22
	2 NaFe-EDTA	3.03 ± 0.20	0.83 ± 0.03	2.12 ± 0.13
	3 Fe-bisglycinate	1.00 ± 0.04	0.80 ± 0.04	2.15 ± 0.03
	4 FeSO ₄	0.75 ± 0.03	0.82 ± 0.04	2.00 ± 0.14
β -lactoglobulin	1 Without iron	1.60 ± 0.30	1.16 ± 0.01	0.89 ± 0.00
	2 NaFe-EDTA	1.90 ± 0.10	0.93 ± 0.02	0.55 ± 0.02
	3 Fe-bisglycinate	1.90 ± 0.09	1.06 ± 0.03	0.62 ± 0.12
	4 FeSO ₄	1.80 ± 0.06	1.04 ± 0.02	0.66 ± 0.23

*Experimental conditions: pH 2; pH 3.5 and pH 6.5 20 °C, [Fe] = 2·10⁻⁷ M, [protein] = 4·10⁻⁷ M. Confidents intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$.

In contrast to NaFe-EDTA, FeSO₄ addition led to a decrease in the slope of γ (t) with sodium caseinate, suggesting that these iron salts led to a reduction in interfacial activity of the milk protein at pH 6.5. In aqueous solution at pH 6.5, FeSO₄ salts are totally dissociated and give free Fe²⁺ ions. We can suppose that Fe²⁺ (and Fe³⁺) iron is bound to sodium caseinate. According to Gaucheron, Le Graet, Boyaval, & Plot (1997), the use of compounds that easily donate their iron, such as sulfate, leads to a conformational change of casein molecules, when added in skim milk. The clusters of phosphoserine residues (ser-HPO₄⁻) of casein molecules are the main binding sites. Shears, Ledward, & Neale, (Shears *et al.*, 1987) reported that iron was probably bound also to other sites, such as Tyr, Trp, Glu and Asp residues. The binding of iron to caseins induces a neutralization of their negative charges and an enhancement of hydrophobic interactions, leading to their aggregation (formation of micelles in bulk phase).

Consequently, the interfacial activity of sodium caseinate was affected by FeSO_4 , by an increase of the association of the caseinates in micelles.

Ferrous bisglycinate (Fe-BIS) is also a chelate consisting of one molecule of ferrous iron bound to two molecules of glycine to form two heterocyclic rings (Ashmead, 2001). According to McMurray, & Fay (1995), iron is bound to the carboxyl group and the α -amino group of glycine with coordinate chemical bonds. The solubility and stability of Fe-BIS is pH-dependent: Fe-BIS is unstable at pH below 3 and above 10 due to breakage of chelate bonds (EFSA, 2006). The results have shown that Fe-BIS decreases the interfacial activity of sodium caseinate. The sodium caseinate would interact with iron ion given by Fe-BIS chelate. It could lead to a more important association of caseinate in micelle or through the formation of an improbable complex Fe-BIS-sodium caseinate. Adsorption of the resulting associated casein to the oil/water interface would be more difficult to occur, as described previously with Ca^{2+} ion (Dickinson, Radford, & Golding, 2003). This result is surprising because the literature described Fe-BIS as a very stable chelate which is protected from chemical reactions with compounds in a food matrix such as proteins, vitamins or intrinsic minerals in milk (Ashmead, H., & Ashmead, S., 1995; Marchetti, M., Ashmead, Tossani, Marchetti, S., & Ashmead, 2000). Furia (1972) ranked the iron chelates in the order of effectiveness as follows: EDTA > polyphosphate > glutamine > glycine. The phosphoserine (PSer) groups of sodium caseinate (7 to 9 PSer for α_{S1} -, 5 PSer for β -, and 10 to 13 PSer for α_{S2-CN}) are able to strongly chelate iron ion (Hegenauer *et al.*, 1979). The resulting complex could be constituted with a bond between phosphate group and iron ion of Fe-BIS (complex not destroyed) or with free iron ion from Fe-BIS (dissociated complex). Whatever the relation of phosphate groups with iron ion in presence of Fe-BIS, the changes of both the charge and structure of sodium caseinate could decrease the interfacial activity of the caseins.

At pH 6.5, the effect of the iron salts on the interfacial activity of sodium caseinate seems to be very important, but that is not the case with β -lactoglobulin.

A more thorough observation of the changes of γ (t) with β -lactoglobulin at pH 6.5 shows that the use of every kind of iron salts lead to a small increase in the initial slope, $d\gamma/dt$ (Tableau 10). At $t = 5000$ s, corresponding nearly to the equilibrium, no significant changes in γ value has been observed between the different types of iron salts (Figure 33).

The effect of iron salt on the interfacial activity of β -lactoglobulin is not so important compared to the one of sodium sodium caseinate, probably because of the structure I and III of this whey protein. β -lactoglobulin is characterized by a well-defined three-dimensional structure, while caseinate displays a random coil structure. At pH 6.5, β -lactoglobulin is held together by disulphide bridges and thus is much more rigid than the caseins (Kinsela & Whitehead, 1989).

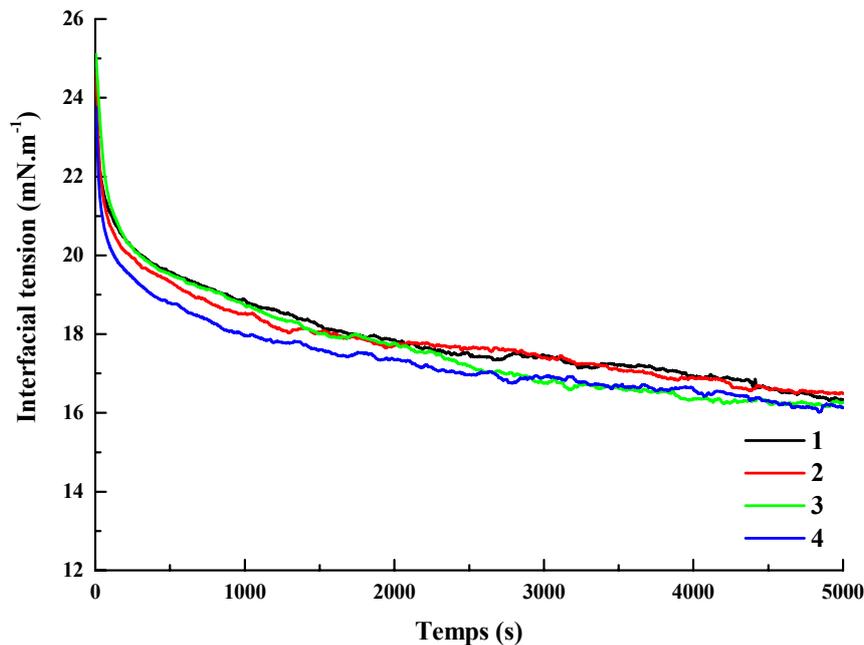


Figure 33: Interfacial tension at the sunflower oil/water interface stabilized by β -lactoglobulin in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20°C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M. The curves correspond to the average values of 3 results of the interfacial tension. The differences between curves are up to confidence interval

β -lactoglobulin, logically, displayed a lower surface activity than sodium caseinate, as shown by γ (t) curves (Figure 33 compared with Figure 32) which was in accordance with previous results (Lopez & Dufour, 2001 ; Cases *et al.*, 2005). The rigidity of the structure of the β -lactoglobulin plays a major role and possible interactions with divalent cations have a secondary influence on the surface activity.

When FeSO₄ was used as iron salt, at pH 6.5, the lowering in γ (t) displayed by β -lactoglobulin was slightly increased, compared to the other two iron salts compare with the other two iron salts (NaFe-EDTA and Fe-BIS), suggesting that the interfacial properties of

β -lactoglobulin were also slightly enhanced. According to Sugiarto, & Singh (2009), β -lactoglobulin molecule has 8 binding sites for iron, consisting of carboxylic groups located on accessible glutaminy and asparaginy residues. The binding of iron to β -lactoglobulin could change the structure of the whey protein and thus the relative rigidity of the protein. It can be noticed that β -lactoglobulin is considered as a soft protein, whereas α -lactalbumin is a hard protein at an interface (Krisdhasima *et al.*, 1993). This indicates that the β -lactoglobulin is rather deformable. As a consequence, the structure of β -lactoglobulin has been slightly modified its interfacial activity, in the presence of these different types of iron salts, as shown in Figure 32 and Tableau 10.

V.2 Effect of the acidic media on the surface activity of milk proteins in the presence of iron salts

The lowering of interfacial tension due to milk protein unfolding upon adsorption depends on the pH, in accordance with previous studies (Cases *et al.*, 2005). At first, the solubility of sodium caseinate is observed. This solubility highly increases as the pH increases from 6.5 to 8 (Lee *et al.*, 1993). The minimum solubility is around pH 3.5 to 4, though the isoelectric point of each casein is closer to 5. When pH is adjusted to 3.5, electrostatic repulsions between the casein molecules are reduced. Stronger attractive interactions between casein give more compact or packed sodium caseinate aggregates. The diffusion at pH 3.5 of casein from the aqueous bulk phase to the interface could be slow. At pH 3.5, the presence of iron salt modified the sodium caseinate surface activity (Tableau 10), irrelevant of the nature of the salt used, but not as much as at pH 6.5. This could be explained in two ways. Firstly, the iron ions do not bond to proteins, as at pH 6.5, because of electrostatic repulsion. At pH 3.5, the amino groups are 90 % protonated ($pK_2 = 4$ to 5) and the phosphate groups have only one charge ($pK_2 = 7 - 6.5$; $pK_1 = 2$). Obviously, the protonation of negative groups decreases their affinity for iron ion, thus reducing the complexation of proteins at the interface. As a consequence, neither sodium caseinate adsorption nor denaturation at oil/water interface is affected by the presence of iron, at pH 3.5. Secondly, because of steric hindrance, explained by the proximity to the pI of the caseins, proteins are less flexible and thus less tensioactives.

At pH 2, the interfacial activity of sodium caseinate is higher than at pH 3.5. This result is due to the 100 % solubility of sodium caseinate at pH 2 (Flanagan & Fitz Gerald, 2003), caseins being highly positively charged. 50 % of phosphate groups and 100 % of carboxylic groups

are totally protonated. The effects of iron salts on interfacial properties are very low (Tableau 10).

Such observations are less obvious with β -lactoglobulin: a low but significant effect of the three iron salts is noticeable at pH 2 and less significant at pH 3.5. However, this is not observed at pH 6.5 (Tableau 10). In very acid conditions, at pH 2, iron salts decrease the surface activity of β -lactoglobulin, since $d\gamma/dt$ values are lower than those of the whey proteins without salt (slope almost two times lower). EDTA salt gives higher effects than sulfate and bisglycinate salts.

Interfacial activity developed by β -lactoglobulin is exacerbated in the presence of iron ion compared to the caseinate in acidic conditions. pH is involved in the conformational change of β -lactoglobulin: β -lactoglobulin exists as a monomer below pH 3. Between pH 3.5 to 5.1 it associates and forms aggregate into stable octamer. At pH close to pH_i (= 5.2), electrostatic repulsions of ionic groups of β -lactoglobulin are weakened and β -lactoglobulin exists as a dimer. At pH 3.5, despite the high level of protonation of carboxylic groups, the presence of iron could modify the structure or the degree of aggregation of β -lactoglobulin units. It could explain the change of its interfacial activity. At pH 2 the suppression of the ionization of carboxylic groups has an effect upon the accessibility of hydrophobic residues of the whey protein (Morr, 1979). The resulting decrease in the rate of the surface tension observed at pH 2 compared to pH 6.5 and pH 3.5 could be explained in terms of a lower exposure of hydrophobic residues. However, we have no clear explanation about the effect of iron salts presence on the interfacial activity of β -lactoglobulin because all of the cationic groups are protonated. Therefore, iron ions could not normally interact with the protein. The adsorption/spreading of β -lactoglobulin at the interface at pH 2 would be hindered not by the presence of iron ion, but by the counter-ions (EDTA, sulfate ion and glycinate) that interact with ammonium groups (Lys, His, Arg).

V.3 Effect of various iron salts on the viscoelastic modulus of adsorbed milk proteins at pH 6.5

Another important factor on the behavior of proteins at the oil/water interface is the rheology factor. In this study, it was characterized by the dilatational rheology, represented by the viscoelastic modulus (ϵ).

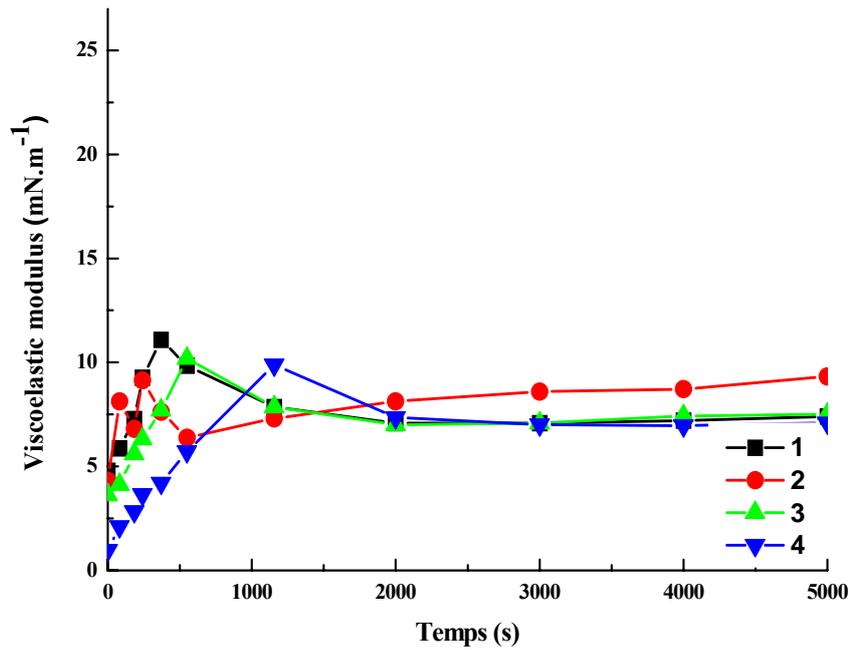


Figure 34 : Viscoelastic modulus at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20°C, [Fe] = 0.2·10⁻⁶ M, [protein] = 0.4·10⁻⁶ M. Confidants intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$

The three iron salts induce changes in the viscoelastic modulus ($\varepsilon(t)$) developed by sodium caseinate (Figure 34) and BLG (Figure 35) at pH 6.5, but in different manners. Depending on the nature of the milk protein, both the shape of the $\varepsilon(t)$ curve and the magnitude of $\varepsilon(t)$ values differ. The effects of iron salts on the $\varepsilon(t)$ evolution do not concern the same part of the curve: the beginning of the evolution of $\varepsilon(t)$ for sodium caseinate, the end for the β -lactoglobulin.

For a more detailed analysis, $\varepsilon(t)$ curves with sodium caseinate (Figure 34) could be divided into three stages: a rapid increase up to a maximum (stage 1), followed by a decrease (stage 2) and then a “stabilization” of the viscoelastic value (stage 3). This stability was reached at time 3000 s (Figure 34). This observation is in agreement with previous results (Cases *et al.*, 2005). The most obvious effect of the various iron salts on $\varepsilon(t)$ is observed during the first stage. We ranked the iron salts’ effect in on the decrease of the initial slope of $\varepsilon(t)$ in the stage 1: NaFe-EDTA > Fe-BIS > FeSO₄. At time 5000 s, sodium caseinate interface with NaFe-EDTA exhibits the highest viscoelastic modulus, but the differences for the other irons salts iron are small (Tableau 11). The NaFe-EDTA allows for a faster formation of the sodium caseinate interface. With FeSO₄ or Fe-BIS, the interface with sodium caseinate is established slower.

Possible explanations are that the interface could establish only after the adsorption of enough molecules (low expansion at the interface) or because the adsorption of casein is lowered by an increase of micelle structures in bulk.

For β -lactoglobulin (Figure 35), the changes in of the shape of the curve totally differ from those observed for sodium caseinate. Rapidly $\varepsilon(t)$ increases and then slows down with aging time.

This suggests that strong inter- or intramolecular interactions slowly take place at the interface. Compared to the sodium caseinate layer ($\varepsilon_{5000s} = 7.40 \pm 0.22 \text{ mN.m}^{-1}$), β -lactoglobulin exhibits the highest viscoelastic modulus, i.e., the “more rigid“ film at $t = 5000 \text{ s}$ ($\varepsilon_{5000s} = 20.20 \pm 0.10 \text{ mN.m}^{-1}$), probably due to a polymerization of the whey proteins in the adsorbed layer via the interchange between sulfhydryl and disulfide groups (McClement, 1999 ; Cases *et al.*, 2005). The fact that sodium caseinates exhibit a lower viscoelastic modulus would imply weaker lateral interactions between the adsorbed molecules. It results in a less cohesive film, as previously observed by Benjamins & Cagna (1996) and Bos, & Van Vliet (2001).

When different iron salts are present in the aqueous phase, the viscoelastic modulus developed by β -lactoglobulin is slightly enhanced as a function of the different forms of iron. However, these effects do not appear at the same moment in the viscoelastic modulus evolution. A rapid increase in $\varepsilon(t)$ is observed after the creation of the oil/water interface without any effect of iron salts. The ranking of the effect of iron salts at pH 6.5 in the order of decreasing viscoelastic modulus ε_{5000s} is as follows: FeSO_4 ($\varepsilon_{5000s} = 25.50 \pm 1.27 \text{ mN.m}^{-1}$) > Fe-BIS ($\varepsilon_{5000s} = 23.30 \pm 1.17 \text{ mN.m}^{-1}$) > NaFe-EDTA ($\varepsilon_{5000s} = 21.60 \pm 1.08 \text{ mN.m}^{-1}$) > not iron salt ($\varepsilon_{5000s} = 20.20 \pm 1.00 \text{ mN.m}^{-1}$). The effect of FeSO_4 would probably be more important because of the greater concentration of free iron ion than with the other iron salts.

The lower effect of FeSO_4 on the β -lactoglobulin interface rheology, compared to sodium caseinate, could be explained by the presence of carboxylate groups that have lesser affinity for divalent ions than phosphate groups (caseins).

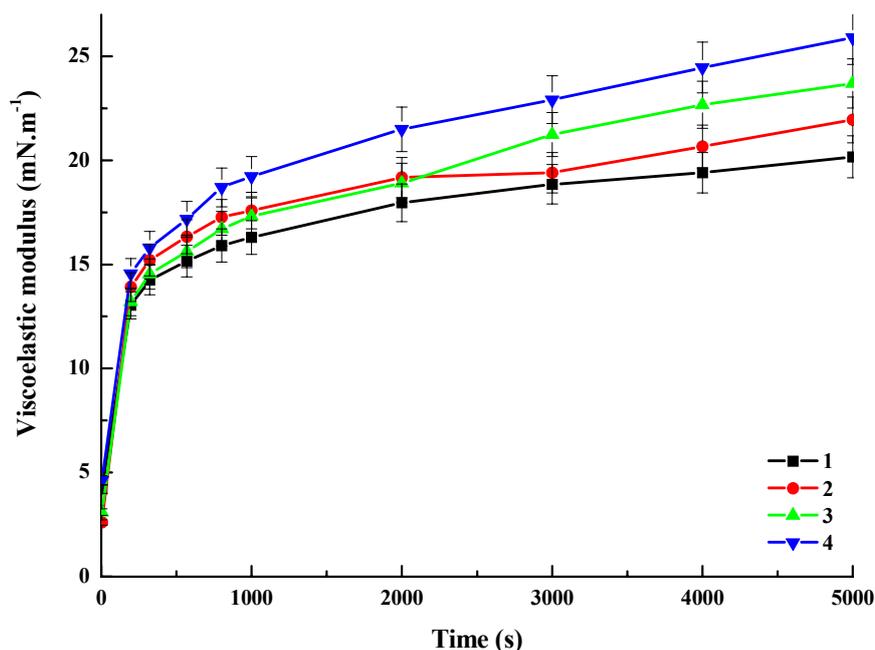


Figure 35: Viscoelastic modulus at the sunflower oil/water interface stabilized by β -lactoglobulin in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaF-eEDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20°C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M. Confidants intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$

To conclude, the differences in (ϵ) for both milk proteins (Figure 36 and Figure 37) could largely be explained by Figure 32 and Figure 33. The overall shape of the E data is similar, but the rates are different. The plot of the viscoelastic modulus ϵ (t) versus changes tension γ (t) (Figure 36 and Figure 37) for the same time, reveals the effect of the iron salts on the interfacial structure. These figures show a dependence on the protein structure. For sodium caseinate, the curve could be divided into three stages: stage I, an increase occurred at high γ to go through a maximum, followed by a decrease at immediate γ values, stage II and a short rise, stage III; for β -lactoglobulin we observe only a linear increase.

In the case of sodium caseinate, when iron salts are added the shape of the curve is determined by the iron salts. To conclude the differences in (ϵ) for both milk proteins Figure 32 and Figure 33 are the same in the case of β -lactoglobulin. This demonstrates clearly that surface activity of milk proteins in the presence of various iron salts, is impacted not only by the nature of proteins but also by the various iron salts.

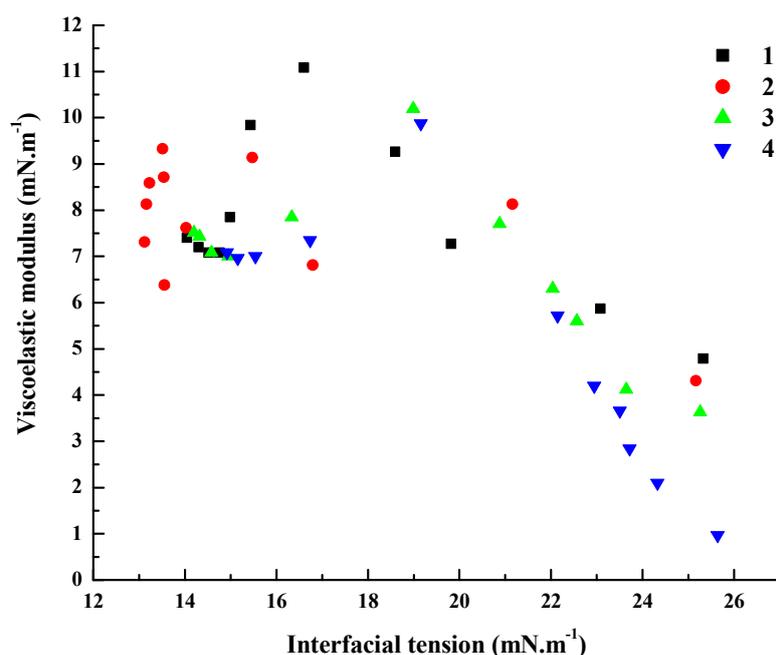


Figure 36 : Viscoelastic modulus (ϵ) as a function of interfacial tension (γ) for oil/water interface stabilized by sodium caseinate in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20 °C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M

V.4 Effect of the acidic media on the kinetics of the viscoelastic modulus of milk proteins in the presence of iron salts

The effect of the iron salts on ϵ (5000 s) value with sodium caseinate and β -lactoglobulin depends on pH (Tableau 11).

For sodium caseinate, the effects of the three irons salts at pH 3.5 are almost the same. At pH 2, Fe-BIS decreases the ϵ (5000 s) value, and FeSO₄ increases the ϵ (5000 s) value, contrary at pH 6.5 (Tableau 11).

For β -lactoglobulin, the iron salts decrease the ϵ (5000 s) value for both acidic pH. At pH 3.5 and 2, the viscoelastic modulus developed by β -lactoglobulin alone becomes higher than in the presence of iron salts, suggesting more inter- and/or intramolecular interactions. The interfacial film could be regarded as an assembly of dense but deformable pack in the presence of iron salts. However, EDTA and glycinate ions could connect β -lactoglobulin units at the interface, displaying a higher viscoelastic modulus contrary FeSO₄, at pH 3.5. The acid conditions could destabilize the chelates of irons, which could explain the effect on interface activity at pH 2 and 3.5.

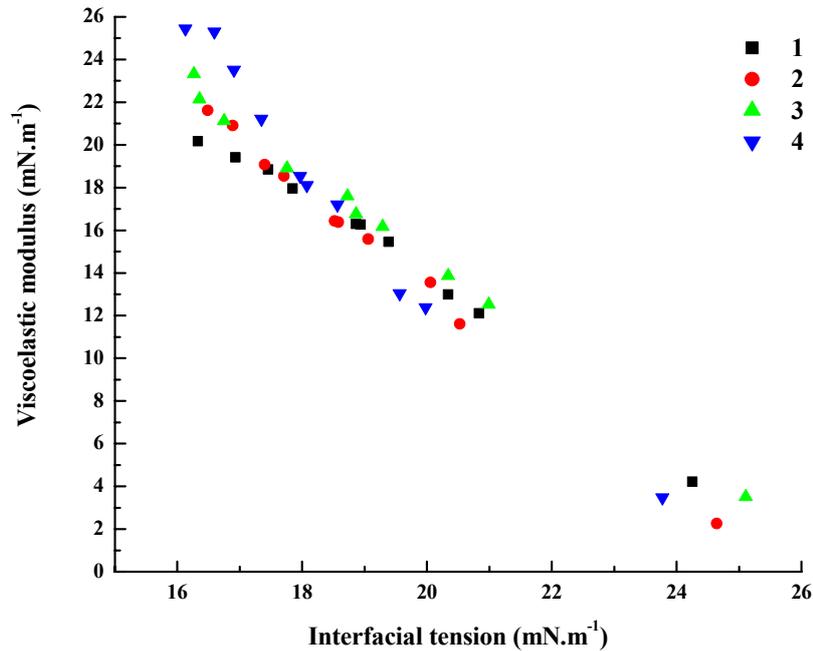


Figure 37 : Viscoelastic modulus (ϵ) as a function of interfacial tension (γ) for oil/water interface stabilized by β -lactoglobulin in presence of different iron salts. 1. without iron, 2. NaFe-EDTA, 3. Fe-bisglycinate, 4. FeSO₄. Experimental conditions: pH 6.5, 20 °C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M

Tableau 11 : Viscoelastic modulus at the sunflower oil/water interface stabilized by sodium caseinate and β -lactoglobulin in presence of different iron salts at $t = 5000$ s*. The order of the samples in the tables goes the same as in curves 1 to 6

Proten type	Iron salts	pH 6.5	pH 3.5	pH 2
		ϵ (mN. m ⁻¹)		
Sodium caseinate	1 Without iron	7.40 ± 0.22	9.21 ± 0.03	10.50 ± 0.02
	2 NaFe-EDTA	9.33 ± 0.37	9.58 ± 0.17	10.30 ± 1.02
	3 Fe-bisglycinate	7.50 ± 0.38	9.28 ± 0.02	9.70 ± 0.75
	4 FeSO ₄	7.09 ± 0.35	8.70 ± 0.21	11.42 ± 0.03
β -lactoglobulin	1 Without iron	20.20 ± 1.00	15.00 ± 0.78	9.40 ± 0.03
	2 NaFe-EDTA	21.60 ± 1.08	13.60 ± 0.23	9.20 ± 1.20
	3 Fe-bisglycinate	23.30 ± 1.17	13.30 ± 1.04	8.40 ± 0.80
	4 FeSO ₄	25.50 ± 1.27	11.20 ± 1.33	8.50 ± 0.80

*Experimental conditions: pH 6.5, 20°C, [Fe] = $0.2 \cdot 10^{-6}$ M, [protein] = $0.4 \cdot 10^{-6}$ M. Confidents intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$.

V.5 Could Fe-bisglycinate interacting with β -lactoglobulin in neutral conditions?

In order to better understand and verify if Fe-bisglycinate interacts or not with β -lactoglobulin, we used complementary methods: (i) Fourier transform infrared spectroscopy in order to observe molecular conformational changes in BLG aqueous solution and (ii) ζ potential measurements in order to evaluate the influence of Fe-BIS on droplet charge compared to NaFe-EDTA and FeSO₄.

Figure 38 displays the typical derivative spectrum in the amide I band region (1600 - 1700 cm⁻¹) of β -lactoglobulin at 0.86·10⁻³ M in acetate/imidazole buffered solution with and without 0.36 10⁻³ M Fe-bisglycinate at pH 6.5. The derivative band, called amide I, mainly corresponds to the C=O stretching mode of peptide backbone and is sensitive to alteration in secondary structures (Surewicz & Mantsch, 1988 ; Lefèvre & Subirade, 2001 ; Remondetto & Subirade, 2003). As it can be seen in Figure 38, both spectrums for BLG with and without Fe-BIS are very similar. The most intense bands around 1625 and 1635 cm⁻¹ are thought to arise from anti-parallel β -strand/sheet structures, respectively (Fang & Dangleish, 1997 ; Remondetto & Subirade, 2003). The concomitant presence of both components is characteristic of BLG in the dimeric form (Lefèvre & Subirade, 1999). The components located at 1645 together with 1652 and 1661 cm⁻¹ are ascribed to α -helix/unordered structures and turns, respectively. Those located at 1682 and 1693 cm⁻¹ are both related to β -sheets and turns (Byler & Susi, 1986 ; Fang & Dangleish, 1997 ; Remondetto & Subirade, 2003). The spectrum of native BLG is very similar to than previously observed by Susi, H., and Byler, D. M. 1993.

It is known that the quantitative assessments of the secondary structure from FTIR analyses are rather unreliable (Qi *et al.*, 1995). So, we only deal with the qualitative aspects of spectra. According to Remondetto, & Subirade, (2003), the addition of 10 mM FeSO₄ to BLG preheated solution leads to the apparition of the band at 1614 cm⁻¹ which was explained by the aggregation of proteins. It was not the case in our study with β -lactoglobulin after 0.36·10⁻³ M Fe-BIS addition. Lastly, if we compare both spectra of BLG with Fe-BIS and BLG without Fe-BIS, we can conclude that the conformation of BLG is not affected by the presence of Fe-bisglycinate chelate.

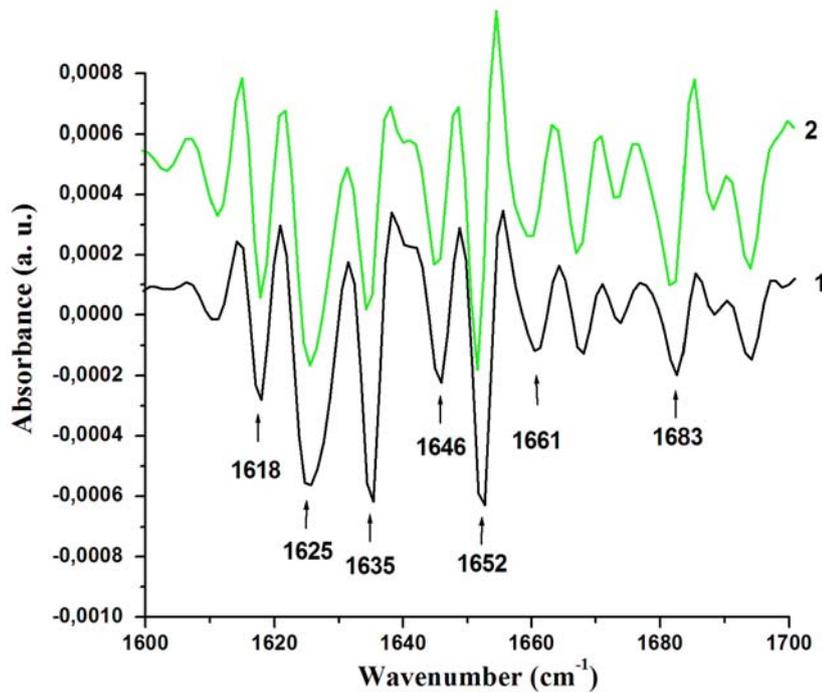


Figure 38 : Second-derivative spectra of β -lactoglobulin collected at resolution 4 cm^{-1} with 250 scan. 1. β -lactoglobulin without Fe-bisglycinate; 2. β -lactoglobulin with Fe-bisglycinate. Other experimental conditions: pH 6.5, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{Fe}] = 0.36 \cdot 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{protein}] = 0.86 \cdot 10^{-3}\text{ M}$

These spectrums contain different components, which correspond to the particular secondary structure of the proteins (Byler & Susi, 1986 ; Dong *et al.*, 1996 ; Fang & Dangleish, 1997). Tableau 12 displays the electrical charge at oil-water interface (represented by a sunflower oil-in-water emulsion) stabilized by sodium caseinate and β -lactoglobulin proteins at pH 6.5.

This choice was made to better understand the effect of different additions of iron salts on the stabilization oil-water interface by milk proteins, which was previously observed by dynamic tensiometry methods. The question is to determine whether the impact of different iron salts (NaFe-EDTA, Fe-BIS and FeSO_4) on the surface activity of milk proteins could be related to the interactions that take place at the oil-water interface. If any interaction between adsorbed proteins at oil droplets interface and iron ions salts occurs, the global charged oil drop interface should decrease (Mei *et al.*, 1998b).

For BLG stabilizing oil-water interface the results of the negative charge are not the same: it decreases only by 3 % in the presence of Fe-BIS, and by 7 % in the presence of FeSO_4 . Now we understand why such a small difference between β -lactoglobulin stabilizes interface with and without iron salts. Meanwhile, these results could not completely indicate that the iron

salts are in close contact with oil bulk because of the three-dimensional structure of the globular proteins.

As shown in Tableau 12, the addition of NaFe-EDTA does not alter the global charge of both milk proteins. The result is not in accordance with previous results obtained by dynamic tensiometry for sodium caseinate (interface stabilization). Nevertheless, the net charge of droplets for sodium caseinate stabilizing oil-water interface is reduced by 8 % in the presence of Fe-BIS, and by 11 % in the presence of FeSO₄. Therefore, these results could explain the mechanism involved, especially a binding of iron to caseins which induces a neutralization of their negative charges.

So, the ability of various irons salts and/or chelates to alter ζ -potential depends on both the nature of milk proteins (with and without phosphate groups) and the chemical functions of iron forms.

Not only that sodium caseinate have more sites than β -lactoglobulin to bind iron, but the affinity of phosphate groups of sodium caseinate to bind iron is higher and stronger than that of carboxylate groups (β -lactoglobulin has no phosphoserine residues). As an example, the solubility of ferrous oxalate or carbonate is higher than that of phosphate: Ks (solubility product) is $2.1 \cdot 10^{-7}$ for iron (II) oxalate, $3.13 \cdot 10^{-11}$ for iron (II) carbonate, $9.91 \cdot 10^{16}$ for the iron (III) dihydrogenophosphate, and $1.3 \cdot 10^{22}$ for the iron (III) phosphate. This explains why FeSO₄ has a greater effect on interfacial properties of sodium caseinate than β -lactoglobulin. The major difference lies in the presence or not of phosphate groups in structure I.

Tableau 12 : Zeta Potential (mV) of sodium caseinate and β -lactoglobulin stabilized oil-water-interface as affected by addition of different salts of iron at pH 6.5 and at 20 °C. Confidants intervals have been calculated with three repetition and with $p = 0.05$

	1. Without iron	2. NaFe-EDTA	3. Fe-bisglycinate	4. FeSO ₄
Sodium caseinate	-43.64 ± 0.5	-43.08 ± 0.3	-40.93 ± 0.2	-38.8 ± 0.4
β-lactoglobuline	-49.15 ± 0.1	-48.75 ± 0.6	-47.54 ± 0.5	-45.61 ± 1.5

VI. Conclusion

Interfacial tension and rheology investigations by the drop tensiometer method indicate a strong effect of some iron chelates on the surface activity of milk proteins to oil-in-water interface. The addition of iron salts that are iron chelates such as NaFe-EDTA or Fe-bisglycinate does not change the structure of the interface, which is stabilized by a protein containing no phosphate groups (β -lactoglobulin). The fact that it corresponds to a low transfer of iron ions from the bulk to the interface stabilized by β -lactoglobulin is confirmed by zeta meter and FTIR measurements. However, the Fe-bisglycinate changes the surface activity of proteins with phosphate groups at pH 6.5 such as casein.

These structural differences in milk proteins, proteins with and without phosphate groups, and the use of protect iron, such as NaFe-EDTA or Fe-bisglycinate may be used as a way to incorporate iron into lipid foods, and to prevent iron-catalyzed oxidation in food emulsions. Under acidic conditions, the interface stabilized by casein is not strongly modified by the presence of iron salt. The carboxylate and phosphate groups are susceptible to interact with iron cations than are quite protonated. Nevertheless, the change in the surface activity of β -lactoglobulin at pH 2 and 3.5 could indicate a destabilization of the iron complexes. It is possible for the Fe-bisglycinate, a promising iron source for fortification, to be already dissociated at pH 3.5. However, the stability of the iron complex at different pH medium should be verified. Also, further studies of the resulting effect on functionality such as storage stability and/or lipid peroxidation are required to confirm the general validity of the proposed mechanism. Some advice could be given for people who used complementary nutrients or nutraceutical rich in iron: eat it at the end of the meal when the pH is near 4.5-5.

**Stabilité du bisglycinate de fer en phase aqueuse en présence de
 β -lactoglobuline**

I. Résumé:

L'effet du pH et du bisglycinate de fer (Fe-BIS) sur la structure de la β -lactoglobuline (BLG) et l'effet du pH et de la présence de la β -lactoglobuline sur la stabilité du bisglycinate de fer (Fe-BIS), ont été respectivement étudiés à l'aide de l'analyse enthalpique différentielle (AED) et de la spectroscopie d'absorption des rayons X (R-X), en s'intéressant particulièrement au degré d'oxydation du Fe dans le chélate. D'après l'AED, en analysant les variations enthalpiques (ΔH) et la température de dénaturation (T_d) à pH 6,5, aucun effet sur la structure de BLG en présence de Fe-BIS n'a été remarqué, contrairement aux résultats obtenus à pH 3,5. L'analyse par R-X montre que le chélate Fe-BIS n'est pas stable aux pH 2 et 3,5, et plus particulièrement que les ions Fe deviennent libres, contrairement à pH 6,5 où le fer est bien chélaté. Néanmoins, pour tous les pH, le fer est sous forme bivalente dans le chélate. Aucun effet de la présence de la BLG sur le degré d'oxydation du Fe aux pH acides n'a été observé. En revanche un changement de l'environnement atomique du Fer et d'oxydation, à pH 6,5, se produit en présence de la protéine.

Mots clés : *Enrichissement en fer, rayons-X, stabilité bisglycinatée de fer, β -lactoglobuline, interaction fer-protéine, degré d'oxydation du fer.*

II. Résultats et discussion

II.1 Effets du pH et de la présence de Fe-bisglycinate sur la structure et la stabilité de la β -lactoglobuline ; *L'analyse enthalpique différentielle (AED)*

En utilisant l'analyse enthalpique différentielle (AED) et plus précisément en analysant les variations enthalpiques (ΔH) et la température de dénaturation (T_d) de la β -lactoglobuline en fonction du pH en présence de bisglycinate de fer (Fe-BIS), on peut révéler si une modification de la structure de la protéine s'opère, ou s'il y a des interactions entre la protéine et les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} .

Tout d'abord, les investigations ont été menées sur la protéine seule à l'état natif en solution ($[BLG] = 0,86 \cdot 10^{-3} M$) dans un tampon imidazole/acétate à 0,1 M, (pH 6,5 et 3,5) puis sur la protéine en présence de Fe-BIS à une concentration de $1,78 \cdot 10^{-3} M$. Le thermogramme présenté sur la Figure 39, nous permet de conclure que la BLG native en solution à pH 6,5 se dénature à une température de $74,2 \pm 0,6$ °C et que l'énergie nécessaire à cette dénaturation est de $0,35 \pm 0,01 J \cdot g^{-1}$ (Tableau 13).

Ceci est en accord avec des valeurs de température critique de dénaturation (T_{max}) d'environ 75 °C reportées pour la β -lactoglobuline à pH 6,75 (Qi *et al.*, 1995).

Ce pic de dénaturation reflète une série de modifications conformationnelles (changements dans la structure secondaire et tertiaire de la protéine) que subit la protéine sous l'effet de l'augmentation de température (Relkin, 1998).

En effet, à mesure que la température augmente, la structure bi-unitaire¹ dominante en solution aqueuse à pH 5,5-7, se dissocie en monomères. Puis au-dessus de 60 °C, les monomères sont partiellement dépliés, en exposant leurs groupes hydrophobes et leur groupe sulfhydryle initialement caché au cœur de la protéine. Par la suite, l'agrégation des protéines dépend essentiellement de la concentration et du pH de la solution (Renard *et al.*, 1998).

¹ On réserve le terme dimère à l'association de deux monomères par une liaison chimique, avec conservation de la masse

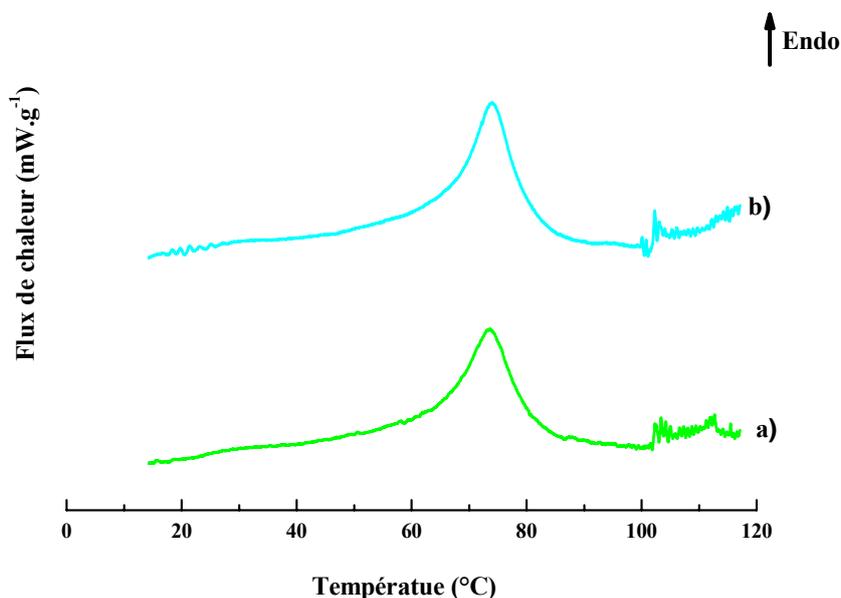


Figure 39 : Thermogramme de β -lactoglobuline en solution dans le tampon imidazole/acétate 0,1 M à pH 6,5 : a) avec et b) sans bisglycinate de fer ($1,78 \cdot 10^{-3}$ M)

Généralement, plus la protéine est compacte (structurée) et plus l'énergie et la température nécessaires à sa dénaturation seront élevées. Selon certains auteurs, la dénaturation est considérée comme un processus endothermique (ex. la rupture de liaisons hydrogène) et l'agrégation comme un processus exothermique (la perturbation des liaisons hydrophobe), mais expérimentalement il est difficile de distinguer dénaturation et agrégation car elles se superposent dans beaucoup de cas.

Tableau 13 : Température et énergie de dénaturation de la β -lactoglobuline en présence ou non de bisglycinate de fer ($0,86 \cdot 10^{-3}$ M) dans un tampon imidazole/acétate 0,1 M, déterminés par l'analyse d'enthalpie différentielle (AED)

	β -lactoglobuline		β -lactoglobuline avec Fe-BIS	
	pH 6,5	pH 3,5	pH 6,5	pH 3,5
Td (°C)	$74,20 \pm 0,60$	$79,40 \pm 0,60$	$74,60 \pm 0,20$	$74,20 \pm 0,10$
ΔH (J.g ⁻¹)	$0,35 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,01$

Cela pourrait être le cas par l'effet thermique observé à pH 6,5. En plus du pH et de la concentration en protéine, McPhail et Holt (1999) ainsi que Stripe *et al.*, (2008) ont montré que des anions et cations qui sont classés à la fin de série d'Hofmeister (ex. Ca^{2+} et SCN^-) peuvent aussi modifier le comportement thermique de la protéine, en réduisant l'énergie libre nécessaire pour transférer les groupes hydrophobes vers l'eau, ce qui conduit à un accroissement de la tendance au dépliement des protéines.

De cette manière, la température de dénaturation (T_d) et l'enthalpie (ΔH) vont diminuer (McPhail & Holt, 1999). Dans notre cas lors d'un ajout de Fe-BIS à la solution de β -lactoglobuline à pH 6,5, nous n'avons observé ni changement de température de dénaturation ni d'enthalpie, par rapport à la β -lactoglobuline seule. La constance de ces deux paramètres laisse penser qu'il n'y a pas d'interactions entre le chélate de fer (ou le fer du chélate) et la protéine à ce pH.

Par contre, on ne remarque pas le même comportement lors de l'ajout de Fe-BIS à pH 3,5 où, contrairement à ce qui est observé à pH 6,5 la température de dénaturation et l'enthalpie de la protéine ont diminué. On observe en outre un pic exothermique à une température de 90 °C caractéristique d'une agrégation (Figure 40).

Ainsi, en utilisant l'AED pour étudier les modifications structurales de la β -lactoglobuline en présence de Fe-BIS, des changements évidents ne sont observables qu'à pH 3,5 (Tableau 13 et Figure 40).

Pour ce dernier pH, on pourrait donc faire plusieurs hypothèses pour expliquer les changements observés de température de dénaturation et d'enthalpie : i/ soit il existe une interaction fer-protéine ii/ soit il existe une interaction glycine-protéine, dans les deux cas *via* une déstabilisation du chélate à pH 3,5. Ainsi les questions qui se posent et qui découlent de ces hypothèses sont : la présence de β -lactoglobuline et le pH pourraient-ils avoir aussi une influence i/ sur la stabilité du Fe-BIS ?, ii/ sur le degré d'oxydation du fer au sein du chélate ? Pour valider, rejeter ou pour répondre à ces deux questions, une technique complémentaire est nécessaire : la spectroscopie d'absorption des rayons-X.

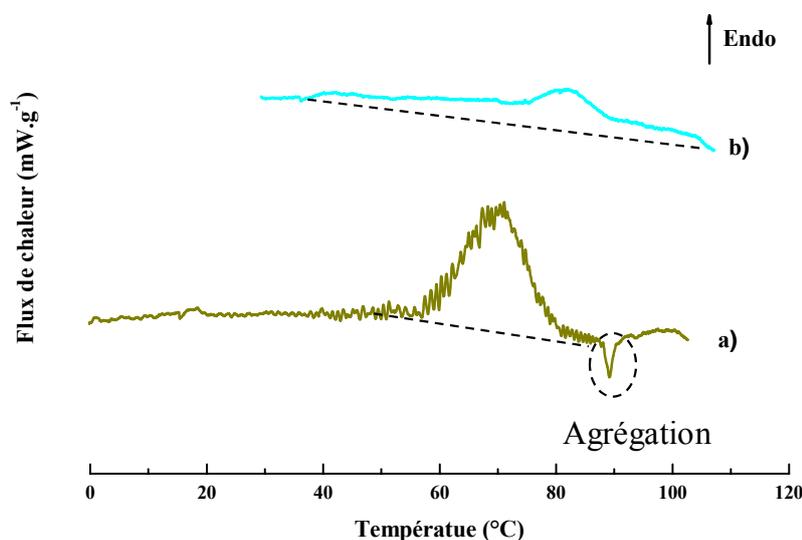


Figure 40 : Thermogramme de β -lactoglobuline en solution dans le tampon imidazole/acétate 0,1M à pH 3,5 : a) avec et b) sans bisglycinate de fer ($1,78 \cdot 10^{-3} M$)

II.2 Effets du pH et de la présence de β -lactoglobuline sur le degré d'oxydation du fer dans le bisglycinate de fer et sur la structure atomique du chélate de fer ; Mesures d'absorption des rayons X : spectres XANES au seuil K de l'atome de fer

Dans le but de déterminer le degré d'oxydation et l'environnement atomique du chélate de fer en fonction du pH ou en présence de protéines, des mesures d'absorption des rayons X au seuil K du fer ont été réalisées.

Nous présentons sur la Figure 41, les spectres XANES du bisglycinate de fer (Fe-BIS) à trois pH, et allons nous intéresser plus précisément aux positions en énergie du pré-seuil et du seuil d'absorption du fer. Ces positions relatent des états de spin et d'oxydation du fer ; l'allure des spectres autour du seuil reflète la structure atomique du chélate de fer. A partir de la simple observation des coefficients d'absorption normalisés du chélate de fer aux trois pH, nous ne distinguons pas de différences de position en énergie du pré-seuil (positionné vers 7115 eV), ce qui laisse penser que le degré d'oxydation du fer dans le chélate est le même quel que soit le pH. Nous pouvons par contre remarquer que l'allure des spectres d'absorption autour du seuil du fer (vers 7125-7130 eV) et aux environs du seuil ($E = E_0 + 20$ eV) (zone du spectre qui reflète l'état électronique du fer et son environnement atomique) est similaire pour les pH

acides (2 et 3,5), contrairement à pH 6,5 où l'étalement en énergie est plus important. Cet étalement plus important du spectre autour du seuil pour le Fe-BIS à pH 6,5 reflète bien le fait que le fer est à ce pH impliqué dans des liaisons chimiques avec d'autres atomes.

L'allure (peu d'étalement) des spectres au seuil pour le chélate à pH 2 et 3,5 est très similaire à l'allure de spectres XANES observés pour le fer hexahydrate, ce qui nous amène à penser qu'à ces deux pH, le fer est libéré et n'est plus sous forme chélatée (Briois *et al.*, 2000).

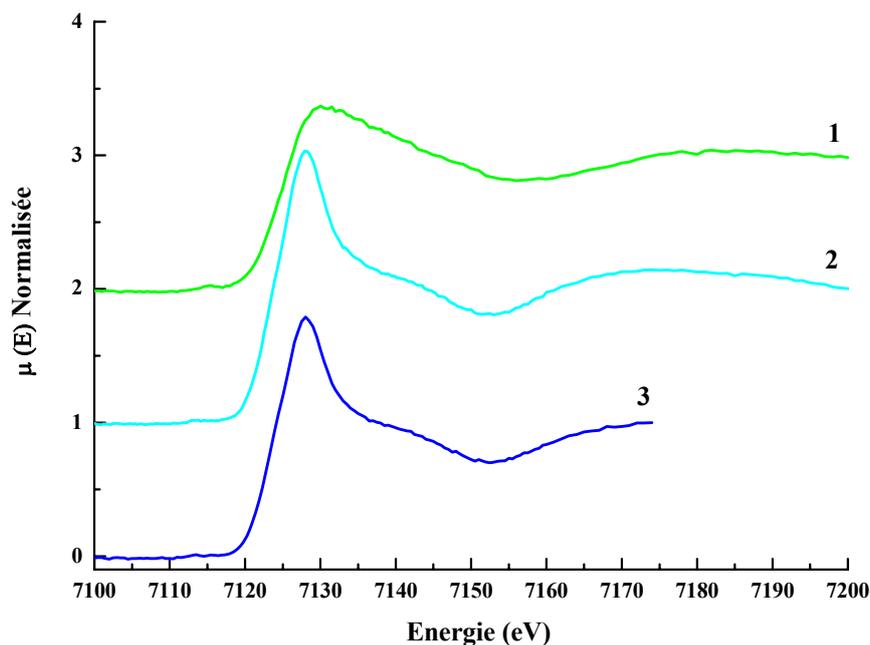


Figure 41 : Spectres XANES du bisglycinate de fer aux pH 6,5 (1), 3,5(2), et 2(3).
Température ambiante

Pour mieux percevoir les différences attendues entre les spectres, et déterminer plus précisément la position en énergie du seuil, nous avons dérivé les spectres sur une gamme d'énergies allant de 7100 eV à 7160 eV ce qui englobe à la fois le pré-seuil et le seuil K d'absorption du fer (Figure 42). D'après l'observation des spectres dérivés, le spectre obtenu pour le Fe-BIS à pH 6,5 se superpose au niveau de pré-seuil et au niveau de maximum de pic (7125 eV) de seuil K avec les autres deux spectres pour les pH 2 et 3,5. Par contre, le spectre se différencie après le seuil pour le pH 6,5.

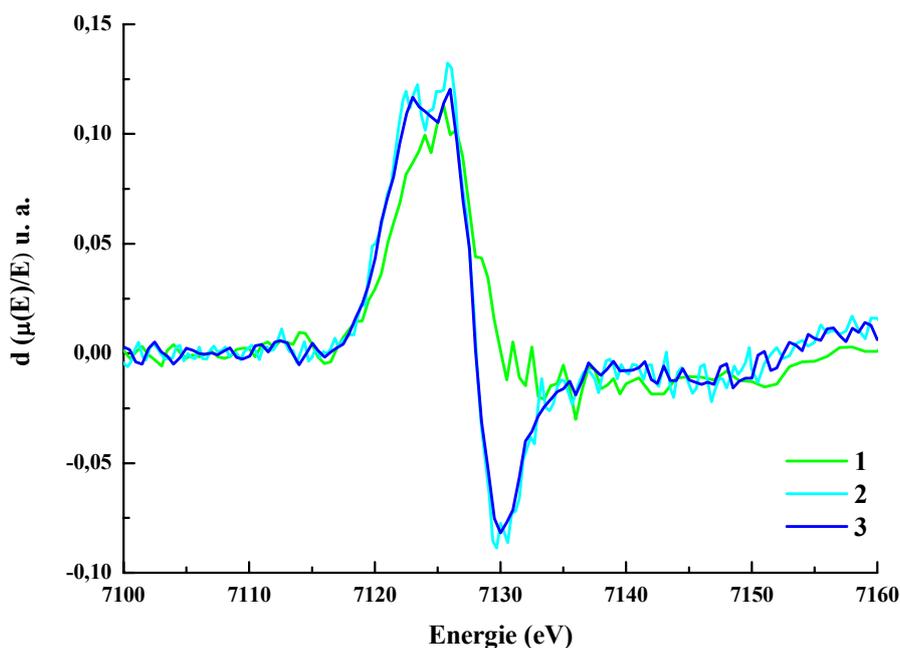


Figure 42 : Dérivées premières des spectres d'absorption du bisglycinate de fer aux pH 6,5 (1), 3,5(2), et 2(3)

L'examen des spectres XANES du Fe-BIS, des seuils d'absorption et des dérivées premières des spectres (Figure 41 et Figure 42), aux différents pH, démontrent que le degré d'oxydation et l'état du spin du fer pour les échantillons de Fe-BIS placés à pH acides (2 et 3,5) et à pH 6,5 sont les mêmes. L'allure des spectres XANES obtenus pour les échantillons de Fe-BIS aux pH acides semblent démontrer que le fer n'est plus chélaté par les glycines dès pH 3,5 alors qu'il est bien chélaté à pH 6,5.

Afin de mieux caractériser le degré d'oxydation du chélate de fer à pH 6,5, et plus particulièrement :

i/ de vérifier la stabilité du chélate à l'air, l'analyse du chélate en présence de l'air ou de N_2 a été réalisée,

ii/ de vérifier le degré d'oxydation du fer dans le chélate à pH 6,5, l'analyse du chélate en présence d'un réducteur (dithionite $Na_2S_2O_4$), référence de Fe^{2+} libre, a été réalisée. Les spectres de chélate en présence de N_2 , de l'air et du $Na_2S_2O_4$ sont présentés dans la Figure 44. L'allure des spectres d'absorption des R-X au niveau de pré-seuil et du seuil du Fe-BIS ne

change pas d'une manière notable, quelles que soient les conditions imposées à ce pH (6,5) ; avec ou sans dithionite ou sous une atmosphère inerte ou pas.

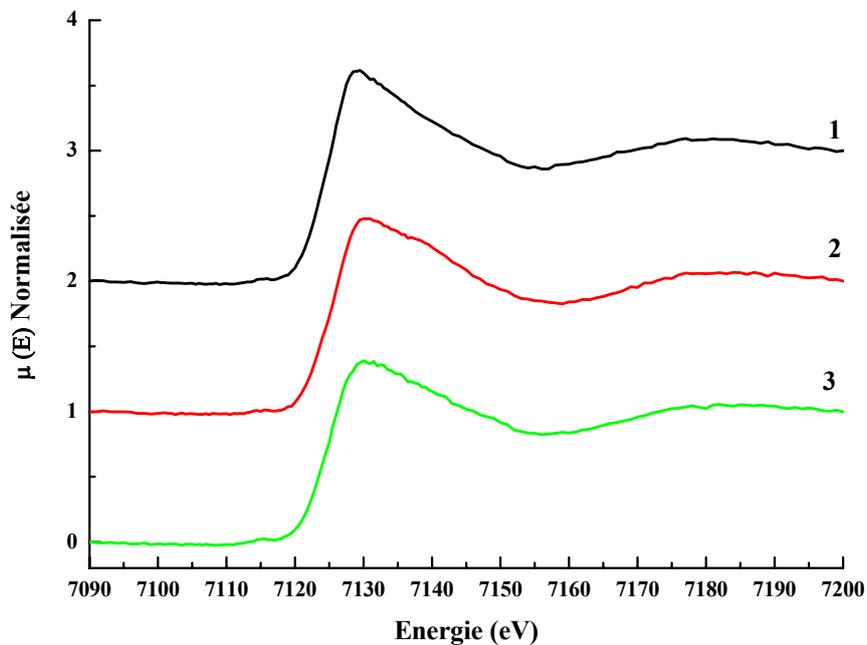


Figure 43 : Spectres XANES du bisglycinate de fer en présence : (1) de l'air, (2) de la dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) et (3) du N_2 à pH 6,5. Température ambiante

Les dérivées des spectres XANES entre 7100 eV et 7160 eV obtenus pour le Fe-BIS dans des conditions variées (N_2 , air et $Na_2S_2O_4$), sont présentées sur la Figure 44.

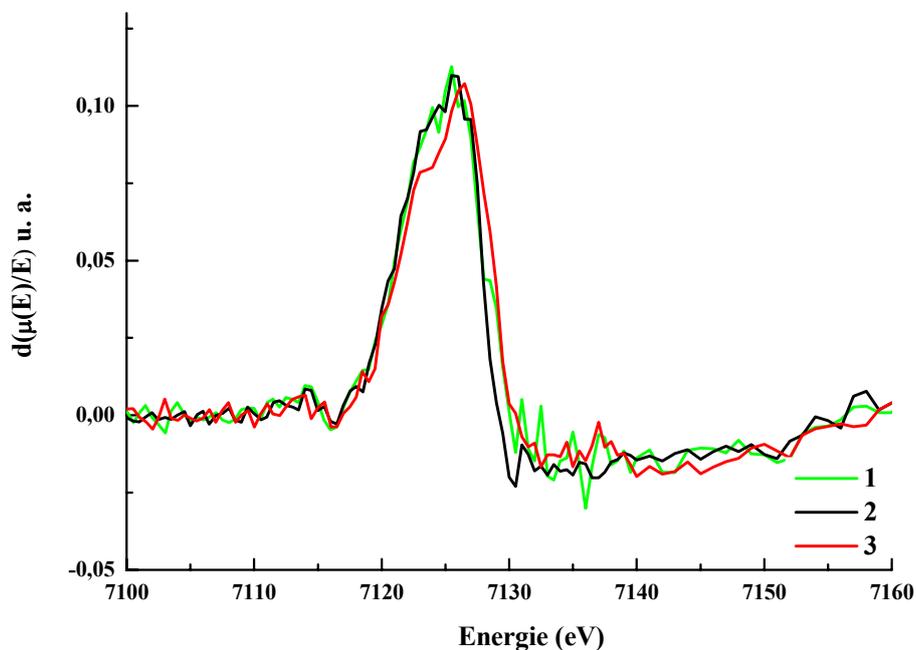


Figure 44 : Dérivées premières des spectres d'absorption du bisglycinate de fer en présence : (1) de l'air, (2) de la dithionite ($Na_2S_2O_4$) et (3) du N_2 à pH 6,5

En conclusion, l'examen du pré-seuil et du seuil de Fe-bisglycinate aux pH extrêmes 2, 3,5 et 6,5 démontre que :

- le degré d'oxydation (la charge) de fer est la même quel que soit le pH,
- la répartition électronique est sensible au pH,
- le Fe-BIS est déligandé aux deux pH acides (2 et 3),
- le Fe-BIS semble être stable à pH 6,5 même en présence de l'air et garde sa forme Fe^{2+} .

L'étude de la stabilité du Fe-bisglycinate en présence de β -lactoglobuline a été menée à pH 6,5 et 3,5, pH qui ont été utilisés pour l'ensemble de ce travail (stabilité chimique ou physico-chimique des émulsions enrichies en bisglycinate de fer).

Les spectres XANES du Fe-BIS, en présence ou non de β -lactoglobuline à pH 6,5, sont présentés dans les Figure 45 (le spectre initial) et Figure 46 (dérivée première).

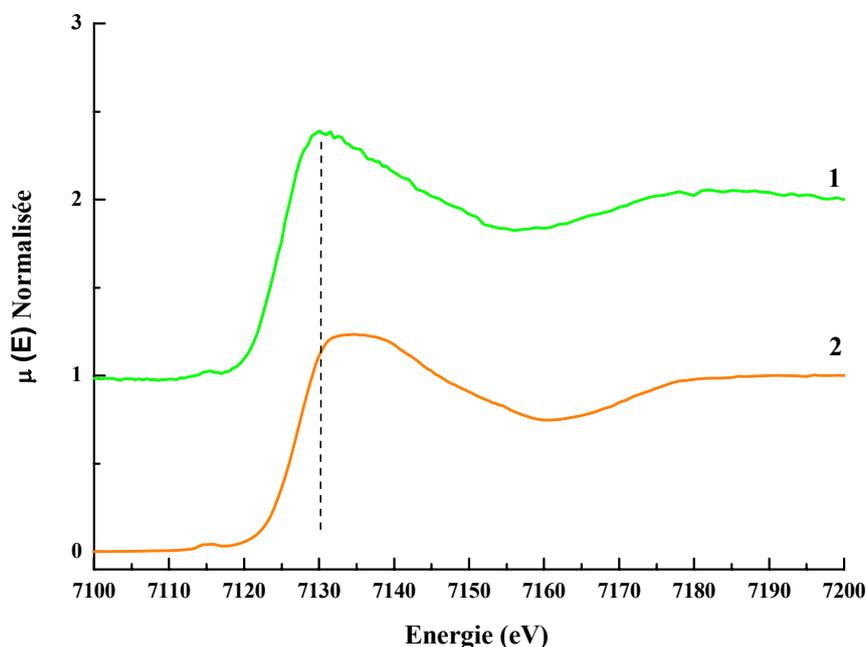


Figure 45 : Spectres XANES ; (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 6,5

D'après ces figures (46 et 47), il semble qu'en présence de β -lactoglobuline, le coefficient d'absorption au seuil soit un peu plus important, et que la position en énergie du seuil soit décalée vers des énergies plus élevées (de 7125 à 7132 eV). Ces résultats tendent à indiquer un changement d'environnement du fer dans le chélate. Il se pourrait donc que malgré les résultats obtenus sur la peroxydation et l'état de l'interface H/E, il y ait un changement d'état du complexe Glycine-ion ferreux. Ce changement de seuil d'absorption des rayons-X serait relatif à l'encombrement stérique de la protéine.

La répartition électronique du fer dans le bisglycinate de fer en présence ou non de la β -lactoglobuline, à pH acide, est présentée dans les Figure 48 (spectre initial) et Figure 49 (dérivée première). A pH 3,5, contrairement à pH 6,5, la superposition des maxima énergétiques des spectres obtenus en présence ou non de β -lactoglobuline, est apparente (E_{\max} à seuil K = 7126 eV).

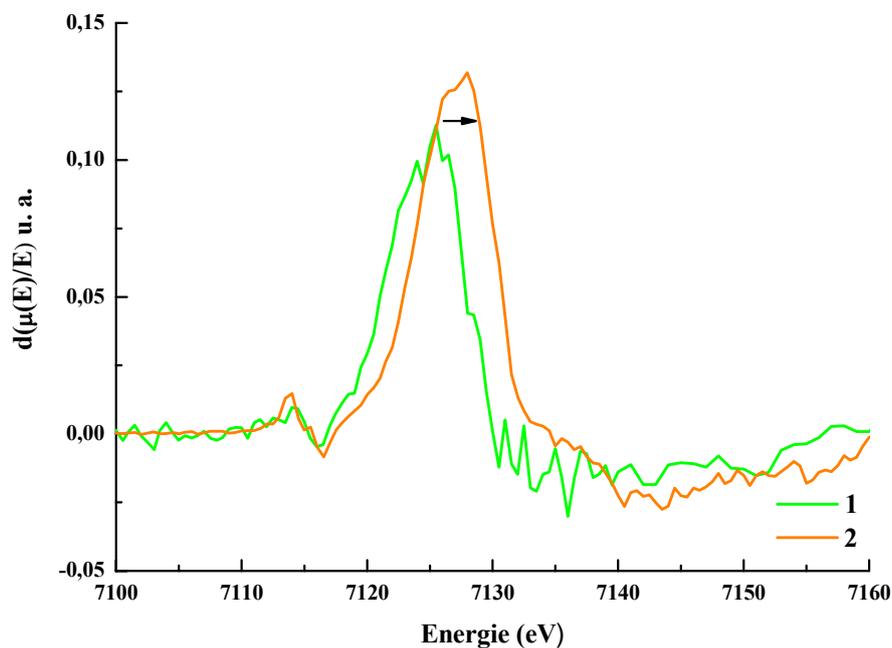


Figure 46 : Dérivées premières des spectres d'absorption : (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 6,5

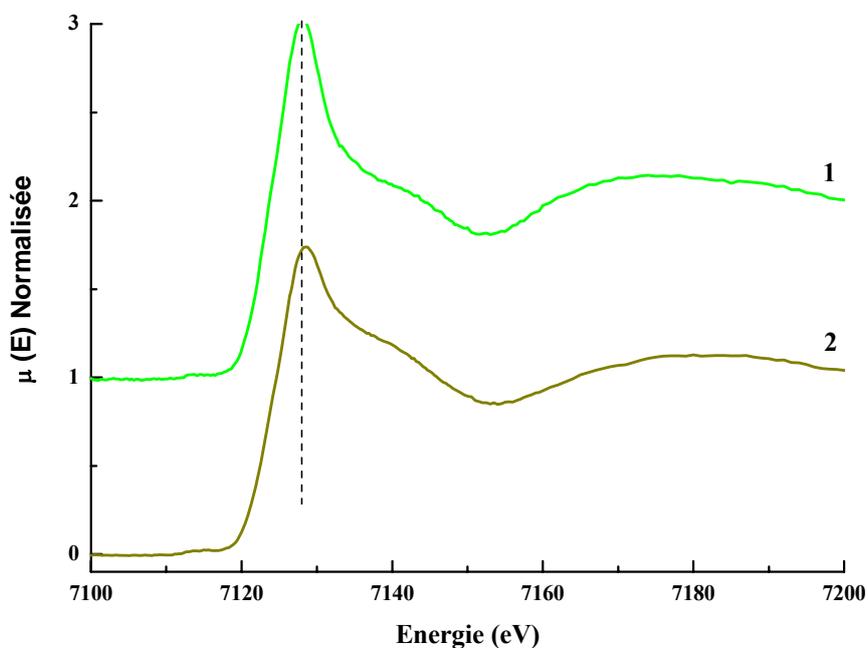


Figure 47 : Spectres XANES : (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 3,5

L'étude des dérivées des mêmes spectres XANES à pH 3,5 présentées dans la Figure 48, montre également qu'il n'y a pas de changements électroniques et de spin pour le Fe en présence de la β -lactoglobuline à ce pH.

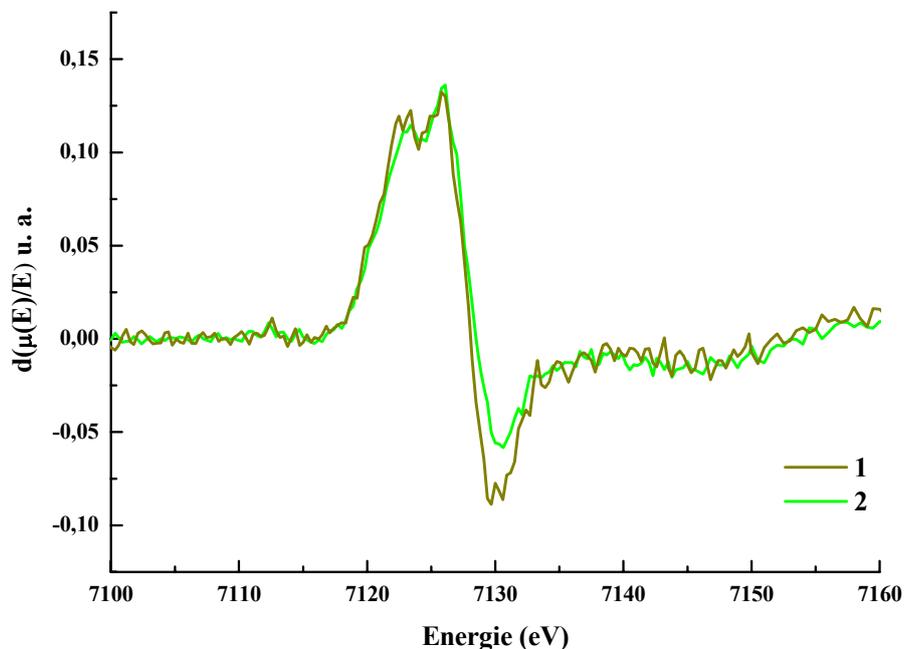


Figure 48 : Dérivée première des seuils d'absorption : (1) du bisglycinate de fer seul et (2) du bisglycinate de fer en présence de la β -lactoglobuline à pH 3,5

Pour résumer, la position en énergie du point d'inflexion principal des dérivées premières des spectres XANES est présentée dans le tableau 14 :

Tableau 14 : Les positions énergétiques du point d'inflexion principal des dérivées des spectres aux pH 2, 3,5 et 6,5 du bisglycinate de fer avec ou sans la β -lactoglobuline

	Fe-BIS (eV)		Fe-BIS avec β -lactoglobuline (eV)
pH 2	7125	≈	7127
pH 3,5	7125	≈	7126
pH 6,5	7125	<	7132

III. CONCLUSION :

Les résultats obtenus par R-X concernant la stabilité de chélate (Fe-BIS), nous permettent de conclure que ce chélate n'est pas stable à pH acide et qu'il se dissocie : $\text{Fe-BIS} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2 \text{ glycines}$. Cette dissociation pourrait expliquer les différences mesurées par AED en termes de changement de la Td et de ΔH pour la β -lactoglobuline en présence de Fe-BIS à pH acide (3,5). Ces différences ne sont sans doute pas associées au fait qu'il existe une interaction directe à ce pH entre la protéine et le chélate. Nous pouvons plutôt penser que le changement est lié à la présence des ions fer et des anions de la glycine qui sont libérés suite à la dissociation du chélate. Ces résultats sont en accord avec les observations et les résultats obtenus par McPhail et Holt (1999) et également Stirpe *et al.*, (2008), études grâce auxquelles les auteurs concluent qu'en plus du pH et de la concentration en protéines, la présence des anions et des cations peuvent aussi modifier le comportement thermique de la protéine.

Les résultats obtenus par R-X concernant le comportement du Fe-BIS en présence de la β -lactoglobuline à pH 6,5, indiquent que la position en énergie du seuil est décalée vers des énergies plus élevées (+ 7 eV). En tenant compte des résultats obtenus sur le degré d'oxydation du fer dans l'hémoglobine (Pin, 1982), la position en énergie du seuil de Fe, décalée de 5 eV pour l'hémoglobine, montre que le degré d'oxydation passe de bivalent en trivalent. Il n'est, ainsi, pas exclu que le degré d'oxydation du fer du chélate en présence de β -lactoglobuline passe de bivalent en trivalent. Ce réarrangement de valence serait « pris » en charge par la protéine, mais la perte d'un électron par l'ion ferreux n'induirait pas de peroxydation des lipides puisque l'essentiel de l'oxydation du fer II s'opèrerait en phase dispersante, lors du mélange protéine-sel de fer, et non à l'interface huile/eau, une fois l'émulsion créée.

Conclusion

Conclusion générale

Moins onéreuse qu'une stratégie d'encapsulation plus ou moins sophistiquée, la protection du fer par chélation apparaît comme la voie la plus prometteuse pour l'enrichissement des aliments en fer mais elle présente certaines difficultés. La principale difficulté réside dans la complexité de la matrice alimentaire, constituée souvent de plusieurs composés, qui peuvent déstabiliser cette protection et rendre le fer moins biodisponible au sein de l'organisme. Une perte de protection conduit aussi à des réactions d'oxydations, et encore à des agrégations ou des précipitations de différents composés. Ces réactions induisent des dégradations des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments au cours des procédés de transformation et de conservation. Enfin, l'ingestion des produits de peroxydation des lipides, pourrait à long terme, participer au développement de pathologies dégénératives telles que des désordres intestinaux chroniques, l'artériosclérose, des cancers, etc.

Des émulsions huile de colza-dans-eau stabilisées par des protéines ont été choisies comme matrices modèles pour l'enrichissement en fer, car elles miment la dispersion des lipides dans de nombreux produits alimentaires.

Nous avons fait varier plusieurs paramètres de composition des émulsions enrichies en fer pour étudier leurs impacts sur l'état d'avancement de l'oxydation et pour examiner leurs effets sur les propriétés des interfaces huile/eau.

Changer la nature de l'émulsifiant (protéine) permet de faire varier à la fois la nature chimique de l'interface (donc sa réactivité) et sa structure : son épaisseur, sa compacité et sa charge. Faire varier la nature et la concentration en sels de fer (ionique ou sous forme de chélate) permet de mieux comprendre les mécanismes qui entraînent des interactions entre le fortifiant à base de fer et le support (matrice alimentaire). Le choix d'une quantité optimale pour un enrichissement en fer est nécessaire pour minimiser les effets secondaires, comme l'oxydation. Faire varier le pH (quantité d'ions H^+) permet de modifier la réactivité du milieu. Dans le cas d'une interface protéique, le pH détermine la charge globale de l'interface (ainsi que la structure des protéines et leurs interactions intra et intermoléculaire). De même la stabilité des chélates dépend du pH. Nous l'avons donc fait varier de 2 à 6,5.

Au terme de ce travail, nous pouvons apporter de nouveaux éléments sur le rôle de la phase aqueuse et de l'interface du point de vue physico-chimique lors de l'enrichissement en fer

d'émulsions alimentaires huile-dans-eau stabilisées par deux protéines laitières. De même, nous pouvons désormais discuter de la stabilité du chélate de fer (notamment le bisglycinate de fer) en fonction du pH et de la présence de structures protéiques différentes.

Dans une première étape, l'impact de différents sels de fer (FeSO_4 , Fe-BIS, NaFe-EDTA) sur la stabilité oxydative des émulsions stabilisées par deux protéines laitière a été étudié. Deux situations d'interface ont été choisies : (i) protéine avec des groupes phosphoséryles, groupes possédant une forte affinité pour les ions bivalents, et représentée par le caséinate de sodium ; (ii) protéine sans groupes phosphoséryle, avec des groupes carboxyliques ayant une moindre affinité pour les métaux bivalents que les groupes phosphoséryles, et représentée par la β -lactoglobuline. L'oxydation des émulsions en présence d'ions fer à l'état libre (cas de FeSO_4) est confirmée : l'initiation et la propagation de l'oxydation ont été suivies par dosage des produits primaires (IP) et secondaires (sr-TBA). La présence de fer sous forme chélaté (NaFe-EDTA et Fe-BIS) diminue la réactivité du fer, en diminuant la quantité de produits issus de l'oxydation. Cependant, la nature de l'interface et du chélate ainsi que le pH de la phase aqueuse influencent la cinétique de peroxydation. Les émulsions stabilisées par la β -lactoglobuline en présence de bisglycinate de fer (Fe-BIS) à pH 6,5, pour les deux concentrations en fer utilisées (0,36 et 1,78 mM), ont montré une stabilité oxydative comparable à celles des émulsions sans Fe-BIS. Du point de vue méthodologique, les deux indices de dosages des produits primaires et secondaires issus lors de l'oxydation ont été utilisés sous une forme généralisée, en intégrant sur la durée totale d'observation. Ceci a permis d'avoir une vision globale en terme d'oxydation et également de faciliter la compréhension et l'interprétation des résultats.

Dans une deuxième étape, nous avons observé qu'en fonction du pH (2, 3,5 et 6,5), les différents sels de fer (FeSO_4 , Fe-BIS, NaFe-EDTA) n'agissaient pas de la même manière sur l'interface protéique huile/eau, en terme de comportement interfacial et de rhéologie de l'interface. À pH 6,5, l'ajout de NaFe-EDTA ou de Fe-BIS n'a pas modifié la structure de l'interface stabilisée par β -lactoglobuline contrairement aux caséinates (contenant des groupes phosphoséryles). La très faible influence de NaFe-EDTA et de Fe-BIS sur l'interface constituée de β -lactoglobuline à pH 6,5 montre qu'il n'y a probablement pas de transfert de fer à l'interface. Dans des conditions acides (pH 2 et 3,5), l'interface, stabilisée par le caséinate, n'est pas fortement modifiée par la présence de sel de fer, contrairement à

l'interface stabilisée par la β -lactoglobuline. Il semble, là, que la stabilité des chélates à pH acide soit en cause.

Dans une troisième étape, nous avons cherché à suivre la stabilité du chélate de fer, Fe-BIS, en fonction du pH et de la présence de protéine. L'effet du pH (pH 2, 3,5 et 6,5) et de la présence de la β -lactoglobuline sur la stabilité du chélate de fer (le Fe-BIS) a été déterminé. Pour répondre à ces questions, l'analyse enthalpique différentielle (AED) et d'absorption des rayons X (R-X) ont été utilisées. Par AED, en analysant les variations enthalpiques (ΔH) et la température de dénaturation (T_d) à pH 3,5, on observe des effets sur la structure de la β -lactoglobuline en présence de Fe-BIS, contrairement à ce qui est observé à pH 6,5. Les R-X montre que le chélate Fe-BIS n'est effectivement pas stable aux pH 2 et 3,5, et donc que les ions Fe deviennent ioniques (libres). Néanmoins, pour tous les pH, le Fe est sous forme bivalente. Il n'y a pas d'effet de la β -lactoglobuline sur le degré d'oxydation du Fe aux pH acides. En revanche à pH 6,5, un changement de l'environnement atomique du Fe, est observé en présence de β -lactoglobuline, car le coefficient d'absorption au seuil est un peu plus important, et que la position en énergie du seuil est décalée vers des énergies plus élevées (de 7125 à 7132 eV).

L'ensemble de ces résultats montre que la nature des protéines et des sels de fer jouent un rôle crucial sur la stabilité oxydative des émulsions enrichies en fer. La Figure 49 synthétise les différents facteurs clés impliqués dans les réactions de stabilité oxydative d'émulsions stabilisées par des protéines et enrichis en fer. L'affinité des protéines de lait pour les ions fer libre est le premier facteur qui contrôle le transfert à l'interface huile/eau. Le caséinate de sodium possède plus d'affinité pour les ions fer que la β -lactoglobuline, en raison de la présence de résidus phosphoséryls. La structure plus compacte de la β -lactoglobuline (protéine globulaire), comparativement à la structure du caséinate qui est plus flexible et ouverte, pourrait également influencer l'affinité du fer avec certains groupes fonctionnels de la protéine. En présence de bisglycinate de fer, à pH 6,5 (au-dessus du pI des protéines), la stabilité oxydative des émulsions stabilisées par la β -lactoglobuline est plus élevée que celle des émulsions stabilisées par le caséinate de sodium. La capacité du complexe à retenir les ions fer et à limiter les "ions" libres de fer est le deuxième facteur important à contrôler. Il est également évident que la présence des ions «libres» dans la phase aqueuse influence le taux d'oxydation. La possibilité de libérer des ions fer, que ce soit par un sel ionique (FeSO_4) ou par des chélates (Fe-BIS et NaFe-EDTA), est gouvernée par le pH et le type de protéine

utilisée pour la stabilisation des émulsions. Une protéine peut dissocier le sel ou déstabiliser le chélate par compétition pour l'interaction avec l'ion fer. Un troisième facteur clé dans l'oxydation de ces systèmes pourrait être le taux et la nature de la présence de groupes anti-oxydants dans la structure des protéines. Ces groupes apportent au système une activité de capture de radicaux. Néanmoins, un tel mécanisme n'a pas été démontré dans la présente étude. Pour résumer, la compétition pour les ions fer entre les groupes fonctionnels des protéines (groupes phosphates ou carboxylates) et de contre-ions de sel/chélates (glycinate, sulfate ou de l'EDTA) gouverne l'état d'oxydation du système dans des conditions neutres. En milieu acide, l'oxydation est principalement gouvernée par la stabilité du complexe et la possibilité d'avoir du fer libre dans la phase aqueuse.

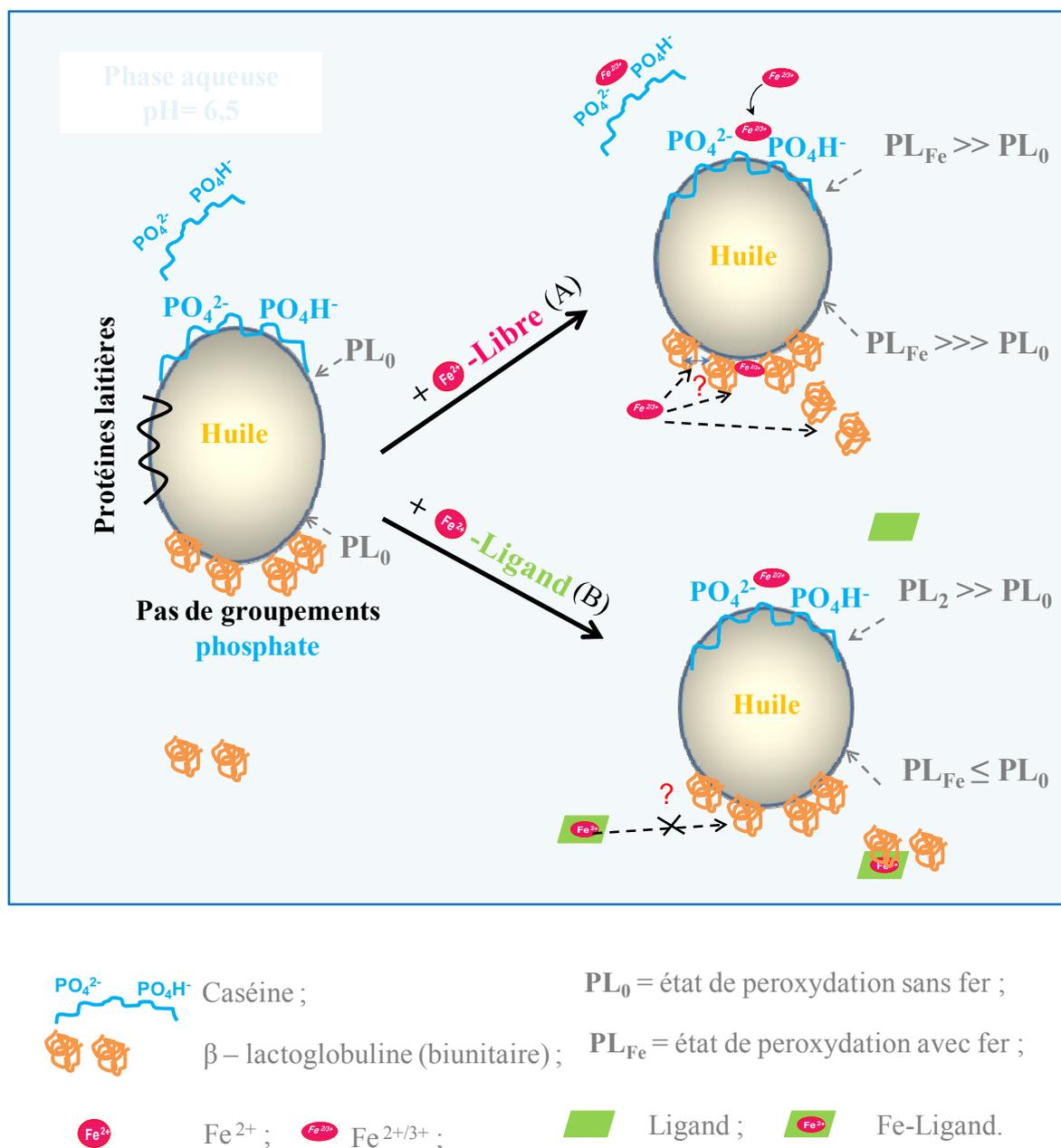


Figure 49 : Représentation schématique du rôle des protéines lactières sur la stabilité oxydative de système émulsionné : le caséinate de sodium et la β -lactoglobuline (protéines avec et sans groupements phosphate en présence) (A) de fer sous forme ionique (libre) (B) de fer sous forme chélaté

Perspectives

Pour poursuivre ce travail, d'autres investigations pourraient être envisagées pour garantir la stabilité du bisglycinate de fer, afin de confirmer sa capacité à réduire l'oxydation, aussi bien dans des produits alimentaires qu'au sein de l'organisme humain.

Il s'agirait, dans un premier temps d'étudier le rôle de l'épaisseur de la couche protéique adsorbée et la quantité de protéines à l'interface huile/eau pour mieux comprendre le mécanisme impliqué dans les différences de stabilité oxydative des émulsions stabilisées par le caséinate de sodium ou la β -lactoglobuline. Ensuite, il s'agirait de déterminer la quantité de fer restant dans la phase aqueuse et celle fixée par les protéines à l'interface. Enfin, l'impact de la force ionique du milieu sur la stabilité du chélate devrait être étudié, car ce paramètre est susceptible de modifier les interactions entre les constituants de la matrice alimentaire.

Concernant la méthodologie, on pourrait confirmer les résultats des produits primaires (IP) et secondaires (sr-TBA) en dosant aussi les radicaux hydroxyles et alcoxyles, car ce sont les premiers obtenus en présence des ions métalliques oxydants.

Il serait aussi important de relier le métabolisme d'absorption du fer dans l'organisme humain et la nature du support (aliment vecteur) du fer. Il s'agirait d'identifier l'éventuelle existence d'autres voies d'assimilation du fer au niveau intestinal que celles déjà connues (transporteur d'ion bivalent : voie passive, ou récepteur spécifique de l'hème : voie active), comme la voie liée à l'assimilation des acides aminés. Cette dernière pourrait conduire une meilleure assimilation du fer à partir du fer bisglycinate par rapport au sulfate de fer (II) (sel communément employé pour l'enrichissement des aliments en fer).

D'un point de vue applicatif, deux questions importantes se posent : est-il préférable de consommer des aliments enrichis en fer à la fin d'un repas lorsque le pH gastrique est plus élevé qu'au début du repas ? Est-il suffisant de stabiliser l'émulsion avec des protéines non phosphorylées ou un surfactant neutre pour éviter l'oxydation lorsque des suppléments de fer sont ajoutés à l'émulsion ?

Toujours pour compléter les dosages IP et SRATB il s'agirait de faire des analyses sensorielles pour connaître l'acceptabilité des produits créés par le consommateur.

Enfin, un apport efficace pour la réduction de l'anémie ferriprive de la population cible (ou pour prévenir la population carencée) ne doit pas compromettre l'aspect hédonistique de l'aliment, sous peine de refus et donc d'échec dans la lutte contre l'anémie.

Bibliographie

Références Bibliographiques

- AFSSA. **2005**. AFSSA : acides gras de la famille oméga-3 et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations et AFSSA, avril 2005. Risques et bénéfices pour la santé des acides gras trans apportés par les aliments – Recommandations.
- ALAMED J., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2006**. Influence of heat processing and calcium ions on the ability of EDTA to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions containing omega-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 95: 585-590.
- ALLEN L.H. **1997**. Pregnancy and iron deficiency: unresolved issues. *Nutrition Reviews*, 55: 91-101.
- ALLEN L.H. **2002**. Advantages and limitations of iron amino acid chelates as iron fortificants. *Nutrition Reviews*, 60: 18-21.
- ALMAAS R., ROOTWELT T., OYASSTER S. & SAUGSTAD O.D. **1997**. Ascorbic acid enhances hydroxyl radical formation in iron fortified infant cereals and infant formulas. *Spriger-Verbag*, 156: 488-492.
- ASAKAWA T. & MATSUSHITA S. **1980**. Thiobarbituric test for detecting lipid peroxides. *Lipids*, 14: 453-457.
- ASHMEAD H.D., GRAFF D.J. & ASHMEF H.H. **1985**. Intestinal absorption of metal ions and chelates. *Springfield, IL*: 1-125.
- ASHMEAD S.D. **2001**. The chemistry of ferrous bis-glycinate chelate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51: 7-12.
- BAUMY J.J. & BRULE G. **1988**. Effect of pH and ionic-strength on the binding of bivalent-cations to α -casein. *Lait*, 68: 409-417.
- BEARS G. **2002**. Dietary iron intakes and elevated iron stores in the elderly: is it time to abandon the set-point hypothesis of regulation of iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 11896-11901.
- BELITZ H.D., GROSCH W. & SCHIEBERLE P. **2004**. Lipids. In: *Food chemistry 3rd revised edition*, pp. 157-244. Springer-Verlag, Berlin.
- BENDICH A., MACHILIN J., SCANDURRA O., BURTON G.W. & WAYNER D.D.M. **1986**. The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2: 419-444.
- BENITO P. & MILLER D. **1998**. Iron absorption and bioavailability: an update review. *Nutrition Research*, 18: 581-603.
- BENJAMINS J., CAGNA A. & LUCASSEN-REYNDERS E.H. **1996**. Viscoelastic properties of triacylglycerol/water interface covered by proteins. *Colloids and Surfaces A*, 114: 245-254.

- BENNETT T., DESMOND A., HARRINGTON M., MCDONAGH D., FRITZGERLD R., FLYNN A. & CASHMAN K.D. **2000**. The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in the rat. *British Journal of Nutrition*, 83: 673-680.
- BERGER J., DYCK J.L., GALAN P., APOLOGAN A., SCHNEIDER D., TRAISSAC P. & HERCBERG S. **2000**. Effect of daily iron-supplémentation on iron status, cell-mediated immunity, and incidence of infections in 6-36-month-old Togolese children. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54: 29-35.
- BERSET C. & CUVELIER M.E. **1996**. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, 16: 219-245.
- BLOEM M.W., WEDEL M., VAN AGTMAAL E.J., SPEEK A.J. & SAOKONTHA S. **1996**. Vitamin A intervention: short term effects of a single oral, massive dose on iron metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51: 76-79.
- BONDET V. **1999**. *Oxydation de l'acide linoléique initiée par le système fer (II)/acide ascorbique en milieu dispersé: Mécanismes réactionnels et modes d'action de quelques antioxygènes phénoliques*. Thèse, Université de Technologie de Compiègne.
- BORS W. & BUETTNER G.R. **1997**. The vitamin C radical and its reactions. In: *Vitamin C in health and disease*, pp. 75-94. Publisher Place, New York.
- BOS M.A. & VAN VLIET T. **2001**. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactant: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91: 437-471.
- BOUGATEF A., HAJJI M., BALTI R., LASSOUED I., TRIKI-ELLOUZ Y. & NASRI M. **2009**. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114: 1198-1205.
- BOUHALLAB S., AIT-OUKHATAR N., MOLLE D., HENRY G., MAUBOIS J.L., ARHAN P. & BOUGLE D. **1999**. Sensitivity of β -casein phosphopeptide-iron complex to digestive enzymes in ligated segment of rat duodenum. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 723-727.
- BOUHALLAB S., CINGA V., AIT-OUKHATAR N., BUREAU F., NEUVILLE D., ARHAN P., MAUBOIS J.-L. & BOUGLE D. **2002**. Influence of various phosphopeptides of caseins on iron absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7127-7130.
- BOVELL-BENJAMIN A.C., VITERI F.E. & ALLEN L.H. **2000**. Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1563-1569.
- BRADLEY J. & XU X. **1996**. Diet, age, and the immune system. *Nutrition Reviews*, 54: 43-50.
- BRIOIS V., CARTIER DIT MOULIN C. & VERDAGUER M. **2000**. Seuils d'absorption des rayons X: un outil de caractérisation indispensable en chimie de coordination. *L'Actualité Chimique*, 3: 31-40.

- BURCHAM P.C. & KUHAN T. **1996**. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malonaldehyde. *Biochemical and Biophysical Communications*, 220: 996-1001.
- BYLER D.M. & SUSI H. **1986**. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25: 487-496.
- CAGNA A., ESPOSITO G., RIVIERE C., HOUSSET S. & VERGER R. **1992**. *33rd International Conference on Biochemistry of Lipids, Lyon, France*.
- CASES E., RAMPINI C. & CAYOT P. **2005**. Interfacial properties of acidified skim milk. *Journal of Colloid and Interface Science*, 282: 133-141.
- CAYOT P. & LORIENT D. **1998a**. Propriétés émulsifiantes. In: *Structures et technofonctions des protéines du lait*, pp. 288-291. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.
- CAYOT P. & LORIENT D. **1998b**. Propriétés émulsifiantes. In: *Structures et technofonctions des protéines du lait*, pp. 305-306. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.
- CAYOT P. & LORIENT D. **1998c**. Rappel sur la composition globale du lait de vache. In: *Structures et technofonctions des protéines du lait*, pp. 15-23. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.
- CHAIYASIT W., SILVESTER M.P.C., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2000**. Ability of surfactant hydrophobic tail group size to alter lipid oxydation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3077-3080.
- CHAN H.W.S. **1987**. The mechanism of autoxidation. In: *Autoxidation of unsaturated lipids*, pp. 141-206, Academic Press, London.
- CHAUD M.V., IZUMI C., NAHAAL Z., SHUHAMA T., BIANCHI M. & FREITAS O. **2002**. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 871-877.
- CHENG Z. & LI Y. **2007**. What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: an update. *American Chemical Society. Chemical Reviews*, 107: 748-766.
- CHO S.Y., MIYASHITA T., FUJIMOTO K. & KANEDA T. **1987**. Autoxidation of ehtyl eicosapentaenoate and docosahexanoate. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 64: 876-879.
- CHO Y.-J., ALAMED J., MCCLEMENTS D.J. & DECCKER E.A. **2003**. Ability of chelators to alter the physical location and prooxidant activity of iron in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry and Toxicology*, 68: 1952-1957.
- CHO Y.-J., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2002**. Ability of surfactant micelles to alter the physical location and reactivity of iron in oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5704-5710.

- CILLARD J. & CILLARD P. **1980**. Pro-oxidant effect of α -tocopherol on essential fatty acids in aqueous media. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 34: 579-592.
- COOK J.D., CARRIAGA M., KAHN S.G., SCHALCH W. & SKIKNE B. **1990**. Gastric delivery system for iron supplementation. *Lancet*, 335: 1136-1139.
- COUPLAND J.N. & MCCLEMENTS D.I. **1996**. Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 7: 783-791.
- CREMONESI P. & CARAMAZZA I. **1993**. Clinical and biological characterization of iron-protein succinylated. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 31: 40-51.
- DALGLEISH D.G. & LEAVER J. **1990**. Dimensions and possible structures of milk proteins at oil-water interfaces. In: *Food polymers, gels, and colloids*, pp. 113-122. Royal society of chemistry, Cambridge.
- DARY O. **2002**. Staple food fortification with iron: a multifactorial decision. *Nutrition Reviews*, 60: 34-41.
- DAUPHAS S., AMESTOY M., LLAMAS G., ANTON M. & RIAUBLANC A. **2008**. Modification of the interactions between β -casein stabilised oil droplets with calcium addition and temperature changing. *Food Hydrocolloids*, 22: 231-238.
- DECKER E.A. **1998a**. Antioxidant Mechanisms. In: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, pp. 397-421. Marcel Dekker, New York.
- DECKER E.A. **1998b**. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 241-248.
- DECKER E.A., WARNER K., RICHARDS M.P. & SHAHIDI F. **2005**. Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4303-4310.
- DECKER E.A. & XU Z. **1998**. Minimizing rancidity in muscle food. *Food Technology*, 52: 54-61.
- DIAZ M., DUNN C.M., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2003**. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2365-2370.
- DICKINSON E. **1996**. An introduction to food colloids. In: *Les colloïds alimentaires*. Oxford science publications, Oxford.
- DICKINSON E. **1998**. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 347-354.
- DICKINSON E. **2001**. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20: 197-210.

- DICKINSON E. & EUSTON S.R. **1990**. Computer simulation of macromolecular simulation of macromolecular adsorption. In: *Food polymers, gels and colloids*, pp. 132-146. Royal society of chemistry, Cambridge.
- DICKINSON E., RADFORD S.J. & GOLDING M. **2003**. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, 17: 211-220.
- DIMAKOU C., KIOKIAS S., TSARPOUNI I. & OREOPPOULOU V. **2007**. Effect of processing and storage parameters on oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophysics*, 2: 38-45.
- DOBARGANES M.C. & VELASCO J. **2002** Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 420-428.
- DONG A., HUANG P. & CAUGHEY W.S. **1990**. Proteins secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*, 29: 3303-3308.
- DONG A., MATSUURA J., ALLISON S.D., CHRISMAN E., MANNING M.C. & CARPENTER J.F. **1996**. Infrared and circular dichroism spectroscopic characterization of structural differences between beta-lactoglobulin A and B. *Biochemistry*, 35: 1450-1457.
- DONNELLY J.L., DECKER E.A. & MCCLEMENTS D.J. **1998**. Iron-catalyzed oxidation of menhaden oil as affected by emulsifiers. *Journal of Food Science*, 63: 997-1000.
- DRAGO S.R. & VALENCIA M.E. **2008**. Mineral dialyzability in milk and fermented dairy products fortified with FeNaEDTA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2553-2557.
- DREOSLI I.E. **1996**. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutrition Reviews*, 54: 51-58.
- DUFOUR E. & ROBERT P. **2000**. La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. In: *Protéines* pp. 107-137. Tec & Doc, Paris.
- DUH P.D., YEN W.J. & YEN G.C. **1999**. Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids and soybean oil in an aqueous solution with emulsifiers. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76: 201-204.
- EDWARDS C.Q., GRIFFEN L.M., GOLDGAR D., DRUMMOND C., SKOLNICK M.H. & KUSHNER J.P. **1988**. Prevalence of hemochromatosis among presumably healthy blood donors. *New England Journal of Medicine*, 318: 1355-1362.
- EFSA **2006**. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to ferrous bisglycinate as a source of iron for use in the manufacturing of foods and in food supplements. *Journal Question number EFSA-Q-2005-039*, 299: 1-17.
- EIGEL W.N., BUTLER J.E., ERNSTROM C.A. & FARRELL H.M. **1984**. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67: 1599-1620.

- ELIAS R.J., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2007**. Impact of thermal processing on the antioxidant mechanisms of continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 104: 1402-1409.
- FANG Y. & DANGLEISH D.G. **1997**. Conformation of β -lactoglobulin studied by FTIR: Effect of pH, temperature, and adsorption to the oil-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 196: 292-298.
- FAO/ILSI **1997**. A manual for policy makers and programme planners. In: *Preventing micronutrient malnutrition: a guide to food-based approaches*, pp. 60-67. Food and Agricultural Organization, Rome.
- FARAJI H., MCCLEMENTS J.D. & DECKER E.A. **2004**. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4558-4564.
- FARRELL H.M., COOKE P.H., KING G., HOAGLAND P.D., GROVES M.L., KUMOSINSKI T.F. & CHU B. **1996**. Particle sizes of casein submicelles and purified κ -casein. In: *Macromolecular interactions in food technology*, pp. 61-79. American Chemical Society Symposium, Washington.
- FLANAGAN J. & FITZ GERALD R.J. **2003**. Functional properties of Bacillus proteinase hydrolysates of sodium caseinate incubated with transglutaminase pre- and post-hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13: 135-143.
- FOX K.K., HOLSINGER V.H., POSATI L.P. & PALLANSCH M.J. **1967**. Separation of β -lactoglobulin from other milk serum proteins by trichloacetic acid. *Journal Dairy Science*, 50: 1363-367.
- FOX T.E., EAGLES J. & FAIRWEATHER-TAIT S.J. **1998**. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67: 664-668.
- FRANKEL E.N. **1993**. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 7: 4220-4225.
- FRANKEL E.N. **1980**. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, 22: 1-33.
- FRANKEL E.N. **1985**. Chemistry of autoxidation: mechanism, products, and flavor significance. In: *Flavor chemistry of fats and oils*, pp. 1-37. American Oil Chelmists' Society, United States of America.
- FRANKEL E.N. **1995**. Natural and biological antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications. *Lipid Technologies*, 7: 77-80.
- FRANKEL E.N. **1998a**. Free radical oxidation. In: *Lipid oxidation*, pp. 347-363. Oily Press Dundee, Scotland.
- FRANKEL E.N. **1998b**. Oxidation in multiphase systems. In: *Lipid oxidation*, pp. 259-299. Lipid Technology, University of California, USA.

- FRANKEL E.N., HUANG S.W., KANNER J. & GERMAN B. **1994**. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1054-1059.
- FUKUZAWA K., SEKO T., MINAMI K. & TERAOKA J. **1993**. Dynamics of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation in charged and uncharged phospholipid vesicles. *Lipids*, 28: 497-503.
- FURIA T.E. **1972**. Chapter 6-sequestrants in food. In: *CRC Handbook of food additives*, pp. 1-10. Ohio: CRC Press, New York.
- GAONKAR A.G. **1989**. Interfacial tension of vegetable oil/water system: effect of oil purification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66: 1090-1092.
- GARBY L. & AREEKUL S. **1974**. Iron supplementation in Thai fish-sauce. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 68: 467-476.
- GARCÍA-CASAL M.N. & LAYRISSE M. **2001**. The effect of change in pH on the solubility of iron bis-glycinate chelate and other iron compounds. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51: 35-36.
- GARDNER H.W. **1979**. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 220-229.
- GAUCHERON F. **2004a**. Environnement minéral et propriétés fonctionnelles des protéines sériques. In: *Minéraux et produits laitiers*, pp. 330, 384-394, 438-443. Lavoisier, Paris.
- GAUCHERON F. **2004b**. Interaction caséines-cations. In: *Minéraux et produits laitiers*, pp. 81-112. Lavoisier, Paris.
- GAUCHERON F., LE GRAËT Y., BOYAVAL E. & PIOT M. **1997**. Binding of cations to casein molecules: Importance of physico-chemical conditions. *Milchwissenschaft*, 52: 322-327.
- GENOT C. **2000**. Congélation et qualité de la viande. In: *Techniques et pratiques*, pp. 1-98. INRA Editions, Paris.
- GENOT C., MEYNIER A., RIAUBLANC A. & CHOBERT J.M. **2003**. Protein alterations due to lipid oxidation in multiphase systems. In: *Lipid oxidation pathways*, pp. 265-292. AOACS Press Champaign., Blaubeuren.
- GRAHAM D.E. & PHILIPS M.C. **1979**. Proteins at lipids interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70: 403-439.
- GROSCHE W. **1982**. Lipid degradation products and flavour. In: *Food flavours*, pp. 325-398. Elsevier Science, Amsterdam.

- GU Y.S., REGNIER D. & MCCLEMENTS D.J. **2005**. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by β -lactoglobulin- κ -carrageenan membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 256: 551-558.
- GUESRY P. **1998**. The role of nutrition in brain development. *Preventive Medicine*, 27: 189-194.
- GUZUN-COJOCARU T., CAYOT P., LOUPIAC C. & CASES E. **2010**. Effect of iron chelates on oil-water interface, stabilized by milk proteins: The role of phosphate groups and pH. Prediction of iron transfer from aqueous phase toward fat globule surface by changes of interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 24: 364-373.
- HALLIDAY J.W. **1998**. Hemochromatosis and iron needs. *Nutrition Reviews*, 56: 30-37.
- HALLIWELL B. **1991**. The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species. In: *Free radicals and food additives*, pp. 37-57. Academic Press, London.
- HALTERMAN J.S., KACZOROWSKI J.M., ALIGNÉ C.A., AUINGER P. & SZILAGYI P.G. **2001**. Iron deficiency and cognitive achievement among school-aged children and adolescents in USA. *Journal of the American Academy of Pediatrics*, 107: 1381-1386.
- HAREL S. **1994**. Oxidation of ascorbic acid and metal ions as affected by NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2402-2406.
- HEGENAUER J., P. S. & NACE G. **1979**. Iron (III)-phosphoprotein chelates: stoichiometric equilibrium constant for interaction of iron (III) and phosphorylserine residues of phosphovitin and casein. *Biochemistry*, 18: 3865-3879.
- HENDRICKS D.G. & ASHMEAD S. **1995**. Stability of ferrochel in food fortification as measured by TBARS and lipid peroxidation: preliminary report. Submitted to: EFSA by Albion Laboratories, Inc., Clearfield, Utah.
- HERCBERG S. **1988**. Facteurs affectant la balance en fer de l'organisme. In: *La carence en fer et nutrition humaine*. Lavoisier, Paris.
- HERCBERG S. & GALAN P. **1989**. Biochemical effects of iron deprivation. *Acta Paediatrica Scandinavica. Supplement*, 361: 63-70.
- HILLIAM M. **1998**. The market for functional foods. *International Dairy Journal*, 8: 349-353.
- HIND A.R., BHARGAVA S.K. & MCKINNON A. **2001**. At the solid/liquid interface FTIR/ATR – the tool of choice. *Advances in Colloid and Interface Science*, 93: 91-114.
- HOLT C. **1982**. Inorganic constituents of skim milk. III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk. *Journal of Dairy Research*, 49: 29-38.
- HSIEH R.J. & KINSELLA J.E. **1989**. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33: 233-341.

- HU M., MCCLEMENTS D.J. & DECKER A.A. **2003a**. Impact of whey protein emulsifier on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1435-1439.
- HU M., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2003b**. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1696-1700.
- HUANG S.W., FRANKEL E.N. & GERMAN J.B. **1994**. Antioxidant activity of α - and γ -tocopherols in bulk oils and in oil-in water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2018-2114.
- HUANG S.W., FRANKEL E.N., SCHWARZ K. & GERMAN J.B. **1996a**. Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2496-2502.
- HUANG S.W., HOPIA A., SCHWARZ K., FRANKEL E.N. & GERMAN J.B. **1996b**. Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 444-452.
- HULTIN H.O. **1992**. Lipid oxidation in fish muscle. In: *Advances in seafood biochemistry. Composition and quality*, pp. 99-122. Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania.
- HULTIN H.O. **1994**. Oxidation of lipids in seafoods. In: *Seafoods: chemistry, processing technology and quality*, pp. 49-74. Blackie Academic & Professional, New York.
- HURRELL R.F. **1997**. Bioavailability of iron. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51: 4-8.
- HURRELL R.F. **1998**. Improvement of trace element status through food fortification: technological, biological and health aspects. *Nutrition Diets*, 54: 40-57.
- HURRELL R.F., LYNCH S., BOTHWELL T., CORI H., GLAHN R., HERTRAMPF E., KRATKY Z., MILLER D., RODENSTEIN M., STREEKSTRA H., TEUCHER B., TURNER E.Y., C. K. & ZIMMERMANN M.B. **2004**. Enhancing the absorption of fortification iron a SUSTAIN task force report *1st International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74: 387-401.
- HURRELL R.F., REDDY M.B., BURRI J. & COOK J.D. **2000**. An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods. *British Journal of Nutrition*, 84: 903-910.
- HURRELL R.F., REDDY M.B., J. B. & COOK J.D. **2002**. Phytate degradation determines the effect of industrial processing and home cooking on iron absorption from cereal-based foods. *British Journal of Nutrition*, 88: 117-123.
- JACKSON L.S. & LEE K. **1992**. The effect of dairy products on iron availability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31: 259-270.

- JACOBSEN C., HARTVIGSEN K., THOMSEN M.K., HANSEN L.F., LUND P., SKIBSTED L.H., HOMER G., ADLER-NISSEN J. & MEYER A.S. **2001**. Lipid oxidation in fish oil enriched mayonnaise: calcium disodium ethylenediaminetetraacetate, but not gallic acid, strongly inhibited oxidative deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1009-1019.
- JANEIRO D.R. **1990**. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 9: 515-540.
- JEPPSEN R.B. & BORZELLECA J.F. **1999**. Safety evaluation of ferrous bisglycinate chelate. *Food Chemistry and Toxicology*, 37: 723-731.
- JOURDAIN L., LESER M.E., SCHMITT C., MICHEL M. & DICKINSON E. **2008**. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: Relationship to complexation in solution. *Food Hydrocolloids*, 22: 647-659.
- KANAZAWA A., SAWA T., AKAIK T. & MAEDA H. **2000**. Formation of abasic sites in DNA by t-butyl peroxy radicals: implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. *Cancer Letters*, 156: 51-55.
- KANNER J., SALAN M.A., HAREL S. & SHEGALVICH I. **1991**. Lipid peroxidation of muscle food: the role of cytosolic fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 242-246.
- KARLESKIND A. **1992**. *Manuel des corps gras*. Lavoisier Tec & Doc, Paris.
- KELLERBY S.S., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2006**. Role of proteins in oil-in-water emulsions on the stability of lipid hydroperoxides. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 7879-7884.
- KEOWMANEECHAI E. & MCCLEMENTS D.J. **2002**. Influence of EDTA and citrate on physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions containing CaCl₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7145-7153.
- KER Y.-B., CHEN K.-C., CHYAU C.-C., CHEN C.-C., GUO J.H., HSIEH C.-L., WANG H.-E., PENG C.-C., CHANG C.-H. & PENG R.Y. **2005**. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerged-cultured *agaricus blazei* mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7052-7058.
- KHAYAT A. & SCHWALL D. **1983**. Lipid oxidation in seafood. *Food Technology*, 37: 130-140.
- KINSELA J.E. & WHITEHEAD D.M. **1989**. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33: 343-438.
- KIOKIAS S., DIMAKOU C. & OREOPPOULOU V. **2007**. Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. *Food Chemistry*, 105: 94-100.
- KLINKESORN U., SOPHANODORA P., CHINACHOTI P., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2005**. Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with

- electrostatic layer-by-layer deposition technology. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53: 4561-4566.
- KRISDHASIMA V., VINARAPHONG P. & MCGUIRE J. **1993**. Adsorption kinetics and elutability of α -lactalbumin, β -casein, β -lactoglobulin and bovine serum albumin at hydrophobic and hydrophilic interfaces. *Journal Colloid Interface Science*, 161: 325-334.
- KUBOW S. **1992**. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology & Medicine*, 12: 63-81.
- LADIKOS D. & LOUGOVOIS V. **1990**. Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry*, 35: 295-314.
- LAGUERRE M., LECOMTE J. & VILLENEUVE P. **2007**. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 244-282.
- LAYRISSE M., GARCÍA-CASAL M.N., SOLANO L., BARÓN M.A., ARGUELLO F.L., D., RAMÍREZ J., LEETS I. & TROPPER E. **2000**. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2195-2199.
- LEE K. & CLYDESDALE F.M. **1980**. Chemical changes of iron in food and drying processes. *Journal of Food Science*, 45: 711-715.
- LEE K.H., JUNG M.Y. & KIM S.Y. **1997**. Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the photosensitized oxidation of oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74: 1053-1057.
- LEE S.P., CHO S. & BATT C.A. **1993**. Enhancing the gelation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41: 1343-1348.
- LEFÈVRE T. & SUBIRADE M. **1999**. Structural and interaction properties of β -lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 419-428.
- LEFÈVRE T. & SUBIRADE M. **2001**. Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform infrared spectroscopy: model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15: 365-376.
- LEMAN J. & KINSELLA J.E. **1989**. Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28: 115-138.
- LETHUAUT L., MÉTRO F. & GENOT C. **2002**. Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil in water emulsions stabilized by protein. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79: 425-430.
- LI W., BOWERS J.A., CRAIG J.A. & PERNG S.K. **1993**. Sodium tripolyphosphate stability and effect in ground turkey meat. *Journal of Food Science*, 58: 501-504.

- LOFTI M., VENKATESH M.M., MERX R., NABER V.-D. & HEUVEL P. **1996** Micronutrient fortification of foods. Current practices, research and opportunities: the micronutrient initiative. *International Development Research Center/International Agriculture Centre*.
- LOPEZ C. & DUFOUR E. **2001**. The Composition of the milk fat globule surface alters the structural characteristics of the coagulum. *Journal of Colloid Interface Science*, 233: 241-249.
- LOUPIAC C., BONETTI M., PIN S. & CALMETTES P. **2006**. β -lactoglobulin under high pressure studied by small-angle neutron scattering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 17: 211-216.
- LOZOFF B., BRITTENHAM G.M., F. V., WOLF A.W. & URRUTIA J.J. **1982**. Developmental deficits in iron deficient infants: effects of age and severity of iron lack. *Journal of Pediatrics*, 101: 948-951.
- LUCASSEN-REYNDERS E.H. **1993**. Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Structure*, 12: 12-21.
- LUCASSEN J. & BARNES G.T. **1972**. Propagation of surface tension changes over a surface with limit area. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 68: 2129-2138.
- LYNCH S.R. **2002**. Food iron absorption and its importance for the design of food fortification strategies. *Nutrition Reviews*, 60: 3-15.
- LYSIONEK A., ZUBILLAGA M., SALGUEIRO M., CARO R., SEGAL M., SHAFRAN N., SHAPIRA N. & BOCCIO J. **2002**. Bioavailability of petit-suisse cheese as food vehicle for iron fortification estimated by the prophylactic method. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 48: 315-317.
- MALASPINA A. **1996**. Functional foods: overview and introduction. *Nutrition Reviews*, 54: 4-5.
- MANCUSO J.R., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **1999**. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4112-4116.
- MARION D. & DOULIEZ J.P. **2002**. Agents émulsifiants. In: *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*, pp. 427-467. Lavoisier, Paris.
- MARTINEZ-NAVARETE N., CAMACHO M.M., MARTINEZ-LAHUERTA J., MARTINEZ-MONZO J. & FITO P. **2002**. Iron deficiency and iron fortified foods a review. *Food Research International*, 35: 225-231.
- MARTINS E.A.L., ROBALINHO R.L. & MENEGHINI R. **1995**. Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316: 128-134.

- MASON J.B., LOTFI M., DALMIYA N., SETHURAMAN K. & DEITCHLER M. **2001**. The micronutrient report: current progress and trends in the control of vitamin A, iodine, and iron deficiencies. *The Micronutrient Initiative Ottawa, Canada*, 17: 21-65.
- MATSUMURA Y., EGAMI M., SATAKE C., MAEDA Y., TAKAHASHI T., NAKAMURA A. & MORI T. **2003**. Inhibitory effects of peptide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions. *Food Chemistry*, 83: 107-119.
- MCCLEMENT D.J. **1999**. Interfacial properties and their characterization. In: *Food emulsions principles, practice, and techniques*, pp. 127-159. CRC Press, Boca Raton
- MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2000**. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65: 1270-1282.
- MCDONALD R.E. & HULTIN H.O. **1987**. Some characteristics of the enzymatic lipid-peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal-muscle. *Journal of Food Science*, 52: 15-21.
- MCMURRAY J. & FAY R.C. **1995**. *Chemistry*. Prentice Hall, New Jersey.
- MCPHAIL D. & HOLT C. **1999**. Effect of anions on the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin as measured by differential scanning microcalorimetry. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 477-481.
- MEI L., DECKER E.A. & MCCLEMENTS D.J. **1998a**. Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5072-5077.
- MEI L., MCCLEMENTS D.J., WU J. & DECKER E.A.I. **1998b**. Iron catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl. *Food Chemistry*, 61: 307-312.
- MEI L.Y., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **1999**. Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2267-2273.
- MELLIHAN R.I., LI J., MEHANSHO H. & NIELSEN S.S. **2003**. The role of iron and the factors affecting off-color development of polyphenols. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51: 2304-2316.
- MIELNIK M.B., AABY K. & SKREDE G. **2003**. Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat Science*, 65: 1147-1155.
- MIGLIORANZA L.H., MATSUO T., CABALLERO-CORDOBA G.M., DICI J.B., CYRINO E.S., OLIVEIRA I.B., MARTINS M.S., POLEZER N.M. & DICI I. **2003**. Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia prevalence in children and adolescents from deprived areas in Londrina, Parana, Brazil. *Nutrition*, 19: 419-421.

- MIYASHITA K., NARA E. & OTA T. **1993**. Oxidation stability of polyunsaturated fatty acids in aqueous solution. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57: 1638-1640.
- MORR C.V. **1979**. Conformation and functionality of milk proteins. In: *Functionality and protein structure*, pp. 65-79. American Chemical Society, Washington.
- MOTTRAM D.S. **1991**. Meat. In: *Volatile compounds in foods and beverages*, pp. 107-177, New York.
- MOUREAU C. & DUFRAISSE C. **1926**. Catalysis and auto-oxidation. Antioxygenic and pro-oxxygenic activity. *Chemical Reviews*, 3: 29-39.
- MOZURAITYTE R., RUSTAD T. & STORRO I. **2008**. The role of iron in peroxidation of polyunsaturated fatty acids in liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 537-543.
- NAGAI H., FUKUSHIMA Y., OKAJIMA K., IKEUCHI M. & MINO H. **2009**. Formation of interacting spins on flavosemiquinone and tyrosine radical in photoreaction of a blue light sensor BLUF protein TePixD. *Biochemistry*, 47: 12574-12582.
- NARVÁEZ A.J., KÁLMÁN L., LOBRUTTO R., ALLEN J.P. & WILLIAMS J.C. **2002**. Influence of the protein environment on the properties of a tyrosyl radical in reaction centers from rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, 41: 15253-15258.
- NIELSEN S. **1994**. *Introduction to the chemical analysis of foods*. Jones and Bartlett, Boston and London.
- OLIVARES M., PIZARRO F., PINEDA O., NAME J.J., HERTRAMPF E. & WALTER T. **1997**. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. *The Journal of Nutrition*, 127: 1407-1411.
- OMS-WHO **2009**. Micronutrient deficiencies http://www.wpro.who.int/health_topics/micronutrient_deficiencies.
- OSBORN H.T. & AKOH C.C. **2004**. Effect of emulsifier type, droplet size and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid based oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 84: 451-456.
- OSINCHAK J.E., HULTIN H.O., ZAJICEK O.T., KELLEHER S.D. & HUANG C.-H. **1992**. Effect of NaCl on catalysis of lipid oxidation by the soluble fraction of fish muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 12: 35-41.
- OSMAN A. K., AL-OTHAIMEEN A., **2002**. Experience with ferrous bis-glycine chelate as an iron fortificant in milk. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 72: 257-263.
- PARASKEVOPOULOU D., BOSKOU D. & PARASKEVOPOULOU A. **2007**. Oxidative stability of olive oil-lemon juice salad dressings stabilized with polysaccharides. *Food Chemistry*, 101: 1197-1204.

- PATINO J.M.R., NAVARRO GARCÍA J.M.M. & NIÑO M.R. **2001**. Protein–lipid interactions at the oil–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21: 207-216.
- PESSEN H., PURCELL J.M. & FARREL H.M. **1985**. Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 828: 1-10.
- PIN S., ALPERT B., CONGIU-CASTELLANO A., DELLA-LONGA S. & BIANCONI A. **1994**. X-ray absorption spectroscopy of hemoglobin. *Methods in Enzymology*, 232: 266-292.
- PINEDA O. & ASHMEAD H.D. **2001**. Effectiveness of treatment of iron-deficiency anemia in infants and young children with ferrous bis-glycinate chelate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 17: 381-384.
- PITKOWSKI A., TACO N. & DURAND D. **2009**. Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*, 23: 1164-1168.
- POISSON J.P. & NARCE M. **2003**. Corps gras alimentaires : aspects chimiques, biochimiques et nutritionnels. In: *Lipides et corps gras alimentaires*, pp. 1-50. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.
- POKORNY J. **1981**. Browning from lipid protein interactions. *Nutrition and Food Science*, 5: 421-428.
- POKORNY J. **1987**. Major factors affecting the autoxidation of lipids. In: *Autoxidation of unsaturated lipids*, pp. 141-205, Academic Press: London, U. K.
- POKORNY J. **2003**. Problèmes de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. In: *Lipides et corps gras alimentaires*, pp. 60-63. Tec & Doc, Londres-Paris-New York.
- POLLITT E. **1993**. Iron deficiency and cognitive function. *Annual Review of Nutrition*, 13: 521-537.
- POLLITT E. **1997**. Iron deficiency and educational deficiency. *Nutrition Reviews*, 55: 133-140.
- PONGINEBBI L. **1999**. Oxidation of substrate, emulsifier, and sugar concentration. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76: 131-138.
- PORTER W.L. **1993**. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicology and Industrial Health*, 9: 93-122.
- POTHAKAMURY U.R. & BARBOSA-CANOVAS G.V. **1997**. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Sciences and Technology*, 6: 397-406.
- PRASAD A.S. **1978**. Trace elements and iron in human metabolism. In: *Iron*, pp. 77-157. Plenum Medical Book Company, New York.

- PRYOR W.A., STANLEY J.P. & BLAIR E. **1976**. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 11: 370-379.
- PUISIEUX F. & SEILLER M. **1983**. *Galenica 5 : les systèmes dispersés – agents de surface et émulsions*. Lavoisier, Paris.
- QI X.L., BROWNLOW S., HOLT C. & SELLERS P. **1995**. Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1248: 43-49.
- RAMAKRISHNAN U. & YIP R. **2002**. Experiences and challenges in industrialized countries: control of iron deficiency in industrialized countries. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 132: 820-824.
- RAWLE A. **2002**. The importance of particle sizing to the coatings industry. Part 1 : particle size measurement. *Advances in Colour Science and Technology*, 5: 1-12.
- RELKIN P. **1998**. Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β -lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22: 59-66.
- REMONDETTO G.E. & SUBIRADE M. **2003**. Molecular mechanisms of Fe^{2+} -induced β -lactoglobulin cold gelation: an interaction story. *Biopolymers*, 69: 461-469.
- RENARD D., LEFEBVRE J., GRIFFIN M.C.A. & GRIFFIN W.G. **1998**. Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22: 41-49.
- ROOZEN J.P., FRANKEL E.N. & KINSELLA J.E. **1994**. Enzymic and autoxidation of lipids in low fat foods - model of linoleic acid in emulsified triolein and vegetable oils. *Food Chemistry*, 50: 39-43.
- ROSSEL J.B. **1994**. Measurement of rancidity. In: *Rancidity of foods*, pp. 22-53. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- ROTH S. **2001**. Etude de films protéiques aux interfaces huile/eau par tensiométrie et rhéologie interfaciale. In, pp. 2-29. Thèse, Université de Bourgogne.
- RUTH S.M., ROOZEN J.P., POSTHUMUS M.A. & JANSEN F.J.H. **1999**. Volatile composition of sunflower oil-in-water emulsions during initial lipid oxidation : influence of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4365-4369.
- SALAGER J.L. **1996**. Guidelines for the formulation, composition and stirring of attain desired emulsion properties (type, droplet size, viscosity and stability). In: *Surfactants in solution*, pp. 261-291. Marcel Dekker, New York.
- SALOVAARA S., SANDBERG A.S. & ANDLID T. **2002**. Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6233-6238.

- SCHUMANN K. **2001**. Safety aspects of iron in food. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45: 91-101.
- SEMPOS C.T. & LOOKER A.C. **1999**. Iron status and the risk of coronary heart disease. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 9: 294-303.
- SHAHIDI F. & WANASUNDARA U.N. **1998**. Methods of measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: *Food lipids, chemistry, nutrition, and biotechnology*, pp. 377-396. Marcel Decker, New York.
- SHEARS G.E., LEDWARD D.A. & NEALE R.J. **1987**. Iron complexation to carboxyl groups in a bovine serum-albumin digest. *International Journal of Food Science and Technology*, 22: 265-272.
- SHI X., LEONARD S.S., LIU K.J., ZANG L., GANNETT P.M., ROJANASAKUL Y., CASTRANOVA V. & VALLYATHAN V. **1998**. Cr(III)-mediated hydroxyl radical generation via Haber-Weiss cycle. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 69: 263-268.
- SHIMADA K., FUJIKAWA K., YAHARA K. & NAKAMURA T. **2002**. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948.
- SHIMADA K., MUTA H., NAKAMURA Y., OKADA H., MATSUO K., YOSHIOKA S., MATSUDAIRA T. & NAKAMURA T. **1992**. Iron-binding property and antioxidative activity of xanthan on the autoxidation of soybean oil in emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1607-1611.
- SINGH R.L. & BARRAND M.A. **1990**. Lipid peroxidation effects of a novel iron compound, ferric maltol. A comparison with ferrous sulphate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 42: 276-279.
- SIRENDI M., GOHTANI S. & YAMANO Y. **1998**. Effect of some polysaccharides on oxidative stability of methyl linoleate in emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 19: 679-694.
- SLIVKA A., KANG J. & COHEN G. **1986**. Hydroxyl radicals and the toxicity of oral iron. *Biochemical Pharmacology*, 35: 553-556.
- SMITH B. **1999**. The basics of infrared interpretation. In: *Infrared spectral interpretation*, pp. 1-25. CRC Press, Boca Raton.
- SOFOS J.N. **1986**. Use of phosphates in low-sodium meat-products. *Food Technology*, 40: 52-61.
- STEIN A.J., NESTEL P., MEENAKSHI J.V., QAIM M., SACHDEV H.P. & BHUTTA Z.A. **2007**. Plant breeding to control zinc deficiency in India: how cost effective is biofortification. *Public Health Nutrition*, 10: 492-501.

- STIRPE A., RIZZUTI B., PANTUSA M., BARTUCCI R., SPORTELLI L. & GUZZI R. **2008**. Thermally induced denaturation and aggregation of BLG-A: effect of the Cu²⁺ and Zn²⁺ metal ions. *European Biophysics Journal*, 37: 1351-1360.
- STRAHM A., AMADÒ, R. & NEUKOM H. **1981**. Hydroxyproline-galactoside as a protein-polysaccharide linkage in a water soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm *Phytochemistry*, 20: 1061-1063.
- SUGIARTO M., YE A. & SINGH H. **2009**. Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. *Food Chemistry*, 114: 1007-1013.
- SUN Q., FAUSTMAN C., SENEAL A., WILKINSON A.L. & FURR H. **2001**. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage. *Meat Science*, 57: 55-60.
- SUREWICZ W.K. & MANTSCH H.H. **1988**. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochimica and Biophysica Acta*, 952: 115-130.
- SURH J., GU Y.S., DECKER E.A. & MCCLEMENTS D.J. **2005**. Influence of environmental stress on stability of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4236-4244.
- SUZUKI T., CLYDESDALE F.M. & PANDOLF T. **1992**. Solubility of iron in model systems containing organic acids and lignin. *Journal of Food Protection*, 55: 893-898.
- TAYLOR M.J. & RICHARDSON T. **1980**. Mechanism of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1473-1478.
- TEYSSÈDRE G. & LACABANNE C. **1996**. Caractérisation des polymères par analyse thermique. *Techniques de l'Ingénieur*, 3: 3770-3779.
- THIBAUT H., GALAN P. & HERGBERG S. **1992**. Relations entre statut en fer, immunité et résistance aux infections. *Cahier Nutrition Diététique*, 27: 153-160.
- THOMAS D. & FRANKENBERG E. **2002**. Health, nutrition and property: a microeconomic perspective. *Bulletin of the World Health Organization*, 8: 106-113.
- THUY P.V., BERGER J., DAVIDSSON L., KHAN N.C., LAM N.T., COOK J.D., HURRELL R.F. & KHOI H.H. **2003**. Regular consumption of NaFeEDTA-fortified fish sauce improves iron status and reduces the prevalence of anemia in anemic Vietnamese women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 284-290.
- TONG L.M., SASAKI S., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2000**. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 1473-1478.
- TOPALLAR H., BAYRAK Y. & MEHMET A.A. **1997**. Kinetic study on the autoxidation of sunflowerseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74: 1323-1327.

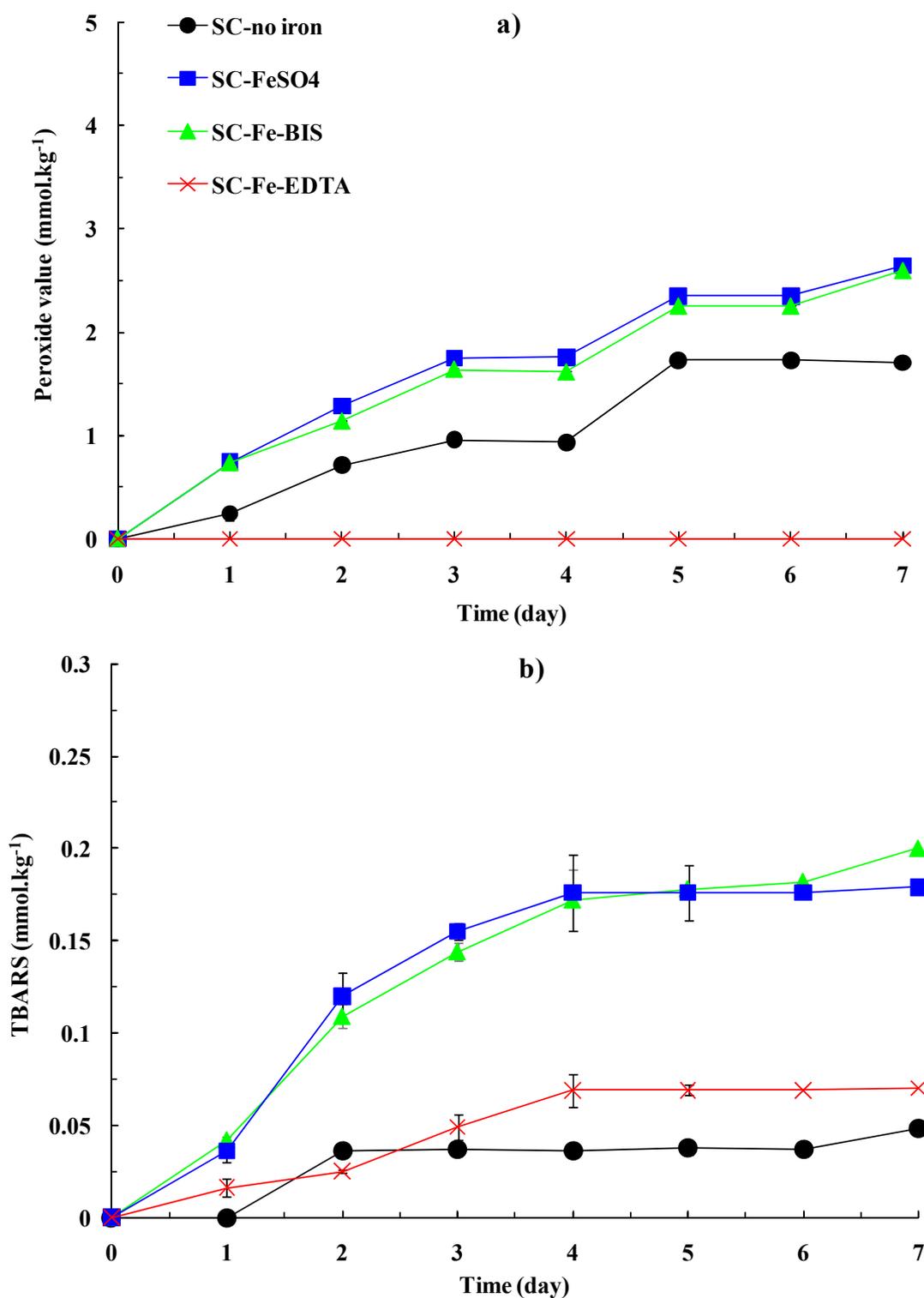
- TRUMBO P., YATES A.A., SCHLICKER S. & POOS M. **2001**. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association*, 101: 294-301.
- VILLIER A. & GENOT C. **2006**. Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. *Edition Médicales et Scientifiques France*, 4: 1-7.
- VILLIERE A. **2005**. *Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines*. Thèse, Université de Nantes Faculté des Sciences et des Techniques.
- VILLIERE A., VIAU M., BRONNEC I., MOREAU N. & GENOT C. **2005**. Oxidative stability of bovine serum albumin and sodium caseinate stabilized emulsions depends on metal availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1514-1520.
- VITERI F.E., ALVAREZ E., BATRES R., TORUN B., PINEDA O., MEJIA L.A. & SILUY J. **1995**. Fortification of sugar with Fe sodium ethylenediaminetetracetate (NaFeEDTA) improves Fe status in semirural Guatemalan populations. *American Journal Nutrition*, 61: 1153-1163.
- WALSTRA P. & ROOS A.L. **1993**. Proteins at air-water and oil-water interfaces: static and dynamic aspects. *Food Reviews International*, 9: 503-525.
- WALTER T., OLIVARES M., PIZARRO F. & MUNOZ C. **1997**. Iron, anemia, and infection. *Nutrition Reviews*, 55: 111-124.
- WAPNIR R.A. **1990**. Effect of food sources and processing on protein and mineral absorption. In: *Protein nutrition and mineral absorption*, pp. 61-76. CRC Press, New York.
- WARD B.R., GODDARD S.J., AUGUSTIN M.A. & MCKINNON I.R. **1997**. EDTA-induced dissociation of casein micelles and its effect on foaming properties of milk. *Journal of Dairy Research*, 64: 495-504.
- WHANG K. & PENG I.C. **1988**. Electron paramagnetic resonance studies of the effectiveness of myoglobin and its derivatives as photosensitizers in singlet oxygen generation. *Journal of Food Science*, 53: 1863-1893.
- WHEATLEY R.A. **2000**. Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in Analytical Chemistry*, 9: 617-628.
- WIRAKARTAKUSUMAH M. & HARIYADI P. **1998**. Technical aspects of food fortification. *Food and Nutrition Bulletin*, 132: 101-108.
- YIP R. **2000**. Significance of an abnormally low or high hemoglobin concentration during pregnancy: special consideration of iron nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72: 272-279.

- YOUNG J., CHO Y.-J., MCCLEMENTS D.J. & DECKER E.A. **2002**. Ability of surfactant micelles to alter the physical location and reactivity of iron in oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5704-5710.
- ZHENGXING C. & WILNA O.-T. **2002**. Food fortification to prevent and control iron deficiency. *African Journal of Food Science*, 2: 751-760.
- ZHIYONG C. & YUANZONG L. **2007**. What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: An Update. *American Chemical Society*, 107: 748-766.
- ZHU L. & MILLER D.D. **2007**. Tissue iron distribution and urinary mineral excretion vary depending on the form of iron (FeSO₄ or NaFeEDTA) and the route of administration (oral or subcutaneous) in rats given high doses of iron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8793-8799.

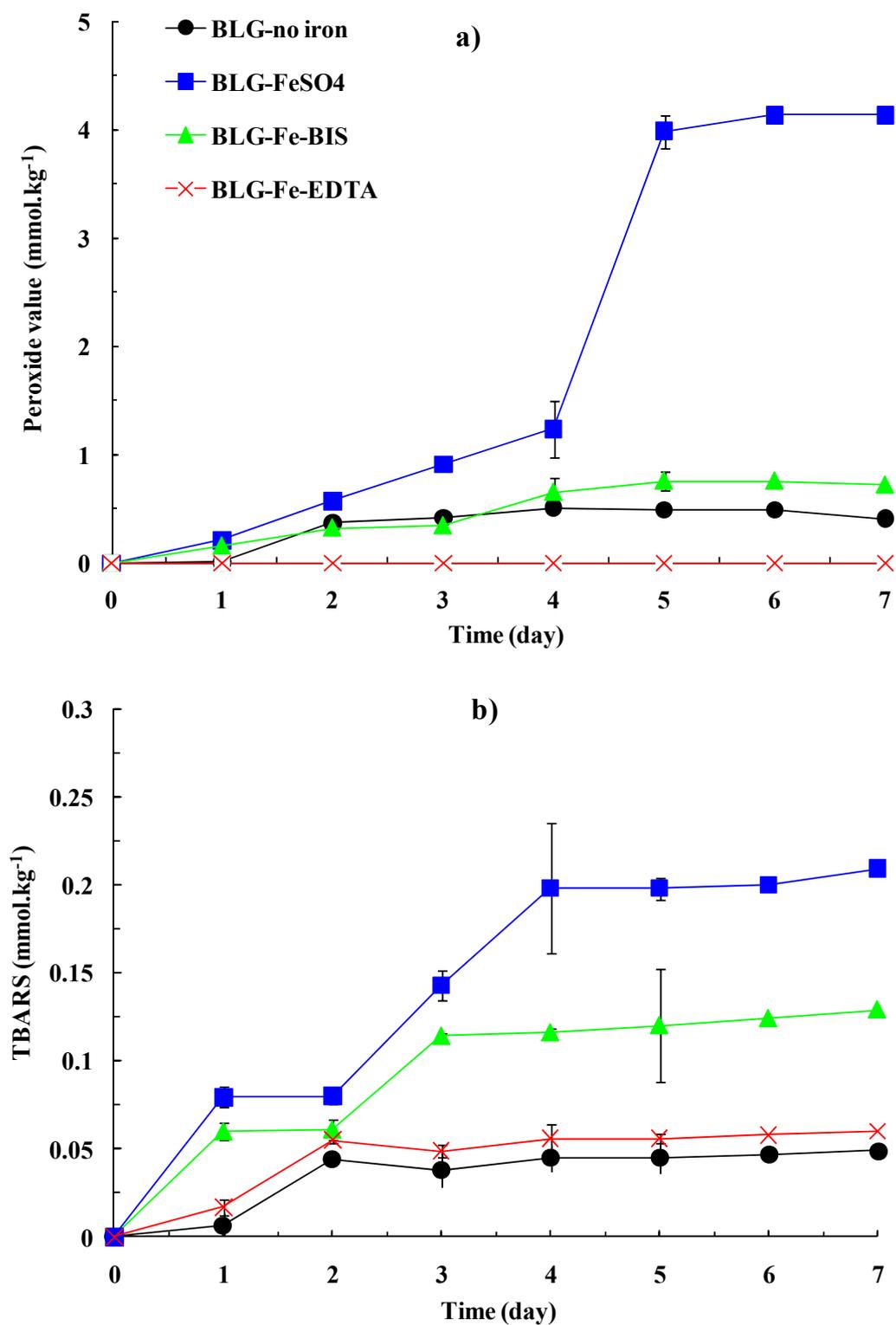
Annexes

Annexe 1 : Le diamètre moyen en surface $d_{3,2}$ (μm) des émulsions huile-dans-eau stabilisées par le caséinate de sodium (CN) ou par la β -lactoglobuline (BLG) en fonction de la nature et de la quantité de sels de fer, à deux pH et à une température de 20 °C

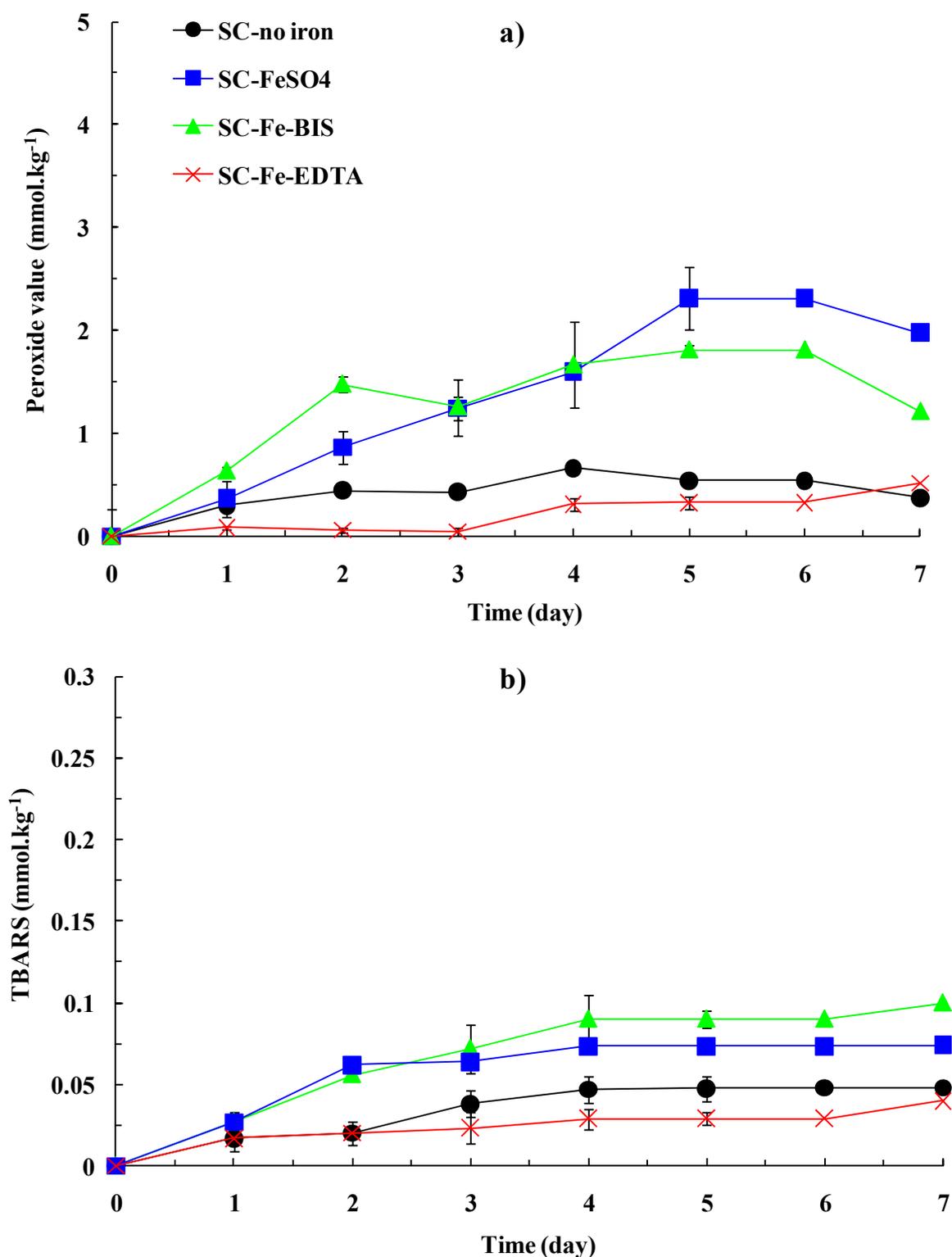
pH	Protein type	Without iron salts	NaFe-EDTA		Fe-BIS		FeSO ₄	
			0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM	0.36 mM	1.78 mM
6.5	SC	0,82 ± 0,07	0,80 ± 0,08	0,82 ± 0,01	0,78 ± 0,05	0,80 ± 0,08	0,76 ± 0,07	0,84 ± 0,09
	BLG	0,81 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,80 ± 0,09	0,80 ± 0,07	1,58 ± 0,22
3.5	SC	0,97 ± 0,07	1,36 ± 0,17	0,93 ± 0,09	1,33 ± 0,04	1,30 ± 0,12	1,21 ± 0,09	3,90 ± 0,36
	BLG	1,27 ± 0,18	1,17 ± 0,01	1,20 ± 0,04	1,30 ± 0,01	1,25 ± 0,01	1,30 ± 0,08	1,85 ± 0,22



Annexe 2 : Evolution of the oxidative state of sodium caseinate (SC) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 6.5: a) Peroxide value and b) TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size



Annexe 3 : Evolution of the oxidative state of β -lactoglobulin (BLG) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 6.5: a) Peroxide value and b) TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size



Annexe 4 : Evolution of the oxidative state of sodium caseinate (SC) stabilized O/W emulsion after addition of iron salts at 1.78 mM during 7 days at pH 3.5: a) Peroxide value and b) TBARS. Samples held at 30 °C. Some of the standard deviations are included in symbol size

Annexe 5 : Spectroscopie d'Absorption Atomique

Afin de caractériser le caséinate de sodium fourni par Armor Protéines (France), et d'évaluer les teneurs minérales (Fe, Ca, Na), la spectroscopie d'absorption atomique a été choisie, en raison de sa sensibilité, sa rapidité, sa simplicité et de sa sélectivité (Nielsen, 1994).

Principe

Dans son principe, la spectrométrie AAS consiste à **vaporiser l'échantillon** liquide dans une flamme ou un four. En mode flamme, l'équipement peut être utilisé en spectrométrie d'absorption (notre cas Fe et Ca) et d'émission (Na). La flamme est dirigée vers une lumière émise par une lampe appropriée émettant les longueurs d'onde caractéristiques de l'élément recherché. En traversant la flamme, les ondes lumineuses - dont les longueurs d'onde correspondent à l'élément dosé - sont absorbées par les ions excités présents dans la flamme. L'absorption est mesurée à l'aide d'un prisme dispersif et d'une cellule photoélectrique : elle est directement proportionnelle à la concentration de l'élément. Lorsque les atomes d'un élément ont été excités, leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission de lumière d'une fréquence F bien définie et propre à cet élément. Le même élément dispersé dans une flamme possède la propriété d'absorber tout rayonnement de même fréquence F . Il en résulte une absorption du rayonnement incident lié à la concentration de l'élément considéré. L'absorption est directement proportionnelle à la concentration de l'élément selon la loi de Beer-Lambert.

Mode opératoire

Tout d'abord, l'échantillon est réduit en cendres dans un four par la minéralisation totale de l'échantillon (650 °C). Ces cendres sont ensuite dissoutes dans des diluants respectifs pour le dosage de chaque élément : pour le Ca (Oxyde de lanthane 3,25 g dissout dans 800 mL eau ultrapure, Millipore 15 M Ω et 10 mL acide HCl concentré ($\approx 37\%$) puis ajusté jusqu'à 1000 mL q. s. p. avec de l'eau), pour le Fe (1 g du métal dissout dans 20 mL HCl (1 : 1) puis ajusté jusqu'à 1000 mL q. s. p. avec de l'eau) et pour le Na (3,8021 g de NaCl sont dissout dans 10 mL HCl concentré ($\approx 37\%$) puis ajusté jusqu'à 1000 mL q. s. p. avec de l'eau). Les dosages par absorption ou par émission atomique ont été effectués sur le spectromètre : VARIAN Spectr AA.100 à des longueurs d'onde de 422,7 nm, 248 nm, et de 589 nm, respectivement pour le Ca, le Fe et le Na.

Traitement des données et mode d'expression des résultats

Puis pour la détermination des concentrations, la droite d'étalonnage à l'aide d'une gamme d'échantillons de concentrations connues : $A = f(C)$.