



**HAL**  
open science

# Étude des interactions polysaccharides – biomolécules antimicrobiennes de nature protéique : application à l’élaboration de microcapsules et de films actifs pour la conservation des aliments

Chedia Ben Amara

## ► To cite this version:

Chedia Ben Amara. Étude des interactions polysaccharides – biomolécules antimicrobiennes de nature protéique : application à l’élaboration de microcapsules et de films actifs pour la conservation des aliments. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1247 . tel-01736221

**HAL Id: tel-01736221**

**<https://theses.hal.science/tel-01736221>**

Submitted on 16 Mar 2018

**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.



N°d'ordre NNT :

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205**

**(Interdisciplinaire Sciences-Santé)**

**Spécialité de doctorat : Biochimie**

**Discipline : Sciences des aliments**

Soutenue publiquement le 22 novembre 2017, par :

**Chedia BEN AMARA**

---

**Etude des interactions polysaccharides – biomolécules antimicrobiennes de nature protéique : application à l'élaboration de microcapsules et de films actifs pour la conservation des aliments**

---

Devant le jury composé de :

Mme Picard Céline  
Mme Dulong Virginie  
M. Bouhallab Saïd  
Mme Agnely Florence  
M. Degraeve Pascal  
M. Gharsallaoui Adem

Maître de Conférences (Univ. du Havre)  
Ingénieure de Recherche (Univ. de Rouen)  
Directeur de Recherche (INRA, Rennes)  
Professeure des Universités (Univ. Paris-Sud)  
Professeur des Universités (Univ. Lyon 1)  
Maître de Conférences (Univ. Lyon 1)

Rapporteure  
Rapporteure  
Examineur  
Examinatrice  
Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

*L'expérience est une observation provoquée dans le but de faire naître une idée.*

**Claude Bernard**

## Liste des travaux relatifs à la thèse

### Publications dans des revues à comité de lecture

- (1) **Ben Amara, C.**, Eghbal, N., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2016). Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films. *Food Research International*, 89, 272-280.
- (2) **Ben Amara, C.**, Eghbal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2016). Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 183, 50-57.
- (3) **Ben Amara, C.**, Degraeve, P., Oulahal, N., & Gharsallaoui, A. (2017). pH-dependent complexation of lysozyme with low methoxyl (LM) pectin. *Food Chemistry*, 236, 127-133.
- (4) **Ben Amara, C.**, Kim, L., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2017). Effect of pH on nisin/pectin and nisin/alginate complex coacervation: Formation and properties of complexes in solution. Soumis dans *Carbohydrate Polymers*.
- (5) **Ben Amara, C.**, Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2017). Effect of pH on nisin/pectin and nisin/alginate complex coacervation: Formation and properties of antimicrobial films. Soumis dans *LWT-Food Science and Technology*.
- (6) **Ben Amara, C.**, Kim, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2017). Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying. *Food Chemistry*, 236, 32-40.
- (7) Rawdkuen, S., Suthiluk, P., Tongdeesontorn, W., Sai-Ut, S., Kaewprachu, P., **Ben Amara, C.**, Bouarab-Chibane, L., Lagorce-Tachon, A., Gharsallaoui, A., Joly, C., Oulahal, N., Karbowiak, T., Debeaufort, F., Degraeve, P. (2017). Enrobages comestibles et emballages actifs pour la conservation d'aliments périssables : présentation et premiers résultats du projet de coopération Franco-Thaïlandaise ActiFoodCoat. *Industries Alimentaires et Agricoles*, Mai-Juin, 17-20.

### Communications orales à des congrès internationaux

- (1) **Ben Amara, C.**, Degraeve, P., Oulahal, N., & Gharsallaoui, A. Elaboration of antimicrobial particles based on protein/polysaccharide insoluble complexes. **The 3<sup>rd</sup> International Meeting on Material/Bioproduct Interactions**, Saragosse, Juin 2015.

(2) **Ben Amara, C.**, Degraeve, P., Oulahal, N., & Gharsallaoui, A. Using complex coacervation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying. **The 9<sup>th</sup> International Conference on Water in Food**, Louvain, Mai 2016.

**Communication affichée**

**Ben Amara, C.**, Degraeve, P., Oulahal, N., & Gharsallaoui, A. pH-dependent complexation of lysozyme with low methoxyl (LM) pectin for development of antimicrobial films. **The 9<sup>th</sup> International Conference on Water in Food**, Louvain, Mai 2016.

## Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire BIODYMIA (BIOingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires, Équipe Mixte d'Accueil 3733, Université Lyon 1 – ISARA Lyon) et a été financé par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

J'exprime ma gratitude à Pascal Degraeve, Directeur du Laboratoire BIODYMIA et Professeur à l'Université Lyon 1, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis d'y effectuer cette thèse. Je lui exprime également mes remerciements puisqu'il m'a permis, en tant que mon directeur de thèse, de mener à bien ce travail de recherche. Je lui suis reconnaissante pour son ouverture d'esprit, son soutien, nos discussions scientifiques toujours fructueuses ainsi que les opportunités de collaboration qu'il m'a offertes.

J'exprime mes profonds remerciements à mon co-directeur de thèse, Adem Gharsallaoui, Maître de Conférences à l'Université Lyon 1, pour son encadrement, pour le soutien et la confiance qu'il m'a témoignés durant ces trois dernières années et quelques mois, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour ses conseils expérimentaux et rédactionnels qui m'ont été d'une grande importance afin de bien structurer ce travail, pour sa patience et son encouragement à finir ce travail dans les délais.

Je suis très reconnaissante à Céline Picard, Maître de Conférences à l'Université du Havre, et Virginie Dulong, Ingénieure de Recherche à l'Université de Rouen, pour avoir accepté d'être rapporteuses de ce travail. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mes salutations respectueuses.

Ma gratitude s'adresse aussi à Saïd Bouhallab, Directeur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Rennes, et Florence Agnely, Professeure à l'Université Paris-Sud, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'examiner ce travail. Je tiens également à remercier Hamid Elaissari, Directeur de Recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS), et Stéphanie Briançon, Professeure à l'Université Lyon 1, pour avoir accepté de faire partie du comité de suivi de cette thèse me permettant d'avoir du recul sur mon travail et de faire émerger de nouvelles idées.

Un grand merci aux stagiaires qui m'ont accompagné durant cette thèse et qui ont fait avancer ce projet: Sondes Souihi, Lanhe Kim, Jorge Macridachis Gonzalez et Faydi Maoulida. Je leur suis reconnaissante pour le travail expérimental qu'ils ont réalisé et pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail de recherche.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe BIODYMIA avec lesquels j'ai pu collaborer au cours des trois dernières années. J'ai trouvé au milieu d'eux une ambiance amicale dont je garderai un excellent souvenir. Une pensée particulière à Nadia Oulahal pour sa disponibilité, ses précieux conseils et sa rigueur scientifique, Emilie Dumas, Isabelle Adt, Coralie Dupas et Catherine Joly pour leur soutien et leurs encouragements, Amandine Cottaz Sandrine Gouin, Zolalaina Rakotoarisoa et Keziban Ozturk pour leur soutien technique, leur disponibilité et leur bonne humeur, Roselyne Roux pour m'avoir formée au bon respect des règles d'hygiène et sécurité et Isabelle Gauthey pour les côtés administratifs.

Merci à tout le personnel enseignant de l'IUT Génie biologique de Bourg-en-Bresse pour m'avoir permis d'avoir une expérience enrichissante en enseignement. Merci en particulier à Philippe Dantigny de m'avoir initié à l'utilisation des systèmes pilotes en technologies fermentaires, pour sa disponibilité au quotidien ainsi que sa bonne humeur.

Une pensée particulière pour les occupants de la salle des stagiaires qui se sont succédés durant ma thèse et qui ont su maintenir une bonne humeur quotidienne. Je ne citerai pas de noms ici, afin de ne pas en oublier certains. Je tiens à souhaiter bon courage aux prochains sur la liste des docteurs : Elodie Chevalier, Lynda Bouarab et Jian Wang. Merci pour votre bonne humeur et votre amitié.

Merci aux rencontres nationales et internationales que j'ai pu faire durant ces trois dernières années : Fadi Khalil, Nga Trinh Thanh, Saroat Rawdkuen, Wirongrong Tongdeesoontorn, Phunsiri Suthiluk, Pimonpan Kaewprachu, Flavie Lepoutre,...

Je dédie ce travail à ma famille sans qui je n'aurais pas pu l'effectuer dans de si bonnes conditions. J'adresse mes plus profonds sentiments à mes grands parents, mes parents, mes frères et mon mari pour leur soutien, leurs encouragements durant ces années de travail et leur investissement pour la réussite de mon projet professionnel.



# SOMMAIRE

<b>Introduction générale et objectifs .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I. Les acquis scientifiques .....</b>	<b>4</b>
I.1. Interactions polysaccharides – biomolécules de nature protéique .....	5
I.1.1. Introduction .....	5
I.1.2. Les principales molécules utilisées .....	7
I.1.2.1. Le lysozyme .....	7
I.1.2.2. La nisine .....	10
I.1.2.3. La pectine .....	13
I.1.2.4. L'alginate .....	15
I.1.3. Comportement des mélanges de biopolymères protéines/polysaccharides .....	17
I.1.3.1. La co-solubilité .....	18
I.1.3.2. La séparation de phase ségrégative .....	18
I.1.3.3. La coacervation complexe ou séparation de phase associative .....	19
I.1.4. Les différents types d'interactions protéines/polysaccharides .....	21
I.1.4.1. Les liaisons covalentes .....	21
I.1.4.2. Les interactions électrostatiques .....	22
I.1.4.3. Les liaisons hydrogènes .....	23
I.1.4.4. Les interactions hydrophobes .....	24
I.1.4.5. Les liaisons de van der Waals .....	24
I.1.4.6. Le phénomène d'exclusion stérique .....	25
I.1.5. Les paramètres influençant la formation des complexes et les interactions mises en jeu .....	25
I.1.5.1. La densité de charges .....	26
I.1.5.2. Nature du biopolymère (poids moléculaire, conformation et flexibilité) .....	27
I.1.5.3. Le pH du milieu .....	28
I.1.5.4. La force ionique .....	31
I.1.5.5. Le ratio protéine/polysaccharide .....	33
I.1.5.6. La concentration .....	34
I.1.5.7. La température .....	34
I.1.5.8. La pression .....	35
I.1.5.9. Le temps .....	36
I.1.6. Les techniques de caractérisation des interactions protéines/polysaccharides .....	36
I.1.6.1. Les techniques microscopiques .....	36
I.1.6.2. Les techniques basées sur le principe de la diffusion .....	37
I.1.6.3. Les techniques spectroscopiques .....	39

I.1.6.4. Les techniques calorimétriques .....	41
I.1.6.5. La microbalance à cristal de quartz.....	42
I.1.6.6. La résonance plasmonique de surface.....	42
I.1.6.7. La résonance magnétique nucléaire .....	43
I.1.6.8. La rhéologie .....	43
I.1.7. Les applications potentielles des complexes protéines/polysaccharides .....	43
I.1.7.1. Purification des protéines par précipitation sélective ou coacervation avec des polysaccharides .....	44
I.1.7.2. Amélioration de la stabilité des peptides/protéines dans des complexes à base de polysaccharides.....	45
I.1.7.3. Encapsulation et libération de composés actifs.....	45
I.1.7.4. Stabilisation des émulsions .....	48
I.1.7.5. Propriétés visqueuses et gélifiantes .....	50
I.1.7.6. Les hydrogels .....	50
I.1.7.7. Utilisation en tant qu'additifs alimentaires .....	52
I.1.7.8. Elaboration de matériaux : films.....	52
I.1.8. Conclusion .....	53
I.2. Positionnement et objectifs du sujet de recherche .....	54
<b>Chapitre II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>57</b>
II.1. Matériel.....	58
II.1.1. Le lysozyme.....	58
II.1.2. La nisine .....	58
II.1.3. Parois lyophilisées des bactéries <i>Micrococcus lysodeikticus</i> .....	58
II.1.4. La pectine .....	58
II.1.5. L'alginate de sodium .....	59
II.1.6. L'alginate lyase.....	59
II.1.7. Les maltodextrines.....	59
II.1.8. Le bleu de Nil .....	59
II.1.9. Le 1-anilino-8-naphtalène sulfonate (ANS) .....	59
II.1.10. Les milieux de culture pour les essais microbiologiques .....	60
II.1.11. Les autres produits utilisés .....	60
II.2. Méthodes .....	60
II.2.1. Préparation des solutions mères .....	60
II.2.2. Préparation des solutions de complexes .....	60
II.2.2.1. Les complexes lysozyme/pectine et lysozyme/alginate .....	60

II.2.2.2. Les complexes nisine/pectine et nisine/alginate .....	60
II.2.3. Préparation des poudres séchées par atomisation .....	61
II.2.4. Resuspension des poudres séchées .....	61
II.2.5. Mesure de la turbidité .....	61
II.2.6. Mesure du potentiel zêta ( $\zeta$ ).....	62
II.2.7. Mesure de la distribution granulométrique des complexes .....	63
II.2.8. Mesure de l'absorbance dans l'UV-Visible.....	65
II.2.9. Mesure de la fluorescence .....	65
II.2.9.1. Mesure de la fluorescence intrinsèque.....	65
II.2.9.2. Mesure de la fluorescence extrinsèque (hydrophobicité de surface).....	65
II.2.10. Mesure de l'activité enzymatique du lysozyme.....	66
II.2.11. Préparation des films antimicrobiens par voie solvant.....	67
II.2.11.1. Préparation des films antimicrobiens lysozyme/alginate .....	67
II.2.11.2. Préparation des films antimicrobiens nisine/alginate ou nisine/pectine .....	67
II.2.12. Microscopie électronique à balayage.....	67
II.2.13. Microscopie en fluorescence .....	68
II.2.14. Evaluation de l'activité antimicrobienne des poudres et des films .....	68
<b>Chapitre III. Résultats et discussions .....</b>	<b>70</b>
III.1. Effet du pH sur les interactions entre le lysozyme et la pectine.....	71
III.2. Séchage par atomisation des complexes lysozyme/pectine .....	80
III.3. Films antimicrobiens à base de complexes lysozyme/alginate .....	90
III.4. Effet du pH sur la complexation de la nisine par des polysaccharides .....	101
III.5. Films antimicrobiens contenant la nisine complexée.....	134
III.6. Encapsulation de la nisine par complexation/séchage .....	159
<b>Discussion générale.....</b>	<b>170</b>
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>177</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>181</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>192</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>197</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>198</b>

## **Introduction générale et objectifs**

La microencapsulation est un sujet complexe et riche en implications scientifiques et industrielles dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique. L'intérêt d'une opération d'encapsulation est de former une barrière entre la molécule d'intérêt (nutraceutique, arôme, antioxydant, conservateur,...) et son environnement (oxygène, lumière, humidité, température, variation du pH, microorganismes,...) mais aussi de permettre une libération contrôlée au moment souhaité afin d'optimiser l'efficacité du composé d'intérêt. La réussite d'une opération de microencapsulation repose sur le choix du biopolymère qui servira comme matrice, de l'agent à encapsuler, mais aussi des conditions de production et de traitement de ces particules (pH, température,...). Des composés de nature hydrophile (exemple : hydrocolloïdes), amphiphile (exemple : protéines) ou hydrophobe (exemple : lipides) peuvent être utilisés afin de former la matrice. Pour les applications agro-alimentaires, les matrices sont principalement constituées de protéines (gélatine, protéines laitières,...), de sucres et polysaccharides (maltodextrines, saccharose, amidon, alginate, pectine,...) et de gommes (gomme arabique, gomme de caroube,...). Parmi les méthodes d'encapsulation les plus répandues, on cite la gélification, le séchage par atomisation et la coacervation. Avant de procéder à l'étape de microencapsulation, il est important de prendre en considération un ensemble de variables nécessaires à la formulation comme la nature, la quantité, la proportion des biopolymères, les conditions physico-chimiques ainsi que la nature des interactions qui sont susceptibles d'avoir lieu entre eux. Afin d'obtenir des systèmes encapsulés avec les propriétés désirées, une maîtrise des étapes de production de ces microparticules est nécessaire. Il est également important d'étudier leurs propriétés de reconstitution et leur fonction (préservation et libération de l'agent d'intérêt).

L'objectif de cette thèse est de développer des systèmes d'encapsulation à base de polysaccharides qui permettent une protection et une libération contrôlée de molécules antimicrobiennes telles que le lysozyme de blanc d'œuf ou la nisine produite par certaines souches de la bactérie *Lactococcus lactis*. Ces deux composés sont des additifs alimentaires : lysozyme (E1105) et nisine (E234). Ils font partie de la liste positive des conservateurs employés dans certains aliments notamment des produits laitiers. La complexation du lysozyme ou de la nisine, chargés positivement sur une large gamme de pH, avec des polysaccharides anioniques (pectine ou alginate) serait une solution à considérer pour protéger ces molécules antimicrobiennes et contrôler leur libération. Le lysozyme ou la nisine sont considérés comme

un modèle de protéines ou de peptides à activité antimicrobienne possédant un large spectre d'action contre les bactéries à Gram positif et caractérisés par une charge nette positive aux pHs usuels. Les biopolymères qui ont été utilisés pour l'encapsulation ont été choisis en fonction de leurs propriétés physico-chimiques mais aussi en fonction de leur sensibilité aux enzymes produites par les bactéries cibles. Ceci devrait permettre de former des systèmes « intelligents » dont le relargage est stimulé par la présence de la bactérie cible. Le lysozyme, une protéine, et la nisine, un peptide, étant tous deux des polymères d'acides aminés, le terme biopolymère fera ensuite aussi bien référence à ces composés (les substances à encapsuler) qu'aux polysaccharides (pectine ou alginate) qui constitueront leurs matrices d'encapsulation. Un point sur les interactions entre protéines et polysaccharides sur lesquelles s'appuie notre stratégie de microencapsulation est proposé au niveau de la synthèse bibliographique.

La démarche envisagée lors de cette thèse s'appuie sur le fait que l'efficacité antimicrobienne des microcapsules préparées dépend à la fois des propriétés intrinsèques du biopolymère (taille, charge, hydrophobie, flexibilité,...), des conditions environnementales (pH, force ionique, température, cisaillement lors du procédé d'élaboration des microcapsules,...) et des propriétés physico-chimiques de la surface des bactéries cibles. On peut ainsi, en jouant sur ces paramètres, contrôler l'intensité des différents types d'interactions, et développer des systèmes d'encapsulation ayant les propriétés désirées. De plus, l'étude des interactions lors de la formation de ces systèmes doit aussi permettre de préserver les sites responsables des propriétés antimicrobiennes de la molécule d'intérêt ainsi que les sites responsables des interactions avec les microorganismes cibles.

Le comportement des mélanges de biopolymères peut être caractérisé en solution afin d'optimiser la concentration d'un biopolymère nécessaire pour produire une solution avec une microstructure et des propriétés physico-chimiques particulières. Lorsque les interactions entre les deux biopolymères sont plutôt associatives (interactions attractives), ces biopolymères peuvent former des complexes solubles ou des complexes insolubles qui peuvent précipiter. Dans le domaine alimentaire, ceci est généralement le cas pour les biopolymères portant des groupements ionisables et utilisés à des concentrations suffisamment élevées pour induire la complexation. Pour « la mise en forme » de ces complexes afin d'améliorer leurs propriétés d'usage, les suspensions des complexes peuvent être atomisées (en présence d'une matrice de séchage neutre) pour former des microparticules ou même utilisées pour former des films. Le travail présenté dans le cadre de cette thèse est relativement large de manière à pouvoir relier

les propriétés physico-chimiques des complexes formés aux caractéristiques des systèmes d'encapsulation.

Le **premier** chapitre de ce manuscrit présente les biopolymères étudiés, les informations de base nécessaires pour la compréhension de la nature des interactions moléculaires impliquées dans la formation des complexes protéines/polysaccharides ou peptides/polysaccharides, les facteurs intrinsèques ou extrinsèques qui peuvent influencer ces interactions et stabiliser et/ou déstabiliser ces complexes, les principales techniques d'analyse qui permettent l'étude de ces complexes et les interactions mises en jeu ainsi que les principales applications liées à l'utilisation de ces systèmes. Le **deuxième** chapitre intitulé « Matériel et méthodes » énumère les différentes techniques et méthodes expérimentales utilisées dans le cadre de ce travail. Les résultats sont présentés dans un **troisième** chapitre principalement sous forme d'articles dans des revues (publiés ou soumis) et qui sont organisés comme suit : **(i)** étude de l'effet du pH sur les interactions moléculaires entre le lysozyme et une pectine faiblement méthylée ; **(ii)** effet du séchage par atomisation sur les propriétés du lysozyme complexé par la pectine à pH 7 ; **(iii)** caractérisation et étude des propriétés du lysozyme suite à sa complexation par l'alginate, un polysaccharide anionique non estérifié, à pH 7 ; **(iv)** effet du pH sur les interactions moléculaires entre la nisine et la pectine ou l'alginate et sur les caractéristiques des complexes formés en solution ; **(v)** étude de l'influence du pH sur les propriétés des complexes nisine/pectine ou nisine/alginate formés et utilisés pour produire des films antimicrobiens ; et enfin **(vi)** évaluation de l'impact du procédé de séchage par atomisation sur les complexes formés entre la nisine et l'alginate ou la pectine à pH 5 et caractérisation des propriétés de ces complexes avant et après séchage. Ensuite, une partie sera consacrée à une **discussion générale**, et enfin, une dernière section donne les **conclusions** et les **perspectives** de ce travail.

Au-delà de ces aspects qui constituent le cœur de mes travaux de thèse, j'ai notamment participé au Programme Hubert Curien (PHC) Franco-Thaïlandais Siam ActiFoodCoat (Active edible coatings for perishable food preservation) portant sur la thématique de l'encapsulation de biomolécules antimicrobiennes et/ou antioxydantes et sur l'exploitation de leurs propriétés pour obtenir des films comestibles actifs pour la conservation d'aliments périssables. L'article publié correspondant est présenté en annexe de ce manuscrit.

## **Chapitre I. Les acquis scientifiques**

## **I.1. Interactions polysaccharides – biomolécules de nature protéique**

### **I.1.1. Introduction**

De nos jours, il y a un intérêt croissant dans les domaines de la nutrition et de la sécurité alimentaire pour le développement de nouvelles formes d'ingrédients alimentaires innovants qui peuvent remplacer certains additifs de synthèse couramment utilisés et pouvant être potentiellement dangereux pour la santé du consommateur. Ainsi de nombreux travaux visent à explorer le potentiel d'application de biomolécules antimicrobiennes pour réduire les quantités de conservateurs tels que les nitrites ou les sulfites. Cependant, la plupart des biomolécules antimicrobiennes ont une efficacité moindre et/ou représentent un coût nettement plus élevé. Dans ce contexte, outre la recherche de nouvelles biomolécules antimicrobiennes plus efficaces, un enjeu important consiste à en améliorer l'efficacité et la praticité d'usage (stabilité avant emploi). Une voie particulièrement intéressante déjà largement exploitée par les producteurs d'arômes alimentaires consiste à les encapsuler. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi une protéine (le lysozyme de blanc d'œuf) et un peptide (la nisine) du fait qu'il s'agit de conservateurs naturels déjà autorisés pour de nombreuses applications en agro-alimentaire. Il s'agit aussi de deux polymères d'acides aminés présentant un caractère cationique dans la gamme de pH de la plupart des aliments périssables dans lesquels ils sont employés (de pH 7 à pH 4 environ). Notre choix s'est porté sur des polysaccharides comme matrice d'encapsulation. S'agissant de composés cationiques, nous avons privilégié des polysaccharides anioniques de façon à favoriser la formation de complexes par interactions électrostatiques.

Les protéines et les polysaccharides sont couramment employés comme matrices d'encapsulation pour des applications alimentaires. En effet, ce sont des molécules qui sont naturellement présentes dans de nombreux produits alimentaires (lait, œuf, viande,...) et nombre d'entre elles sont considérées comme 'GRAS' (Generally Recognized As Safe). Il convient cependant, du fait du caractère allergène de nombreuses protéines et de certains polysaccharides, de bien les faire figurer dans la liste des ingrédients des aliments dans lesquels ils sont incorporés si ils sont répertoriés comme tels.

Les protéines sont des molécules composées d'acides aminés liés par des liaisons covalentes à travers des liaisons peptidiques pour former des chaînes. On distingue jusqu'à 4 niveaux de structure des protéines : la structure primaire ou séquence qui correspond à l'ordre d'enchaînement des acides aminés ; la structure secondaire qui décrit l'arrangement des acides



aminés ; la structure tertiaire qui désigne le repliement de la chaîne protéique dans l'espace ; et la structure quaternaire qui concerne l'association de sous-unités polypeptidiques.

Les protéines alimentaires peuvent être obtenues sous une forme purifiée (albumine de sérum bovin,  $\beta$ -lactoglobuline, caséine, lysozyme, gélatine,...), certaines peuvent être présentes sous une forme combinée ou semi-purifiée (protéines de pois, protéines de lactosérum,...), d'autres peuvent se présenter à l'état brut (isolats de protéines de lactosérum,...). Les polysaccharides sont formés de longues chaînes de monosaccharides liées par des liaisons glucosidiques et qui, après hydrolyse, forment des monosaccharides et des oligosaccharides. Plusieurs polysaccharides existent et peuvent différer selon la source (végétale, animale, microbienne et algale), la masse moléculaire, la composition chimique, la chaîne et la rigidité. Selon leur structure, ils peuvent avoir différentes propriétés physiques et chimiques en fonction des unités monosaccharidiques les formant. Les polysaccharides peuvent avoir une structure linéaire ou branchée.

Une protéine et un polysaccharide peuvent être utilisés seuls mais une approche intéressante consiste à former des complexes entre les deux types de polymères. Il est donc important de comprendre les propriétés, la structure, les interactions mises en jeu et le comportement de phase de ces systèmes. D'une part, ceci facilitera la compréhension de plusieurs processus biologiques dans notre organisme et d'autre part permettra l'emploi de ces systèmes dans des applications diverses dans le domaine agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique ou encore dans le domaine de l'environnement. L'un des rôles que peuvent jouer ces systèmes est d'encapsuler, protéger ou contrôler la libération de molécules actives (arômes, composés antimicrobiens et/ou antioxydants, composés thérapeutiques, vitamines,...). Ils peuvent également être utilisés pour fabriquer des aliments avec des propriétés (physico-chimiques, texture,...) améliorées.

Dans ce contexte, plusieurs revues ont été publiées sur les mécanismes impliqués dans la formation des complexes protéines/polysaccharides, le comportement des mélanges à base de ces complexes ou encore les applications qui en découlent (Schmitt *et al.*, 1998 ; Turgeon *et al.*, 2003 ; Turgeon *et al.*, 2007 ; Schmitt & Turgeon, 2011 ; Li & Huang, 2015).

Cette étude bibliographique sera focalisée sur les molécules étudiées dans cette thèse, les différents comportements des mélanges protéines/polysaccharides, les interactions mises en jeu, les techniques d'analyse et les applications potentielles de ces mélanges. L'étude des interactions entre les polysaccharides (alginates, pectines) et la protéine (lysozyme) ou le

peptide (nisine) utilisés dans le cadre de ce travail permettrait de mieux comprendre le comportement de ces agents antimicrobiens lors de la complexation et d'optimiser les paramètres opératoires utilisés durant le procédé d'encapsulation par séchage par atomisation ou lors de la formation de films comestibles d'emballage actif.

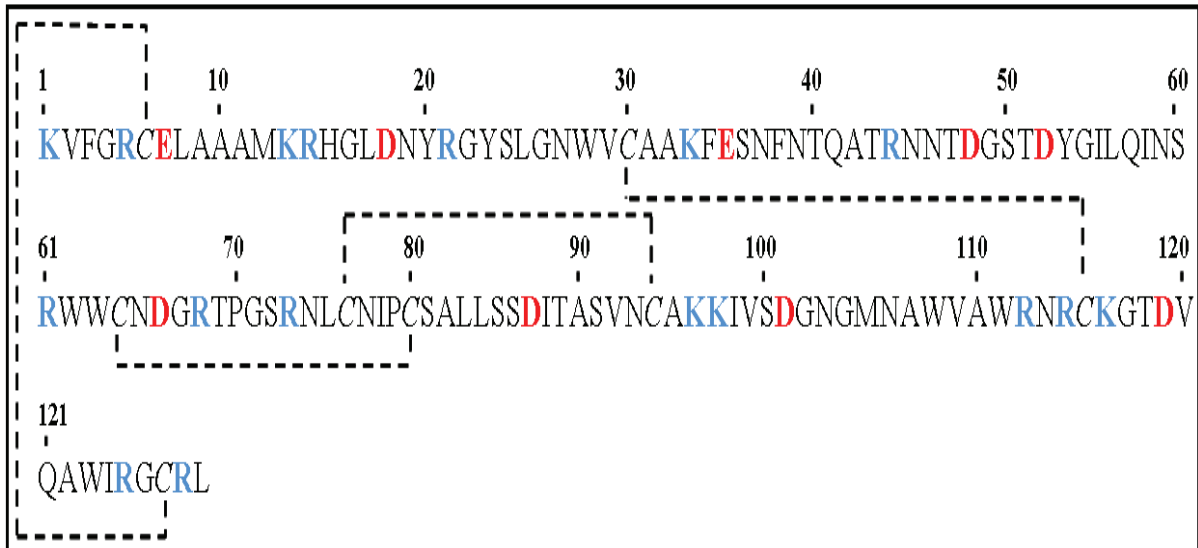
## **I.1.2. Les principales molécules utilisées**

### **I.1.2.1. Le lysozyme**

Le lysozyme est une protéine globulaire découverte par Alexander Fleming en 1922. Elle est présente dans plusieurs sécrétions du corps humain (larmes, salive, lait maternel, mucus, sécrétions nasales, urine, sérum,...), dans certains tissus ou organes comme le cartilage, les reins, la rate et le tractus digestif, dans le blanc d'œuf de nombreuses espèces animales mais aussi chez les végétaux. La structure, l'expression, le mode d'action, l'activité antibactérienne et les propriétés physico-chimiques du lysozyme diffèrent selon son origine.

Le blanc d'œuf de poule représente une matière première disponible en grande quantité et très riche en protéines et particulièrement en lysozyme. Etant donné son abondance, sa facilité d'extraction, son faible poids moléculaire, sa structure cristallisée, sa solubilité et sa stabilité, le lysozyme extrait du blanc d'œuf de poule (HEWL pour « hen egg white lysozyme ») est devenu un modèle largement utilisé par les scientifiques et qui a été considérablement étudié dans divers domaines comme la biochimie ou encore la biologie cellulaire ou moléculaire.

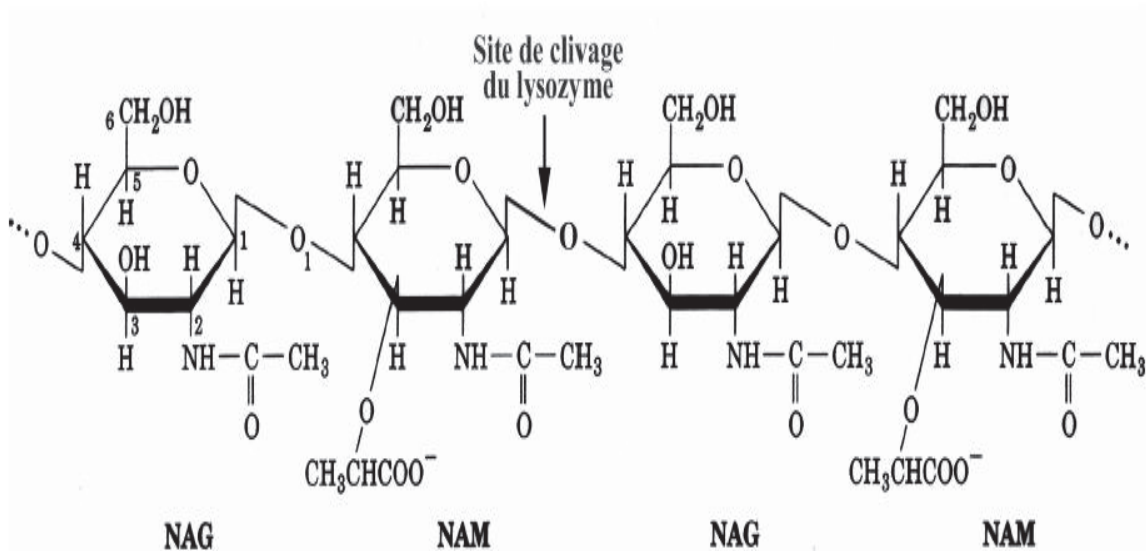
En plus d'être la première enzyme séquencée comportant les 20 acides aminés classiques, le lysozyme est la première enzyme dont la structure tridimensionnelle a été élucidée. Il s'agit d'une protéine globulaire ayant un faible poids moléculaire (14300 Da) et comportant 129 acides aminés dont 20 % sont ionisables. Son rayon hydrodynamique est de 19 Å. Parmi les acides aminés formant le lysozyme, 9 acides aminés sont acides et 16 sont basiques (**Figure I.1**) ([Nigen, 2008](#)). Cette protéine est composée d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile et possède un goût sucré. Elle est dotée d'une excellente valeur nutritionnelle puisqu'elle présente une source d'acides aminés essentiels comme les résidus soufrés (cystéine et méthionine) et les résidus aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine). La fluorescence intrinsèque du lysozyme lorsqu'il est excité à 280 nm serait essentiellement due à la présence des résidus Tryptophane ([Imoto \*et al.\*, 1972](#)). Le lysozyme est une protéine basique puisqu'elle est caractérisée par un point isoélectrique élevé ( $pI \sim 11,0$ ). Il est donc caractérisé par une charge positive sur une large gamme de pH.



**Figure I.1.** Structure primaire du lysozyme. Les acides aminés colorés en rouge sont acides, les acides aminés colorés en bleu sont basiques. Les traits pointillés représentent les ponts disulfures (d'après Nigen, 2008).

La structure secondaire du lysozyme est composée de deux domaines  $\alpha$  et  $\beta$  qui sont séparés par un sillon. Le domaine  $\alpha$  est composé majoritairement d'hélices  $\alpha$  alors que le domaine  $\beta$  est constitué d'une hélice et d'un feuillet  $\beta$ , lui-même, comportant trois feuillets antiparallèles. Une grande partie de la structure secondaire du lysozyme (39 % soit 51 acides aminés) est composée d'hélices  $\alpha$  tandis qu'une petite partie (11 % soit 14 acides aminés) est formée de feuillets  $\beta$  (Diamond, 1974). Le lysozyme est constitué de 8 résidus cystéines qui forment 4 ponts disulfures intramoléculaires qui stabilisent sa structure tertiaire (Figure I.1). Les résidus Cys<sub>6</sub>-Cys<sub>127</sub> et Cys<sub>30</sub>-Cys<sub>115</sub> sont situés au niveau du domaine  $\alpha$ , alors que les résidus Cys<sub>64</sub>-Cys<sub>80</sub> se trouvent au niveau du domaine  $\beta$ . Le quatrième pont disulfure Cys<sub>76</sub>-Cys<sub>94</sub> relie les domaines  $\alpha$  et  $\beta$  (McKenzie & White, 1991).

Il s'agit de la première enzyme dont un mécanisme d'action détaillé a été proposé. En effet, le lysozyme de l'Homme ou extrait du blanc d'œuf est une enzyme qui permet la destruction du peptidoglycane construisant la paroi des bactéries (particulièrement les bactéries à Gram positif). Cette enzyme est capable de cliver les liaisons covalentes  $\beta$  1-4-glucosidiques entre l'acide N-acétyl muramique et la N-acétyl-glucosamine (Figure I.2) (McKenzie & white, 1991 ; Callewaert & Michiels, 2010).



**Figure I.2.** Site de clivage du lysozyme au niveau de la chaîne du peptidoglycane

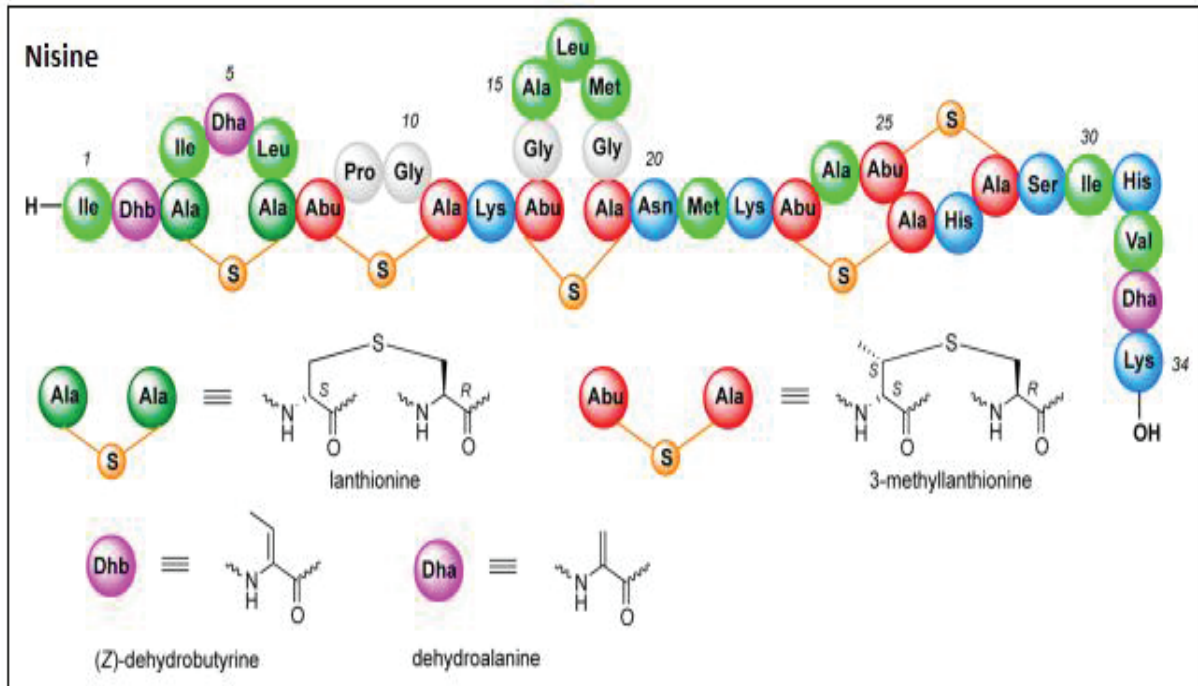
En revanche, les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes à cette enzyme. Leur paroi est caractérisée par la présence de la couche externe de lipopolysaccharides (LPS) couvrant celle du peptidoglycane ce qui permet de la protéger de l'action du lysozyme. L'activité enzymatique du lysozyme dépend des facteurs environnementaux (pH, température, pression osmotique). Comme le lysozyme comporte 4 ponts disulfures, cette molécule est compacte, considérablement thermostable dans une large gamme de température et résistante aux hautes pressions (Masschalck & Michiels, 2003). Le lysozyme de blanc d'œuf de poule ne contient pas de site spécifique pour la fixation de cations au sein de sa structure tridimensionnelle (McKenzie & white, 1991). Cette protéine présente une bonne activité enzymatique à pH 7 (Bayarri *et al.*, 2014). Sa température de dénaturation est de 74 °C dans des conditions de pH et de force ionique physiologiques (Ueda *et al.*, 2000). Il a été constaté que la dénaturation du lysozyme était réversible entre 52 et 73 °C du fait de la présence de liaisons hydrogènes qui n'ont pas été détruites. Par contre, à des températures excédant 73 °C, ces liaisons deviennent instables, la structure tridimensionnelle devient linéaire et le lysozyme est irréversiblement dénaturé (Corsaro & Mallamace, 2011). La dénaturation thermique du lysozyme dépend de sa concentration mais aussi du pH du milieu. Aucune perte d'activité n'a été constatée lorsque le lysozyme a été sujet à un chauffage à 100 °C pendant 30 min à pH 5,3. Il a été reporté que suite à une incubation pendant 30 min à 70 °C et à pH 7,9 ; il y a eu une perte de 25 % de l'activité (Masschalck & Michiels, 2003).

L'utilisation du lysozyme s'est réponde en industrie agroalimentaire grâce à ses propriétés antibactériennes. Le lysozyme est non toxique pour l'homme et a été reconnu comme

GRAS par la Food and Drug Administration (FDA) depuis 1998. L'intérêt croissant pour les stratégies de biopréservation basées sur des composés antimicrobiens naturels a favorisé la commercialisation du lysozyme en tant que conservateur alimentaire (E1105) dans l'objectif de prolonger la durée de vie et garantir la sûreté des produits alimentaires. Le lysozyme a été utilisé afin de produire des films antimicrobiens pour la préservation des aliments durant le stockage et sous différentes conditions physico-chimiques en raison de sa stabilité élevée sur une large gamme de température et de pH (Makki & Durance, 1996 ; Conte *et al.*, 2007). En effet, le lysozyme a été incorporé dans différents matériaux biopolymériques à base de chitosane (Huang *et al.*, 2012), d'alginate (Su Cha *et al.*, 2002), de zéine (Mecitoğlu *et al.*, 2006), de carraghénane (Su Cha *et al.*, 2002), de gélatine (Ma *et al.*, 2013), et de caséinate de sodium (Mendes de Souza *et al.*, 2010). Le lysozyme a été utilisé comme modèle afin de déterminer l'effet de la présence d'hydrocolloïdes sur la dénaturation thermique des protéines (Ibanoglu, 2005), ou encore comme modèle pour les molécules compactes chargées afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la complexation électrostatique (Cousin *et al.*, 2011).

#### **I.1.2.2. La nisine**

La nisine est une bactériocine qui appartient à la classe des lantibiotiques. Il s'agit d'un peptide cationique thermostable composé de 34 acides aminés (Figure I.3), ayant une masse moléculaire de 3,5 kDa et un point isoélectrique (*pI*) de 8,8 ce qui lui confère une charge nette positive sur une large gamme de pH. Elle est produite par des souches de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et possède une forte activité anti-*Listeria*. Ce peptide contient 4 acides aminés non communs : la déhydrobutyrine (DHB), la déhydroalanine (DHA), la lanthionine et la 3-méthyllanthionine qui forment des ponts thioéthers dans 5 positions (Figure I.3).



**Figure I.3.** Représentation schématique de la structure de la nisine avec les acides aminés hydrophobes en vert clair, les résidus polaires (bleu), les acides aminés non saturés (la déhydroalanine et la déhydrobutyrine) (violet), la lanthionine (vert foncé) et la 3-méthyllanthionine (rouge), S est l'atome de soufre du pont thioéther. Les formules structurales de la lanthionine, la 3-méthyllanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine sont également données (d'après [Slootweg et al., 2013](#)).

Contrairement aux protéines, la nisine n'absorbe pas à 280 nm puisqu'elle ne contient pas d'acides aminés aromatiques au niveau de sa structure. Dans la nature, on trouve plusieurs variantes de la nisine (nisine A, nisine Z, nisine Q,...). Les deux variantes A et Z comptent parmi les variantes les plus commercialisées. Elles diffèrent par une seule substitution de l'acide aminé en position 27 qui est l'histidine dans la nisine A et l'asparagine dans la nisine Z. Cette différence de structure confère à la nisine Z une solubilité plus élevée et des propriétés de diffusion plus intéressantes pour des applications alimentaires que la nisine A ([Bouksaim et al., 2000](#)).

La nisine possède une activité antimicrobienne, dirigée contre les bactéries à Gram positif comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* à l'origine d'intoxications alimentaires. Elle n'est toutefois pas active contre les bactéries à Gram négatif à cause de la présence de leur membrane externe ainsi que les levures, les moisissures et les virus. Son mode d'action repose sur son adsorption à la surface de la cellule cible et sur la

déstabilisation de la structure de la membrane cytoplasmique par la formation de pores ce qui provoque la libération de constituants cellulaires. Cette adsorption implique des interactions électrostatiques entre la nisine, chargée positivement, et les phospholipides membranaires chargés négativement. Elle est également due au caractère hydrophile de l'extrémité N-terminale du peptide. L'extrémité C-terminale, avec son caractère hydrophobe, permet l'insertion de la nisine au niveau de la membrane cellulaire provoquant sa perméabilisation (McAuliffe *et al.*, 2001).

L'activité antimicrobienne de la nisine dépend de sa solubilité et de sa stabilité structurale qui seraient dépendantes du pH. La nisine serait plus soluble et plus stable dans des conditions acides. La solubilité de la nisine diminue lorsque le pH augmente et s'approche de zéro lorsque le pH atteint ou excède la neutralité. L'activité antimicrobienne est également meilleure dans des conditions acides et baisse quand le pH augmente et ceci serait dû à une modification structurale de la nisine (Hurst, 1981). La nisine est très stable à des températures basses (durant la congélation par exemple) mais son activité peut être perdue lorsqu'elle est sujette à un traitement thermique pendant une longue durée. De plus, la stabilité thermique de la nisine est dépendante du pH et aurait tendance à augmenter lorsque le pH baisse et ceci peut être expliqué par la présence des 5 ponts thioéthers (Rollema *et al.*, 1995).

Depuis 1988, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé la nisine comme GRAS et a autorisé son utilisation comme ingrédient alimentaire pour un usage direct. La nisine est actuellement utilisée comme conservateur dans plus d'une cinquantaine de pays dans le monde. L'EFSA (l'Autorité européenne de sécurité des aliments) a renouvelé en 2006 l'autorisation d'utiliser la nisine en Europe comme additif alimentaire (E234), ce qui fait de la nisine la seule bactériocine dont l'usage est autorisé en Europe. Cependant, selon plusieurs études, l'efficacité antimicrobienne de la nisine peut être réduite lorsqu'elle est appliquée dans les produits alimentaires à cause de l'instabilité de sa structure, de l'interaction avec certains composants des aliments tels que les protéines et les lipides, l'action des enzymes protéolytiques peut également induire sa dégradation et son inactivation (Chollet *et al.*, 2008). Le développement de certaines souches bactériennes résistantes à la nisine a aussi été rapporté (Gharsallaoui *et al.*, 2015). Afin de faire face à ces nombreux problèmes, plusieurs stratégies ont été élaborées afin d'améliorer la stabilité de ce peptide et d'assurer sa capacité à inhiber la croissance bactérienne. L'encapsulation de la nisine représente une possibilité intéressante afin d'assurer sa stabilité, la protéger des interactions avec les autres constituants présents dans les matrices alimentaires et permettre le contrôle de sa libération (Xiao *et al.*, 2011).

En outre, l'incorporation de la nisine dans une matrice à base d'alginate afin d'obtenir des microparticules a permis de protéger ce peptide contre l'inactivation protéolytique (Wan *et al.*, 1997).

### I.1.2.3. La pectine

Les substances pectiques se trouvent chez tous les végétaux et sont responsables de la rigidité et de la cohésion des tissus végétaux. La molécule de pectine se présente sous la forme d'un polymère linéaire d'acides D-galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1-4) par des liaisons glycosidiques (Figure I.4).

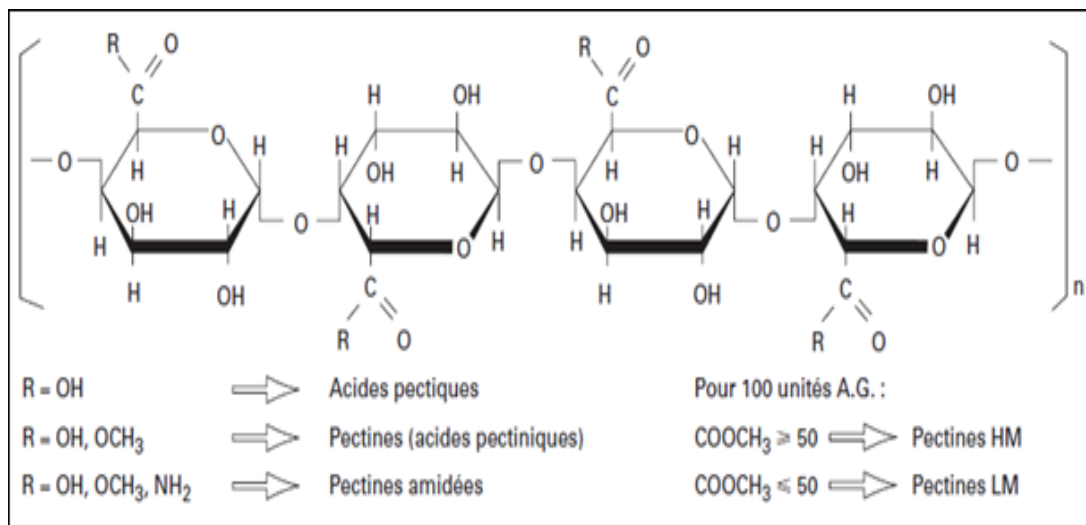
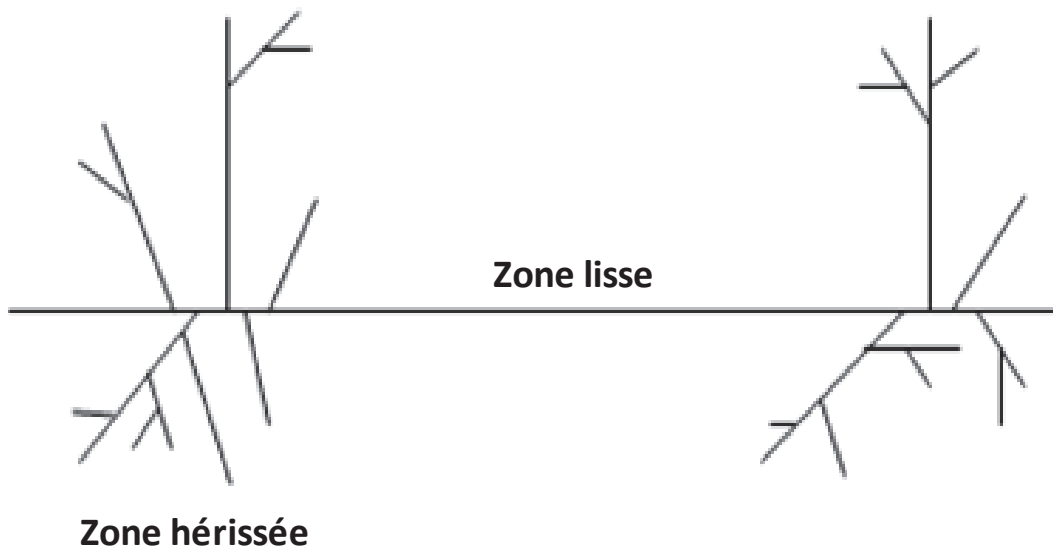


Figure I.4. Structure chimique de la pectine

Le long de cette chaîne principale, sont présentes toute une série de substitutions : (i) Les fonctions acides carboxyliques sont plus ou moins estérifiées par du méthanol, définissant ainsi le degré d'estérification (DE) (ou degré de méthylation (DM)) des pectines. Ce degré correspond au nombre de fonctions acide carboxylique méthylées pour cent motifs d'acide galacturonique de la chaîne principale. Les caractéristiques fonctionnelles des pectines dans les solutions aqueuses dépendent de son degré d'estérification. Les pectines 'faiblement estérifiées' (LM : low methoxyl) sont caractérisées par un degré d'estérification inférieur à 50%. Les pectines 'hautement estérifiées' (HM : high methoxyl) ont un degré d'estérification supérieur à 50% ; (ii) Ces mêmes fonctions acides peuvent, suite à un traitement en milieu ammoniacal, être amidées. Dans ce cas, on parlera du degré d'amidation (DA) ; (iii) La chaîne d'acide galacturonique est interrompue par des unités de  $\beta$ -L-rhamnose présentes dans une faible proportion (1-4%) liées en  $\alpha$ -(1-2), produisant des irrégularités. La présence d'une faible proportion de ces résidus est suffisante pour augmenter la flexibilité de la pectine.



Cette zone de flexibilité, appelée ‘coude pectique’, faciliterait la formation d’un réseau tridimensionnel lors de la gélification. Les zones substituées par les rhamnoses sont dites hérissées puisqu’elles contiennent des ramifications qui sont essentiellement composées de sucres simples neutres comme l’arabinose, le galactose, le xylose, le glucose et l’acide glucuronique. Ces zones hérissées sont séparées par des régions lisses formées majoritairement par des séquences d’acide D-galacturonique (Figure I.5). Les zones lisses sont très résistantes à l’hydrolyse acide tandis que les zones hérissées y sont sensibles (Voragen *et al.*, 1995). La pectine peut aussi subir une hydrolyse enzymatique par les enzymes pectinolytiques comme la pectine méthylestérase, la pectine lyase et la polygalacturonase. Sa structure tertiaire prend une forme d’hélice tridimensionnelle.



**Figure I.5.** Structure schématisée d’une molécule de pectine (d’après Voragen *et al.*, 1995)

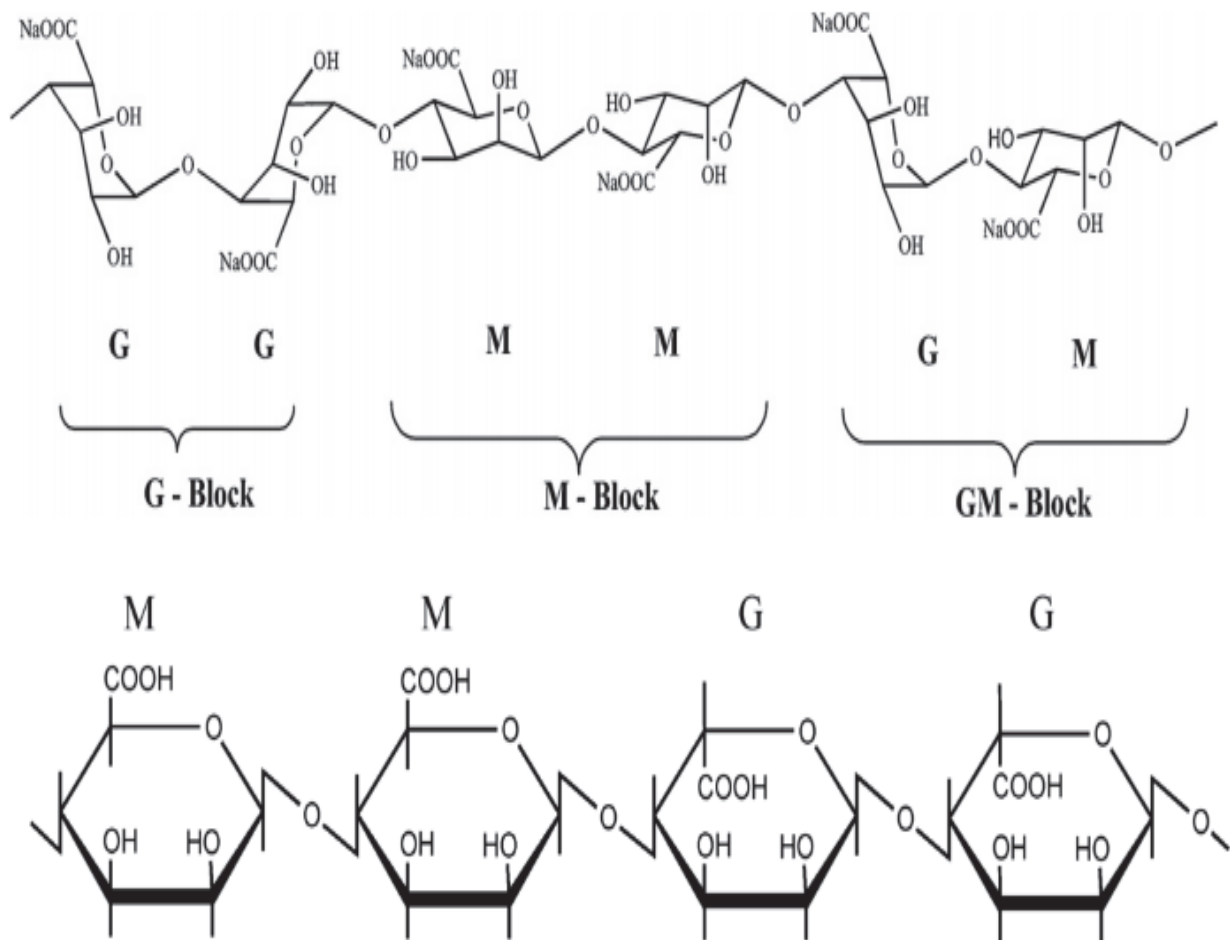
La pectine a un poids moléculaire compris entre 50000 et 200000 Da (Voragen *et al.*, 1995). Il s’agit d’un polysaccharide anionique ( $pK_a \sim 3-4$ ). La charge est induite par la présence des groupements acides carboxyliques ( $-COOH$ ) ionisables. Cette charge augmente avec une augmentation du pH et une diminution du DE. Les charges portées par la pectine peuvent être masquées suite à une augmentation de la force ionique (Voragen *et al.*, 1995). Selon sa concentration, son DE, le pH et la concentration totale en polymères, la pectine peut conduire à une augmentation de la viscosité de la solution ou à une gélification. Le phénomène de gélification est différent s’il s’agit d’une pectine LM ou HM. Dans le cas d’une pectine HM, la gélification est possible à un pH acide et en présence d’une faible quantité de sucre. D’une part à pH acide, les interactions pectine/pectine sont favorisées plutôt que les interactions pectine/eau car il y a une diminution des répulsions électrostatiques. D’autre part, la présence

de sucre entraîne une baisse de l'activité de l'eau (Voragen *et al.*, 1995). Dans le cas d'une pectine LM, la gélification a lieu en présence d'ions calcium à pH acide. Les ions calcium permettent l'établissement de zones de jonctions entre les chaînes de pectine ce qui conduit à la formation d'un réseau. Grâce à leurs propriétés épaississantes et gélifiantes, les pectines sont largement utilisées en industrie agroalimentaire.

En raison de son caractère anionique, il a été démontré que la pectine est capable d'interagir avec les protéines dans différentes conditions physico-chimiques. Ainsi, il a été montré qu'à des valeurs de pH en dessous de leur *pI*, les protéines de soja (Jaramillo *et al.*, 2011), le caséinate de sodium (Happi Emaga *et al.*, 2012), la  $\beta$ -lactoglobuline (Jones *et al.*, 2010), la gélatine (Farris *et al.*, 2011), et les protéines de pois (Gharsallaoui *et al.*, 2010) sont capables de former des complexes avec les chaînes de pectine. Les propriétés de ces complexes qui sont souvent étudiées, sont essentiellement les propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes de ces systèmes ainsi que les techniques d'extraction et de purification des protéines à partir des sous-produits industriels.

#### **I.1.2.4. L'alginate**

L'alginate et ses dérivés sont des polysaccharides obtenus à partir d'algues brunes. Les alginates peuvent être considérés comme des copolymères à blocs constitués de régions homopolymères d'acides  $\beta$ -D-mannuronique (blocs MM) et d'acides  $\alpha$ -L-guluroniques (GG) liés en (1-4) séparées par des régions aux structures alternées (blocs MG) (Figure I.6) (Haug *et al.*, 1967). Le nombre de ces unités varie de 100 à 3000. La composition de la chaîne et le nombre de ces séquences ainsi que la masse moléculaire déterminent les propriétés physico-chimiques de l'alginate.



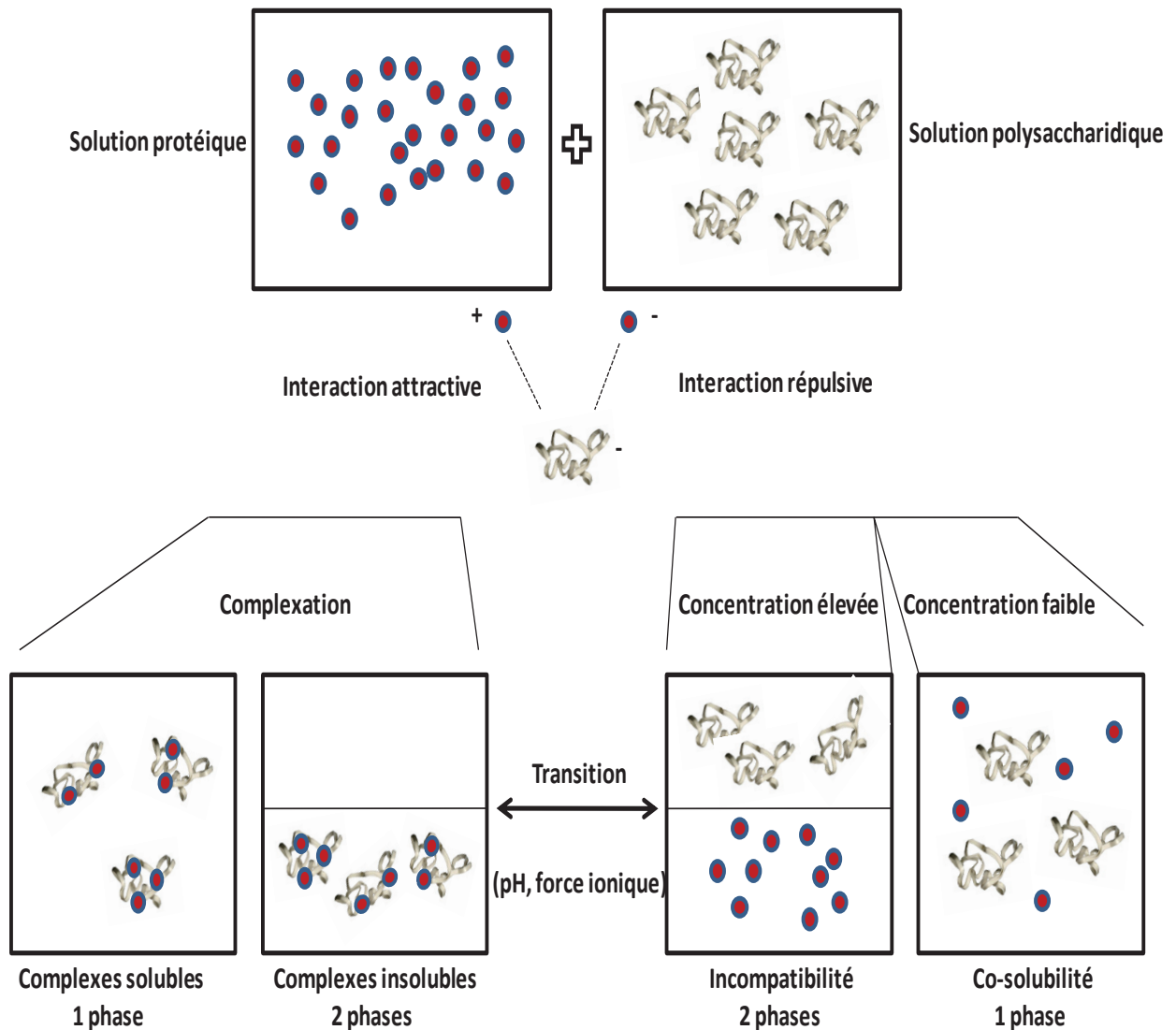
**Figure I.6.** Structure chimique de l'alginate de sodium et des deux monomères qui la composent (d'après [Daemi et al., 2013](#))

La masse moléculaire de l'alginate est comprise entre 20000 et 240000 Da. Dans le cas de l'alginate de sodium, le poids moléculaire peut varier entre 35000 et 1 500000 Da. L'alginate est caractérisé par une charge négative sur une large gamme de pH étant donné que le  $pK_a$  de l'acide mannuronique est de 3,38 et celui de l'acide guluronique de 3,65. Des groupements carboxyliques sont présents le long de sa chaîne ce qui lui confère différentes densités de charges selon le pH. Lorsque le pH de la solution est au-dessus du  $pK_a$  des acides uroniques, l'alginate précipite (séparation de phase) et peut former un gel acide. Les alginates de sodium se dissolvent dans l'eau en formant des solutions avec une viscosité élevée et ceci serait dû à la présence de groupements chargés ainsi qu'au volume hydrodynamique des chaînes. La viscosité est donc influencée par les conditions opératoires (pH, force ionique, température). L'augmentation de la masse molaire entraînerait une augmentation de la viscosité. L'addition de cations divalents ( $Ca^{2+}$  par exemple) provoque la formation d'un gel. Cette formation est causée par les interactions entre les blocs G qui s'associent pour former des zones de jonctions de nature forte ([Grant et al., 1973](#)) à travers l'échange d'ions sodium des acides guluroniques

avec les cations divalents (modèle dit de la boîte à œufs). Les blocs MG peuvent également y participer pour former des zones de jonction de nature faible. Ces propriétés des alginate sont utilisées en industrie surtout dans l'industrie agro-alimentaire puisqu'ils servent d'épaississants et de gélifiants.

### I.1.3. Comportement des mélanges de biopolymères protéines/polysaccharides

Lorsqu'une protéine et un polysaccharide sont mélangés, en milieu aqueux, plusieurs types d'interactions peuvent avoir lieu se traduisant par différents comportements qui incluent la co-solubilité, l'incompatibilité thermodynamique ou la compatibilité thermodynamique (ou la coacervation complexe) selon les charges électriques des polymères présents qui sont affectées par différents facteurs (pH, force ionique,...) (Figure I.7).



**Figure I.7.** Comportements des mélanges de biopolymères protéines/polysaccharides (McClements, 2006)

### **I.1.3.1. La co-solubilité**

La co-solubilité peut se présenter lorsque les molécules n'interagissent pas et forment un mélange homogène. La co-solubilité a généralement lieu dans les systèmes dilués. Lorsque les interactions attractives sont inhibées ou inexistantes, les deux molécules peuvent exister dans une seule phase (Tolstoguzov, 1997 ; 2003). Lorsque le poids moléculaire des biopolymères ou leur concentration dépasse une certaine valeur critique, la co-solubilité devient limitée laissant place à l'établissement d'une incompatibilité thermodynamique (Tolstoguzov, 1997 ; 2003). La présence de faibles répulsions électrostatiques entre les deux biopolymères dans le système est suffisante pour que la formation de deux phases séparées ait lieu.

### **I.1.3.2. La séparation de phase ségrégative**

La séparation de phase ségrégative à de fortes forces ioniques ou à de fortes concentrations en polymères (Grinberg & Tolstoguzov, 1997) a lieu lorsque les biopolymères sont caractérisés par une incompatibilité thermodynamique. Ce phénomène, ayant fait l'objet de plusieurs revues (Doublie *et al.*, 2000 ; Tolstoguzov, 2003 ; McClements, 2006), a lieu lorsque les deux polymères portent des charges similaires générant de fortes interactions répulsives entre eux ou lorsqu'ils sont neutres bien que certaines études ont montré que des complexes ont été formés à partir de biopolymères neutres (Frith, 2010).

A des concentrations suffisamment faibles, les deux biopolymères sont mixés et forment une seule phase mais une fois que la concentration en polymères excède une certaine valeur critique, une solution à deux phases est formée avec une phase riche en protéines et appauvrie en polysaccharides et *vice versa*. Ce phénomène a lieu lorsque les interactions répulsives entre les deux biopolymères sont plus importantes que les interactions répulsives entre les biopolymères d'une même nature générant ainsi deux phases non miscibles. De plus, dans le cas d'une incompatibilité thermodynamique, chaque polymère présenterait une affinité différente par rapport au solvant. Les interactions protéine/solvant (ou polysaccharide/solvant) seraient favorisées au dépit des interactions protéine/polysaccharide ou solvant/solvant (Doublie *et al.*, 2000).

D'une manière générale, des interactions répulsives de même nature et un effet d'exclusion stérique (volume exclu) sont à l'origine de l'incompatibilité thermodynamique. Le volume exclu est généré lorsque les molécules occupent un volume assez large entraînant ainsi l'exclusion d'autres molécules en les empêchant d'occuper le même volume (McClements *et al.*, 2009). Les interactions stériques entraîneraient une restriction des arrangements spatiaux

des molécules d'une même nature ou différentes. L'incompatibilité thermodynamique dépend des charges des polymères présents, de leur concentration, de leur nature (poids moléculaire), de la flexibilité des chaînes du polysaccharide, de la force ionique et du pH.

### **I.1.3.3. La coacervation complexe ou séparation de phase associative**

On distingue la coacervation simple et la coacervation complexe. Dans le cas de la coacervation simple, un seul polymère est impliqué et il est alors exclu de la solution dans des conditions de désolvatation suite à l'addition d'un sel ou à un changement du pH ou de température par des phénomènes de neutralisation des charges ou à travers des interactions hydrophobes entraînant ainsi la formation d'une phase liquide à base de coacervats (exemple : ajout du calcium à l'alginate).

La séparation de phase associative connue aussi sous le nom de coacervation complexe ou compatibilité thermodynamique implique deux polymères, solubles dans l'eau, et a lieu généralement lorsque la concentration ne dépasse pas 3 à 4% (p/p) en solides totaux et à de faibles forces ioniques ( $<0,4$  M) (Tolstoguzov, 1986). Elle comprend aussi bien la coacervation complexe qui est une séparation liquide/liquide et la précipitation qui est plutôt une séparation solide/liquide. Selon la force des interactions et la nature des biopolymères présents, la phase riche en biopolymères peut être un coacervat ou un précipité (McClements, 2006). Les aspects théoriques de la coacervation complexe sont bien expliqués dans les revues de Burgess (1990) et Schmitt *et al.* (1998). La spécificité majeure de la coacervation complexe qui la distingue des autres transitions de phase (précipitation, gélification,...) est que la séparation de phase associative soit liquide/liquide et que le coacervat formé ait plutôt une structure visqueuse et proche de celle d'un gel contenant des quantités importantes de solvant et non pas une structure solide/liquide. Le système gélatine/gomme d'acacia fut l'un des premiers systèmes impliquant la coacervation complexe à être étudié (Burgess & Carless, 1984).

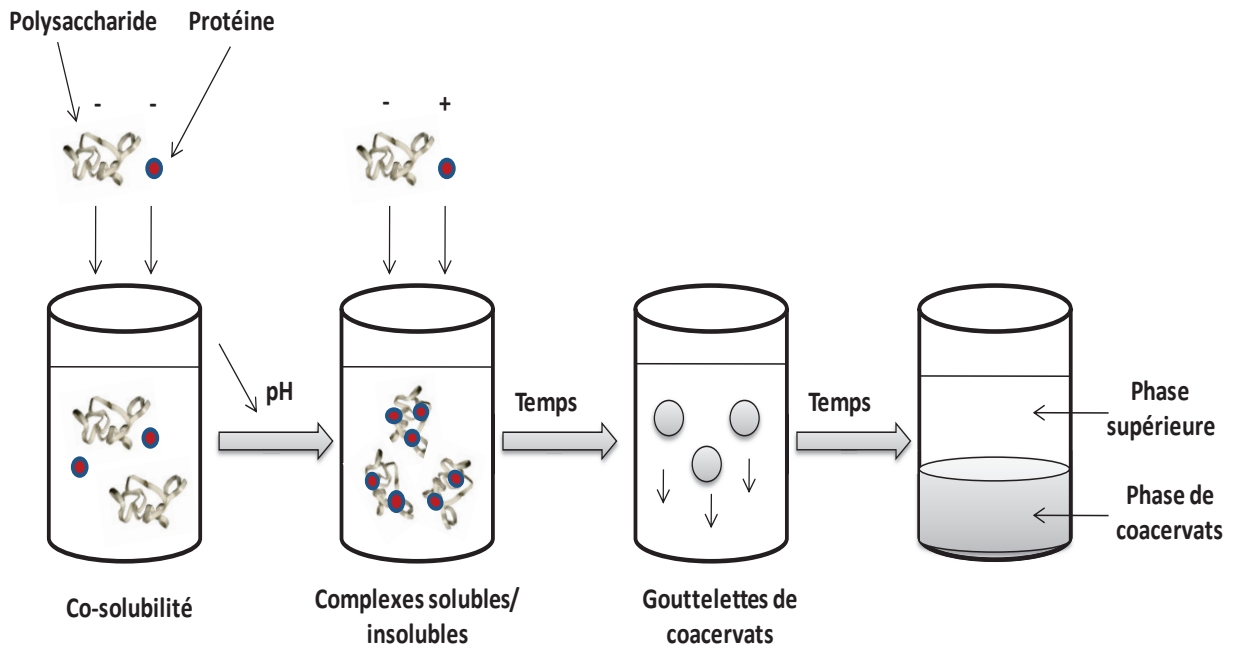
La coacervation signifie l'union de particules colloïdales. A partir de cette terminologie, on peut comprendre qu'il s'agit de gouttelettes liquides qui sont sujettes au phénomène de coalescence appelées aussi coacervats. En effet, la coacervation peut être décrite comme étant une méthode chimique et une agrégation macromoléculaire au cours de laquelle des polymères forment des gouttelettes en suspension qui sont alors exclues de la solution. Il s'agit d'une désolvatation partielle de macromolécules solvatées. Ce phénomène implique l'établissement d'interactions électrostatiques entre deux biopolymères portant des charges opposées ce qui entraîne une diminution de l'énergie libre électrostatique du système à travers une baisse de la

mobilité et de la flexibilité des polymères. Toutefois, la perte d'entropie provoquée est compensée en partie par les contributions enthalpique et entropique provenant de la libération de contre-ions associés aux macromolécules mais aussi à la libération de molécules d'eau (Tolstoguzov, 1997 ; 2003 ; Turgeon *et al.*, 2007).

La coacervation complexe implique un polyanion et un polycation et d'une manière générale, deux polymères, une protéine et un polysaccharide, comme dans le cas de notre étude. Ces deux macromolécules sont mixées ensemble à un pH supérieur au  $pK_a$  du polysaccharide et inférieur au point isoélectrique de la protéine ( $pI$ ), induisant la formation de complexes solubles et insolubles selon le type de biopolymère utilisé, la taille et la charge des complexes formés ainsi que leurs propriétés de surface (Schmitt & Turgeon, 2011). Dans le cas du chitosane qui est de nature cationique, les interactions électrostatiques peuvent avoir lieu lorsque le pH est en dessus du point isoélectrique de la protéine.

La formation de complexes solubles a lieu lorsque le nombre de charges portées par les molécules qui interagissent ne s'équilibre pas entièrement. La coacervation est maximale lorsque la charge globale portée par les complexes obtenus est nulle (neutralisation des charges) (la stœchiométrie des charges est de 1/1) (de Kruif *et al.*, 2004). Les complexes insolubles peuvent se concentrer sous la forme de gouttelettes liquides de coacervats qui peuvent sédimenter afin de former une couche. Le résultat est une séparation macroscopique en une phase riche en coacervats (phase du dessous) et en une autre phase riche en solvant (celle du dessus) (Figure I.8). Chaque biopolymère peut se trouver au niveau de la phase riche en complexes ou dans une faible proportion au niveau de la phase aqueuse (Ach *et al.*, 2015).

Les coacervats sont susceptibles au phénomène de coalescence mais aussi à la dissociation lorsque les conditions environnantes sont altérées entraînant un affaiblissement des interactions attractives entre les biopolymères. Ce système est capable de répondre aux changements environnementaux en se réarrangeant (changements de la conformation des chaînes de biopolymères) par une altération de la distribution des charges lorsque l'environnement ne permet pas une compensation immédiate des charges.



**Figure I.8.** Représentation schématique de la séparation de phase par coacervation complexe

D'une manière générale, la séparation de phase associative implique essentiellement des interactions électrostatiques mais d'autres types d'interactions peuvent également jouer un rôle comme les interactions hydrophobes, les forces de van der Waals, les liaisons hydrogènes, ou encore le phénomène d'exclusion stérique.

#### I.1.4. Les différents types d'interactions protéines/polysaccharides

Du point de vue moléculaire, différentes interactions entre les protéines et les polysaccharides de par leur nature, leur force (énergie) et leur spécificité peuvent exister. Ces interactions dépendent de la nature des polymères présents dans le système ainsi que des facteurs physico-chimiques environnants (température, pH, force ionique). Les propriétés fonctionnelles de la protéine (solubilité, tension de surface, conformation, capacité à former un gel, propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes) dépendent de ces interactions. La formation et la stabilité des complexes protéines/polysaccharides sont aussi coordonnées par ces différentes interactions. De plus, ces interactions représentent des paramètres importants pour le développement ou la formulation de systèmes innovants ou pour générer de nouvelles propriétés physico-chimiques.

##### I.1.4.1. Les liaisons covalentes

Les liaisons covalentes sont caractérisées par leur spécificité contrairement aux interactions électrostatiques, de van der Waals ou aux interactions hydrophobes. Ces liaisons



covalentes impliquent un partage d'électrons entre un ou plusieurs atomes. Ces interactions sont caractérisées par une énergie potentielle élevée (200 à 800 kJ.mol<sup>-1</sup>). Des complexes protéines/polysaccharides peuvent être présents dans la nature incluant des résidus de protéines attachés par des liaisons covalentes à des polysaccharides (exemple : gomme arabique) (Evans *et al.*, 2013). Des complexes protéines/polysaccharides peuvent également se former *via* des liaisons covalentes par la réaction de Maillard. Cette réaction implique l'interaction entre l'extrémité réduite du groupement carbonyle du polysaccharide et le groupement amine de la protéine formant ainsi des liaisons covalentes suite à un chauffage contrôlé (temps, température, humidité) ou bien en appliquant un champ électrique pulsé. Des liaisons covalentes peuvent aussi s'établir en utilisant la transglutaminase ou d'autres enzymes oxydatives (tyrosinase, laccase et peroxidase). Dans ce cas, les acides aminés aromatiques de la protéine peuvent être oxydés en présence de l'enzyme et d'oxygène en quinones qui peuvent donc former des liaisons covalentes (cross-links) avec les groupements fonctionnels présents au niveau de la protéine ou du polysaccharide. De même, des liaisons covalentes peuvent se former entre les protéines et les polysaccharides suite à un traitement alcalin (Liu *et al.*, 2017a). Les liaisons covalentes sont résistantes aux changements des facteurs environnementaux (température, pH,...) et les complexes protéines/polysaccharides qui en découlent sont stables et peuvent donc être utilisés pour différentes applications (stabilisation des émulsions,...).

#### **I.1.4.2. Les interactions électrostatiques**

Les interactions électrostatiques peuvent être de trois types : ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle. La force des interactions électrostatiques est dépendante des charges portées par les deux molécules ( $q$ ), de la distance entre les molécules ( $r$ ) et de la constante diélectrique du milieu dans lequel elles sont présentes (Prausnitz *et al.*, 1999) et peut donc être exprimée par la loi de Coulomb :

$$F = \frac{q_1 q_2}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon_r r^2}$$

Où  $\epsilon_0$  correspond à la constante diélectrique du vide ( $8,85419 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ) et  $\epsilon_r$  correspond à la constante diélectrique relative du milieu. L'énergie de ces interactions est comprise entre 25 et 50 kJ.mol<sup>-1</sup> (Israelachvili, 1992).

Un exemple type de l'établissement d'interactions électrostatiques est la formation de ponts ioniques par la liaison entre des cations polyvalents (exemple : Ca<sup>2+</sup>) et deux groupements anioniques. Les interactions électrostatiques sont importantes pour les polymères qui portent

une charge électrique dans les conditions dans lesquelles ils sont utilisés (pH et force ionique) (McClements, 2006). Les protéines sont caractérisées par un potentiel zêta positif ou négatif selon le pH du milieu (positif si le pH est inférieur au  $pI$  et *vice versa*). Cette charge électrique de la protéine est due aux différents acides aminés présents et à leurs modes d'ionisation à différents pH. Les groupements fonctionnels présents au niveau des polysaccharides sont toutefois limités en nombre. Les polysaccharides peuvent être anioniques par la présence du groupement  $-\text{COO}^-$  (pectine, alginate, gomme arabique, acide hyaluronique, carboxyméthyl cellulose, carboxyméthyl dextrane) ou par la présence du groupement  $-\text{SO}_3^-$  (dextrane de sulfate, carraghénane). Les acides carboxyliques sont déprotonés lorsque le pH est au-dessus du  $pK_a$  et deviennent chargés négativement. Le seul polysaccharide cationique est le chitosane avec un groupement  $-\text{NH}_3^+$ . Les polysaccharides peuvent aussi être neutres (dextrane, amylopectine, Ficoll) (Li & Huang, 2015). Ainsi, dans un grand nombre de cas, les interactions électrostatiques dominent dans la formation de complexes macromoléculaires entre les protéines et les polysaccharides, à une faible concentration en sel et à un pH permettant d'avoir les deux types de biopolymères chargés de manière opposée. Selon si les groupements chargés ont des charges similaires ou opposées, ces interactions peuvent être attractives ou répulsives (McClements, 2006).

#### **I.1.4.3. Les liaisons hydrogènes**

Les liaisons hydrogènes sont de type dipôle-dipôle. Ces interactions de caractère ionique et pouvant être intra ou inter-chaînes sont causées par une interaction entre un atome d'hydrogène (accepteur d'électrons) lié à un atome électronégatif (N, O ou S) et un autre atome électronégatif (donneur d'électrons) (Rinaudo, 2006). L'énergie d'une liaison hydrogène est comprise entre 10 et 30  $\text{kJ.mol}^{-1}$  (Israelachvili, 1992). La force de ces liaisons est dépendante de l'électronégativité et de l'orientation des atomes (donneurs et accepteurs d'électrons). Ce type de liaison s'établit entre les groupements polaires au sein d'une même molécule ou entre deux molécules (McClements, 2006). Ces interactions interviennent pour le maintien de la structure des protéines (hélicoïdale ou en forme de feuillets,...) ou dans des assemblages à base de molécules comme des agrégats ou des gels (exemple : gels à base de gélatine) (McClements *et al.*, 2009). La présence de groupement  $-\text{COOH}$  au niveau des polysaccharides ou de groupements  $-\text{NH}_3$  ou  $-\text{COOH}$  au niveau des protéines sont responsables des liaisons hydrogènes entre ces deux types de biopolymères. Ces interactions sont favorisées à des températures basses et peuvent être déstabilisées par l'utilisation de l'urée ou à des températures élevées (Liu *et al.*, 2010). Elles ont été mises en évidence dans différents systèmes de

coacervats. Par exemple, il a été montré que la complexation entre la gélatine de type B ( $pI \sim 5,1$ ) et le  $\kappa$ -carraghénane implique des interactions électrostatiques attractives pouvant raccourcir la distance entre les chaînes désordonnées de ces deux biopolymères pour favoriser ainsi les liaisons par pont hydrogène (Wang *et al.*, 2015).

#### **I.1.4.4. Les interactions hydrophobes**

Les interactions hydrophobes, de même que les liaisons hydrogènes, sont susceptibles de s'établir dans les complexes protéines/polysaccharides. Elles peuvent se former lorsque les biopolymères présentent des groupements hydrophobes et hydrophiles à travers l'association des groupements non polaires des biopolymères dans le milieu (McClements, 2006). L'énergie de ces interactions hydrophobes est comprise entre 2 et 10  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Du point de vue moléculaire, ce type d'interactions peut se manifester essentiellement lors de la présence de molécules amphiphiles au niveau desquelles les parties hydrophiles vont interagir avec les molécules d'eau et les parties hydrophobes vont se lier ensemble afin de former un domaine hydrophobe (McClements *et al.*, 2009 ; Jones & McClements, 2010 ; Jones & McClements, 2011). Les protéines et les polysaccharides peuvent contenir des groupements non polaires qui peuvent donc participer à l'établissement d'interactions hydrophobes.

Plusieurs études ont montré l'existence de ce type d'interactions dans la complexation entre les protéines et les polysaccharides (Da S. Gulão *et al.*, 2014 ; Dong *et al.*, 2015). De plus, il a été montré que lorsque des systèmes de biopolymères sont sujets à une augmentation de la température, les interactions hydrophobes (de nature endothermique) sont favorisées suite à des changements structuraux et à travers l'exposition de certaines fractions non polaires au niveau des chaînes de polymères (Da S. Gulão *et al.*, 2014). La force de ces interactions hydrophobes a tendance à augmenter à des températures élevées et à baisser en diminuant la constante diélectrique du milieu (exemple : addition d'alcool) (McClements *et al.*, 2009).

#### **I.1.4.5. Les liaisons de van der Waals**

Les liaisons de van der Waals sont des interactions pouvant être de type dipôle permanent-dipôle permanent, dipôle permanent-dipôle induit et dipôle induit-dipôle induit (Dickinson & McClements, 1996 ; Dickinson, 1998). L'énergie potentielle de ces liaisons est située entre 1 et 20  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Israelachvili, 1992). Elles sont le résultat de la distribution asymétrique des nuages d'électrons d'un atome qui induit un moment dipolaire sur cet atome. Ce moment dipolaire peut alors interagir avec les électrons des atomes voisins et induire un autre dipôle favorisant la mise en place des liaisons van der Waals entre ces atomes. Selon la distance entre les atomes, ces

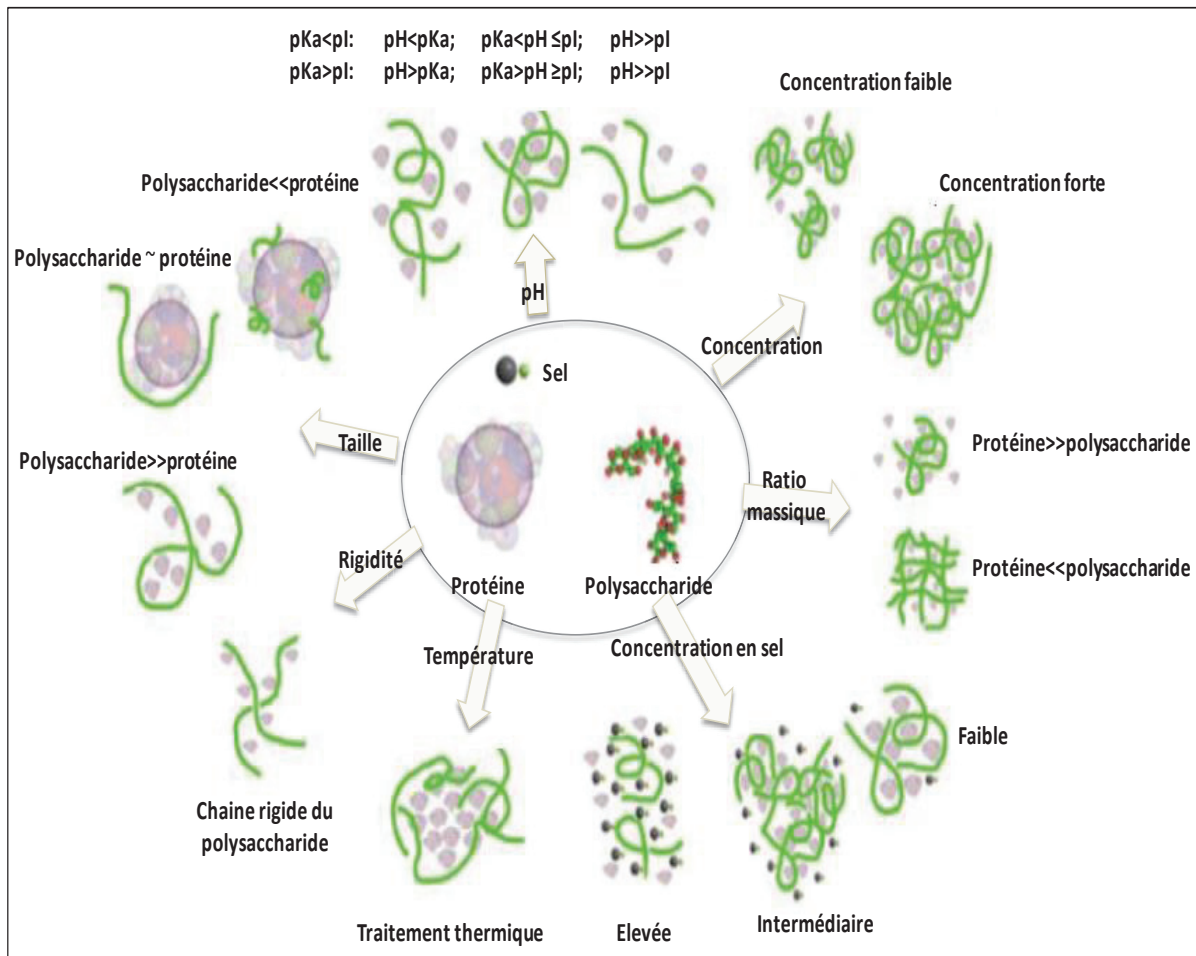
forces peuvent être attractives ou répulsives. Si les atomes sont proches, ces forces seraient attractives. Sinon si le rapprochement est très important, les répulsions électrostatiques entre les nuages adjacents négativement chargés d'électrons deviennent trop importantes ce qui entraîne une inhibition de ces forces.

#### **I.1.4.6. Le phénomène d'exclusion stérique**

Le volume assez large occupé par les biopolymères en solution indique que l'effet d'exclusion stérique est assez important. Il y a une réduction de l'entropie du système à cause de la réduction du volume libre pouvant être occupé par les molécules de biopolymères (McClements, 2006).

#### **I.1.5. Les paramètres influençant la formation des complexes et les interactions mises en jeu**

Les interactions électrostatiques entre les protéines et les polysaccharides peuvent être attractives ou répulsives selon les caractéristiques du biopolymère utilisé (poids moléculaire, conformation, flexibilité, densité et distribution des charges), les propriétés du solvant (pH et force ionique), les conditions de préparation (ratio, concentration totale en biopolymères, température, temps, pression, vitesse d'agitation) (Schmitt & Turgeon, 2011 ; Li & Huang, 2015). Il existe donc un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui peuvent conditionner les interactions mises en jeu, la formation des complexes, leur structure, leurs propriétés et leur stabilité en fonction du temps mais aussi la séparation de phase (Figure I.9). Ces différents paramètres sont listés ci-dessous.

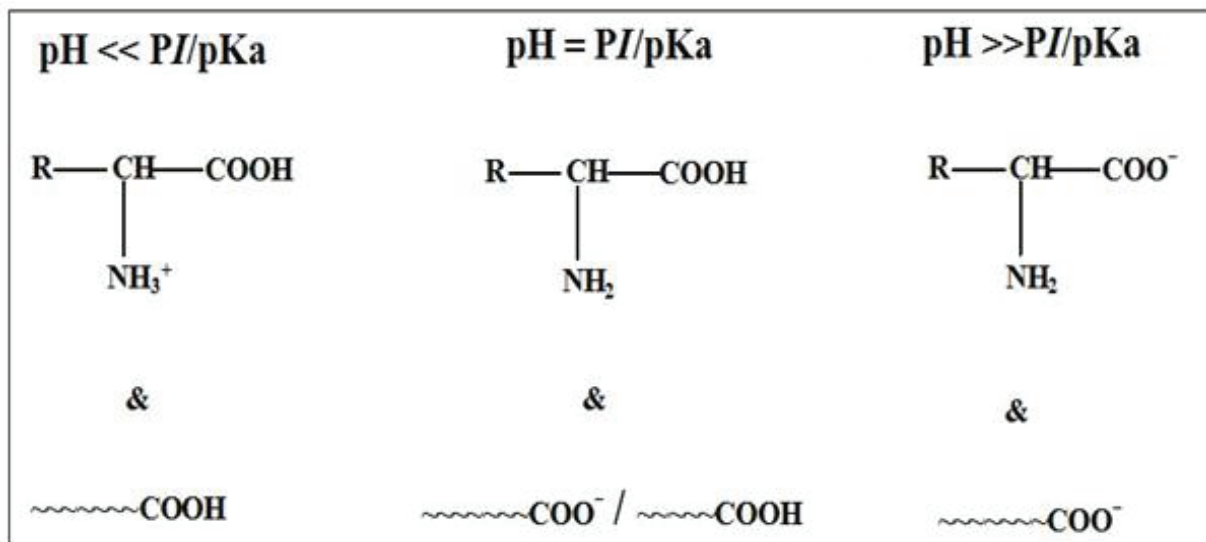


**Figure I.9.** Diagramme schématisant des structures des complexes protéines/polysaccharides en fonction du pH, de la concentration totale en biopolymères, du ratio massique, de la concentration en sel, de la température, de la rigidité de la chaîne et de la taille des polymères (d'après Li & Huang, 2015).

### I.1.5.1. La densité de charges

La densité des charges et leur nature représentent l'un des facteurs essentiels qui influencent la formation des complexes et dont la force des interactions électrostatiques entre les biopolymères serait dépendante. Si la densité des charges est très faible, les interactions électrostatiques peuvent ne pas intervenir. Selon que la densité des charges est faible ou forte, les complexes peuvent ou non se former. De plus, lorsque la charge d'une molécule est en excès, les complexes sont solubles. Lorsque les charges des deux biopolymères sont opposées et égales, une neutralisation des charges a lieu entraînant la formation de complexes insolubles (Li & Huang, 2015).

Lorsque le pH est supérieur au  $pI$  de la protéine, le système est co-soluble. Les deux molécules portent une charge nette négative (Figure I.10). La formation de complexes peut toutefois avoir lieu. Ceci serait dû à la présence d'interactions électrostatiques pouvant s'établir à cause de la présence de certaines zones localisées dans la protéine appelées 'patches' au niveau desquelles la densité de charges positives est assez élevée. La concentration en charges positives au niveau de ces zones doit être suffisamment importante afin de surmonter la répulsion électrostatique entre les deux molécules et interagir avec les groupements chargés négativement du polysaccharide pour former des complexes macromoléculaires (Wang *et al.*, 2015 ; Khalesi *et al.*, 2016). Lorsque le pH est en dessous du  $pI$  de la protéine et en dessus du  $pK_a$  du polysaccharide, les deux biopolymères seront caractérisés par des charges opposées favorisant ainsi le phénomène de coacervation complexe (Figure I.10).



**Figure I.10.** Variation de la densité de charge sur la chaîne de la protéine et du polysaccharide en fonction du pH (Ghosh & Bandyopadhyay, 2012).

### I.1.5.2. Nature du biopolymère (poids moléculaire, conformation et flexibilité)

Les interactions moléculaires entre les protéines et les polysaccharides dépendent de leurs caractéristiques moléculaires en solution (longueur de la chaîne, branchements, charge, flexibilité et hydrophobicité) qui seraient conditionnées par le type, le nombre, la séquence et la liaison des monomères formant ces biopolymères (McClements, 2006). Une augmentation de la masse moléculaire des biopolymères favoriserait le phénomène de séparation de phase. Une augmentation de la masse moléculaire du polysaccharide rend le volume occupé par celui-ci plus grand le rendant ainsi plus accessible afin d'interagir avec la protéine. Par conséquent la séparation de phase ou la coacervation complexe seraient favorisées et ceci serait lié à la

densité des charges entre les molécules. Toutefois, une gamme bien déterminée de masses moléculaires serait nécessaire afin que la coacervation complexe puisse se produire. Deux cas limites se présentent : si les masses moléculaires des biopolymères sont très faibles, l'interaction se fait par un simple pontage ionique plutôt que par la formation de complexes intermoléculaires. Si les masses moléculaires sont très élevées, la précipitation est favorisée plutôt que la coacervation (Frugier & Audebert, 1994).

Lorsque la taille du polysaccharide est beaucoup plus élevée que celle de la protéine, chaque chaîne du polysaccharide peut interagir avec plusieurs molécules de protéines de manière à ce que la neutralisation des charges puisse avoir lieu. Lorsque les tailles des deux biopolymères sont similaires, le complexe formé contiendra la protéine et le polysaccharide selon la composition stœchiométrique. Si le polysaccharide est beaucoup plus petit que la protéine, il peut être considéré comme un ligand interagissant avec cette protéine (Li & Huang, 2015). Ainsi, dans l'étude réalisée par Bayarri *et al.* (2014), les complexes intermoléculaires formés entre le lysozyme et une pectine faiblement méthylée à pH 7 ont été caractérisés par une forme sphérique et une charge négative globale ce qui suggère que les molécules de lysozyme se trouvaient dans un réseau formé par les chaînes de pectine. La localisation du lysozyme à l'intérieur du réseau pectique peut s'expliquer par la masse moléculaire de la pectine (~ 190 kDa) qui est beaucoup plus élevée que celle du lysozyme (14,3 kDa).

Les interactions entre les deux types de biopolymères peuvent être aussi influencées par la rigidité de la chaîne du polysaccharide. En effet, la rigidité de la chaîne du polysaccharide contribue à la formation de charges au niveau de cette chaîne à travers le changement de la densité des groupements chargés ou par la dépendance de la dissociation et de la protonation des groupements chargés du pH. La liaison des protéines avec les chaînes de polysaccharides diminue avec la rigidité de la chaîne à cause de l'entropie de changement de la conformation du polysaccharide (Li & Huang, 2015).

### **I.1.5.3. Le pH du milieu**

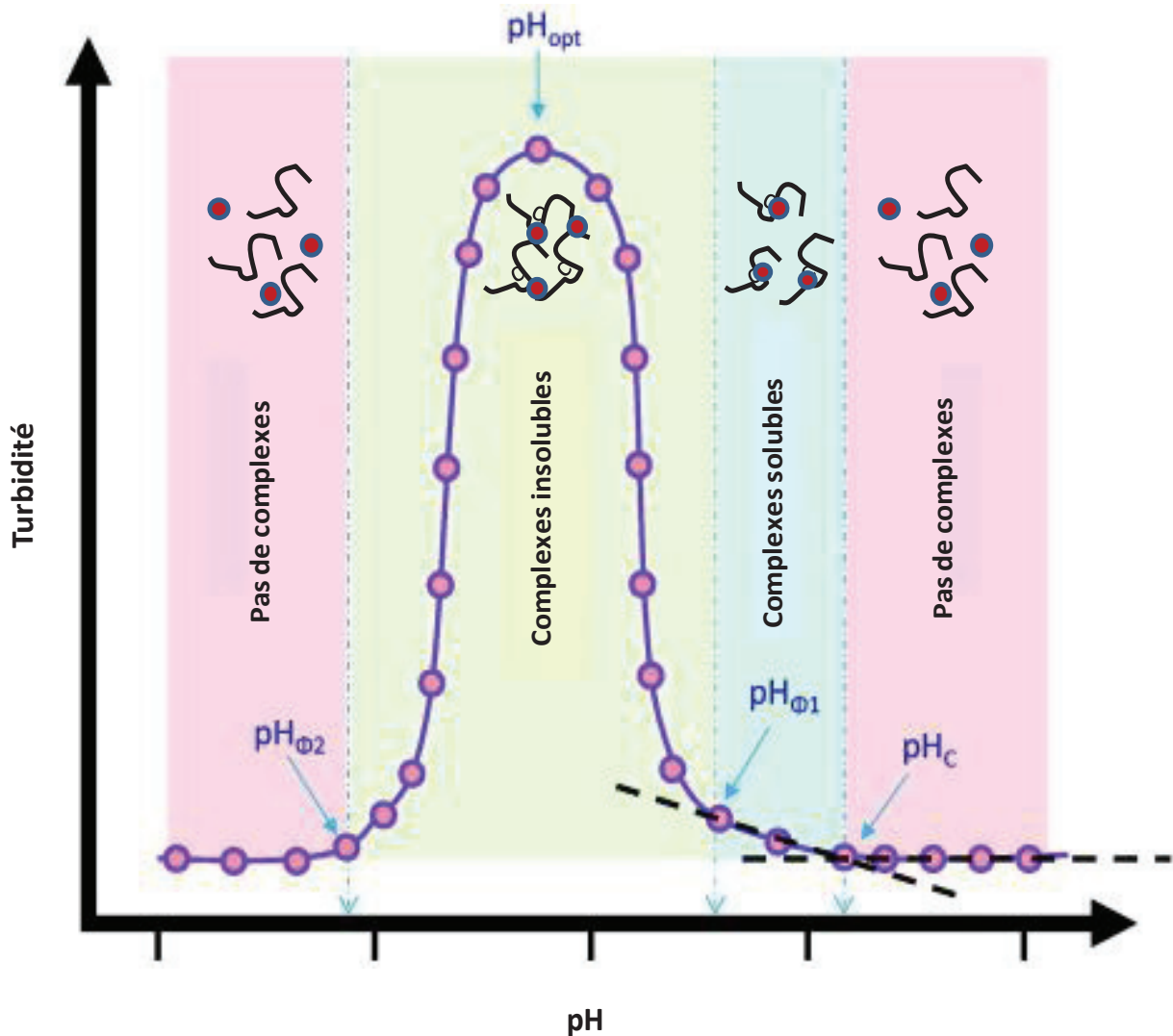
Le pH affecte la densité de charge des biopolymères présents en solution et l'amplitude des interactions électrostatiques entre eux mais peut également entraîner des transitions structurales au niveau des protéines et des polysaccharides. Il agit sur le degré d'ionisation des groupements portés par le polysaccharide ou les acides aminés constituant la chaîne latérale de la protéine et par conséquent il influence la charge des deux biopolymères. Ce paramètre définit la condition au niveau de laquelle les deux biopolymères portent des charges nettes similaires

ou opposées, selon le  $pK_a$  du polysaccharide et le  $pI$  de la protéine. Le pH du milieu est l'un des paramètres clés pour la formation de complexes stabilisés par interactions électrostatiques entre les protéines et les polysaccharides.

Lorsque la protéine est mélangée avec un polysaccharide anionique, à un pH supérieur au  $pI$  de la protéine, le système est co-soluble. La diminution du pH jusqu'à une valeur comprise entre le  $pK_a$  du polysaccharide et le  $pI$  de la protéine entraîne l'apparition d'interactions électrostatiques entre les deux biopolymères du fait des charges opposées favorisant la formation de complexes solubles ou insolubles (Dong *et al.*, 2015). Dans le cas d'un polysaccharide anionique et lorsque la valeur du pH est élevée, les charges anioniques portées par le polysaccharide sont importantes et donc la quantité en protéines nécessaires pour compenser ces charges est élevée. Une baisse du pH entraîne une diminution des charges négatives portées par le polysaccharide (en se rapprochant de son  $pK_a$ ) et une augmentation des charges positives portées par les protéines (surtout si leur  $pI$  est élevé) et donc moins de molécules de protéines seront alors nécessaires pour compenser les charges négatives du polysaccharide (Dong *et al.*, 2013). Dans des conditions acides, la complexation est défavorisée jusqu'à dissolution complète des complexes formés puisque les groupements actifs du polysaccharide deviennent protonés (Da S. Gulão *et al.*, 2014). Une augmentation importante du pH (au-delà du  $pI$  de la protéine) peut aussi favoriser la dissociation des complexes électrostatiques ou la diminution du nombre de ces complexes. Cette dissociation accompagnée des interactions répulsives déjà existantes augmenterait la distance spatiale entre la protéine et le polysaccharide défavorisant ainsi les liaisons hydrogènes (Wang *et al.*, 2015).

Au sein des mélanges protéines/polysaccharides, des transitions peuvent être induites par le pH. En effet, le phénomène de coacervation complexe entre une protéine et un polysaccharide portant des charges opposées est décrit par trois valeurs de pH critiques ( $pH_c$ ,  $pH_\phi$ , et  $pH_{opt}$ ) (Figure I.11).





**Figure I.11.** Diagramme schématisé des transitions induites par le pH après une titration acide ou basique dans des systèmes de biopolymères (modification de la charge) formant des coacervats (le diagramme indique les valeurs de pH caractéristiques relatives aux transitions conformationnelles et aux associations/dissociations intermoléculaires) (d'après [Moschakis & Biliaderis, 2017](#))

Le  $pH_c$  (pH correspondant au premier changement au niveau de la pente) est relié à l'apparition de la formation de complexes solubles et dépend uniquement de la force ionique et non pas des concentrations des macropolyions, ni de leur poids moléculaire ([Mattison et al., 1995](#)). Il a lieu à des pH proches du point isoélectrique des protéines impliquées. Au-delà du  $pH_c$ , les biopolymères n'interagissent pas ensemble et il n'y a pas de formation de complexes. Un autre pH important est le  $pH_{01}$  correspondant à la valeur de pH au niveau de laquelle des coacervats insolubles sont formés ([Weinbreck et al., 2004a](#)). A mesure que la titration progresse, la turbidité augmente rapidement et une séparation de phase macroscopique a lieu. La densité

optique atteint une valeur maximale à une certaine valeur de pH ( $\text{pH}_{\text{opt}}$ ), au niveau de laquelle la neutralisation des charges a lieu (les charges nettes portées par les deux molécules sont opposées) entre les biopolymères (une coacervation maximale est observée) (Weinbreck *et al.*, 2004b).

En baissant d'avantage le pH, les forces attractives associatives deviennent plus faibles à l'intérieur des structures des coacervats à cause de la diminution des charges au niveau du polysaccharide (le pH se rapproche du  $\text{pK}_a$ ). Dans des conditions acides (au dessous du  $\text{pK}_a$  du polysaccharide), le degré d'ionisation devient faible, le polysaccharide ne portant plus de charges, ce qui entraîne une diminution des attractions électrostatiques et une dissociation des coacervats formés ( $\text{pH}_{\phi 2}$ ). Dans certains complexes, d'autres forces attractives comme les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes ou les forces de van der Waals peuvent exister empêchant une désintégration totale des complexes (McClements, 2006 ; Bosnea *et al.*, 2014).

#### **I.1.5.4. La force ionique**

Le nombre d'ions présents dans un système de biopolymères est un paramètre important qui influence la coacervation complexe. Lors de la complexation entre les molécules, le gain entropique du mélange est favorisé par la libération de contre-ions. Toutefois, une augmentation de la concentration en sel produit l'effet inverse (en diminuant ce gain entropique) à travers l'entrée en compétition des ions présents avec les macromolécules (neutralisation des charges portées par les molécules par les ions) pouvant aller jusqu'à supprimer la coacervation complexe. De plus, les contre-ions associés aux biopolymères avant la dissolution ne peuvent pas être libérés à de fortes concentrations en sel. La complexation peut être exothermique ou endothermique à des concentrations en sel faibles ou élevées (Laugel *et al.*, 2006). L'addition d'une quantité optimale de sel peut être requise afin de former des complexes entre les deux types de polymères bien que d'une manière générale, il a été rapporté que le sel a un effet dissociant sur les complexes électrostatiques. De plus, le pH au niveau duquel des complexes électrostatiques sont formés (séparation de phase) serait dépendant de la force ionique du milieu (Antonov *et al.*, 2015).

La compétition entre les attractions électrostatiques qui s'exercent à courte distance et les répulsions électrostatiques qui s'établissent à longue distance attribuée à la concentration en sel joue un rôle dans la formation et l'agrégation des complexes protéines/polysaccharides (Li & Huang, 2015). Lorsque la concentration en sel est faible, la coacervation est favorisée puisque

les attractions et les répulsions électrostatiques ne sont pas réduites. Le nombre de charges portées par les biopolymères est suffisant pour que les interactions électrostatiques aient lieu. Toutefois, l'agrégation des complexes est limitée et a lieu à une petite échelle (Li & Huang, 2015). De plus, une faible concentration en sel peut favoriser la solubilisation des polymères présents. Un effet de 'salting-in' peut modifier la conformation de la molécule à travers l'exposition de certains groupements réactifs par la présence d'ions dans la solution ce qui contribue à favoriser l'interaction avec le polysaccharide. Ceci a été mis en évidence pour le système gélatine/gomme d'acacia au niveau duquel une coacervation maximale a été obtenue pour une concentration en sel de 10 mM alors que ce n'était pas le cas lorsque la force ionique était nulle. A une concentration en sel très faible, la coacervation est défavorisée et une précipitation des molécules a lieu plutôt qu'une coacervation à cause de la forte densité de charges des molécules de gélatine dans ces conditions (Burgess, 1990). Des concentrations en sel intermédiaires peuvent supprimer les répulsions électrostatiques entre les complexes. Les interactions électrostatiques, quant à elles, demeurent inchangées ce qui favoriserait l'agrégation des complexes (qui se fait à grande échelle) (Li & Huang, 2015). En revanche, une forte concentration en sel (au-delà d'une certaine valeur critique), entraîne une baisse de la solubilité des polymères, empêche leur association et réduit le rendement de coacervation à cause de la diminution des attractions et des répulsions électrostatiques puisqu'il y a un masquage d'une partie des charges par les ions (Chai *et al.*, 2014 ; Dong *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2015 ; Li & Huang, 2015 ; Li *et al.*, 2017). Récemment, il a été montré que dans le cas du système lysozyme/pectine, l'addition de calcium (100 mM) a pu favoriser l'agrégation des particules formées de complexes entre la protéine et le polysaccharide avec une augmentation de la turbidité et de la viscosité du mélange puisque d'une part le calcium représenterait un compétiteur pour les sites cationiques de la protéine afin de se lier avec les groupements anioniques du polysaccharide et former ainsi des ponts calciques et d'autre part il y a une suppression des répulsions électrostatiques s'exerçant entre les complexes (Bayarri *et al.*, 2014). Les répulsions électrostatiques permettent de rendre les chaînes de biopolymères plus étendues et dans le cas où elles sont diminuées suite à l'ajout de sel, les chaînes sont susceptibles de devenir plus contractées (Wang *et al.*, 2015).

Quand un système est formé par des interactions électrostatiques, la force ionique peut inhiber ces liaisons, toutefois, d'autres interactions peuvent également être influencées. Il a été rapporté que la contribution des interactions hydrophobes devient plus importante quand la concentration en sel augmente (Dong *et al.*, 2015). De plus, une augmentation de la force

ionique affecte la qualité du solvant et peut ainsi diminuer l'hydratation des deux biopolymères et promouvoir les liaisons hydrogènes intermoléculaires entre eux (Wang *et al.*, 2015).

#### **I.1.5.5. Le ratio protéine/polysaccharide**

Le phénomène de séparation de phase par la coacervation complexe est influencé par le ratio massique protéine/polysaccharide (Pr/Ps). Ce paramètre permet de contrôler l'équilibre des charges entre les deux biopolymères et détermine le nombre de molécules de protéines pouvant être liées à une molécule de polysaccharide. Pour chaque système de polymères s'associant essentiellement par interactions électrostatiques, un ratio protéine/polysaccharide optimal existe dans une condition donnée (pH, force ionique) correspondant à une quantité électriquement équivalente de chaque polymère et au niveau duquel le rendement de coacervation est maximal (Burgess & Carless, 1984 ; Weinbreck *et al.*, 2004a,b).

Le ratio aurait un effet sur la formation, la composition, le nombre et la taille des complexes. Si un des deux polymères est en excès (la protéine ou le polysaccharide), la formation de complexes solubles est favorisée à cause de la présence de charges non neutralisées. Lorsque la concentration en protéines est très inférieure à celle du polysaccharide, une couche du polysaccharide peut se former autour des protéines assurant ainsi une stabilisation électrostatique et stérique. Si la concentration du polysaccharide dépasse une certaine valeur critique, la coacervation complexe est supprimée à cause de la présence des chaînes du polysaccharide non neutralisées. Dans le cas où la concentration en protéines est supérieure à celle du polysaccharide, les chaînes de polysaccharide peuvent être neutralisées et saturées. Un excès en protéines peut inhiber une éventuelle agrégation des complexes (Li & Huang, 2015).

L'influence du ratio de mélange sur la formation de complexes a particulièrement été mise en évidence dans le cas du mélange lysozyme/pectine (Bayarri *et al.*, 2014). Dans cette étude, il a été indiqué que l'ajout de quantités croissantes en pectine à une solution contenant une concentration fixe en lysozyme à pH 7 peut être corrélé à une augmentation de la taille des complexes intramoléculaires formés. L'agrégation des complexes individuels serait due à un phénomène de pontage électrostatique entre les sites cationiques du lysozyme demeurant libres à la surface des complexes et les chaînes de pectine chargées négativement. La phase de coacervats peut être considérée comme un réseau de complexes interpolymériques qui sont stabilisés par une association avec les molécules de protéines. Des concentrations élevées en pectine ont favorisé la dissociation des complexes formés à cause de l'importance des

répulsions électrostatiques s'exerçant entre les chaînes de pectine (Bayarri *et al.*, 2014). Dans une autre étude menée sur le système gélatine/ $\kappa$ -carraghénane, il a été indiqué que la formation de complexes intermoléculaires a été favorisée suite à l'augmentation du ratio qui aurait favorisé une plus grande surface de contact entre les deux biopolymères et aurait ainsi facilité l'établissement de liaisons électrostatiques et par pont hydrogène. Cependant, en diminuant le ratio, les répulsions électrostatiques étaient défavorisées (Wang *et al.*, 2015).

#### **I.1.5.6. La concentration**

La concentration totale en polymères est un paramètre important qui doit être considéré dans le phénomène de coacervation complexe. Lorsque la concentration en polymères est faible, des complexes (plutôt des complexes solubles) sont formés et peuvent rester suspendus en solution. A une concentration élevée en polymères, c'est l'agrégation des complexes qui est plutôt favorisée et l'aspect des coacervats formés peut ressembler à un gel selon la nature des interactions s'exerçant entre les particules de complexes neutralisées (Li & Huang, 2015). Suite à une étude réalisée sur une série de complexes protéines/polysaccharides, Tolstoguzov (1986) a conclu que la suppression de la coacervation complexe a eu lieu à une concentration totale en biopolymères au voisinage de 4% (p/p). En effet, cette concentration critique est très dépendante du système. Par exemple, dans l'étude réalisée par Schmitt *et al.* (2000), il a été montré qu'une concentration critique de 4,5 % (p/p) a été nécessaire pour supprimer la coacervation complexe au niveau du système  $\beta$ -lactoglobuline/gomme arabique à pH 4,2. Toutefois, au sein d'un système similaire, il a été montré que des complexes formés entre les protéines de lactosérum et la gomme arabique peuvent être observés jusqu'à 15 % (p/p) à pH 3,5 (Weinbreck *et al.*, 2003). Ces différences expérimentales peuvent s'expliquer par le gain entropique électrostatique qui a été avantageux à 15 % (p/p) à pH 3,5 mais pas à 4,5 % (p/p) et à un pH de 4,2. La suppression de la coacervation complexe à de fortes concentrations en biopolymères peut être expliquée par la libération des contre-ions dans la solution. Ces contre-ions peuvent à leur tour masquer les charges portées par les molécules entraînant une suppression de la coacervation et favorisant la solubilisation des complexes (Weinbreck *et al.*, 2003). Au-delà d'une certaine valeur critique, le système est sujet à une séparation de phase ségrégative (incompatibilité thermodynamique) et non pas associative à cause de la compétition des macromolécules pour le solvant.

#### **I.1.5.7. La température**

La séparation de phase associative est favorisée lorsque la température baisse. D'une manière générale, des températures élevées augmentent les fluctuations thermiques ce qui

entraîne une réduction de la stabilité des complexes. Toutefois, dans certains cas, un traitement thermique des mélanges macromoléculaires après la complexation peut améliorer la stabilité des complexes formés par la création de nouvelles zones de jonction (Li & Huang, 2015).

La température est un facteur qui peut influencer à la fois la conformation des biopolymères mais aussi les interactions non-Colombiennes s'exerçant entre eux. Par exemple, les liaisons hydrogènes sont promues à des températures basses. Suite à une hausse de la température, les liaisons électrostatiques ne sont plus les interactions majoritaires laissant place aux interactions covalentes ou hydrophobes étant donné que la chaleur induit des changements structuraux au niveau des biopolymères (les protéines en particulier) et favorise l'exposition de plus de sites d'interactions (Liu *et al.*, 2010). Il a été montré que la complexation de la gélatine avec le  $\kappa$ -carraghénane a été améliorée lorsque la protéine a subi des changements conformationnels suite à une hausse de la température (Fang *et al.*, 2006).

Il est à noter que certains polysaccharides comme les carraghénanes peuvent subir des modifications structurales suite à des changements de température en passant par des états plus ou moins ordonnés (Campo *et al.*, 2009). Il faut aussi tenir compte de la température de dénaturation de la protéine puisque celle-ci affecte sa conformation moléculaire et donc les interactions entre les biopolymères. L'utilisation d'agrégats de protéines obtenus suite à un traitement thermique a été étudiée afin de générer des microparticules fonctionnelles suite à la formation de complexes avec différents polysaccharides anioniques (Li & Huang, 2015). Chanasattru *et al.* (2009) ont montré qu'à température ambiante, des complexes électrostatiques ont été formés entre la  $\beta$ -lactoglobuline et la pectine et que, suite à une augmentation de température, les molécules de protéines ont été dénaturées et ont donc formé des agrégats. Les molécules de pectine se sont par la suite liées aux particules de protéines (après refroidissement) afin de former une couche autour des agrégats de protéines.

#### **I.1.5.8. La pression**

La pression est un facteur qui influence la structure des biopolymères mais aussi le phénomène et le rendement de coacervation. Ce paramètre est important puisqu'il est couramment utilisé pour le traitement des denrées alimentaires. Ce type de traitement comprend la pression hydrostatique dans une chambre haute pression et la pression mécanique imposée dans certains appareils comme les homogénéisateurs. Cette dernière procédure combine des phénomènes de pression, de turbulence et de cisaillement (Schmitt *et al.*, 1998).

Il est possible d'induire la formation de complexes en appliquant une haute pression hydrostatique afin de dénaturer les protéines qui peuvent ainsi exposer plus de sites réactifs et établir des liaisons électrostatiques avec le polysaccharide. Ceci a été mis en évidence dans le cas de systèmes formés d'ovalbumine et de polysaccharides sulfatés tels que le sulfate de dextrane ou le carraghénane (Galazka *et al.*, 1999).

#### **I.1.5.9. Le temps**

Au niveau des coacervats, il a été montré que les chaînes de biopolymères sont caractérisées par une mobilité plus réduite que dans une solution de biopolymères diluée. Toutefois, les mouvements des polymères individuels dans la phase de coacervats seraient indépendants (Weinbreck *et al.*, 2004c). Les coacervats représentent donc un système dynamique hautement adaptable au niveau duquel des réarrangements moléculaires peuvent avoir lieu au cours du temps (bien que ces réarrangements aient lieu à une vitesse faible) afin de minimiser l'énergie libre du système jusqu'à avoir des structures bien définies. La composition et les propriétés des coacervats peuvent donc changer en fonction du temps (Weinbreck *et al.*, 2004c).

#### **I.1.6. Les techniques de caractérisation des interactions protéines/polysaccharides**

De nombreuses approches expérimentales ont été utilisées afin de caractériser à l'échelle moléculaire les interactions entre les protéines et les polysaccharides ainsi que les structures formées et d'étudier sur le plan macroscopique le comportement de phase ainsi que les propriétés des complexes formés. Selon les caractéristiques qu'on cherche à étudier, on peut les catégoriser en techniques basées sur la microscopie, la diffusion, la spectroscopie, la calorimétrie, la rhéologie ou encore la détection moléculaire. Bien qu'un bon nombre de techniques de haute résolution existe, plusieurs approches hybrides en utilisant des techniques complémentaires ont été rapportées dans la littérature. Les différentes techniques qui sont souvent utilisées pour la caractérisation des complexes protéines/polysaccharides sont listées ci-dessous.

##### **I.1.6.1. Les techniques microscopiques**

Les méthodes microscopiques permettent d'étudier la nature, la structure et la morphologie des complexes ou des agrégats formés entre les protéines et les polysaccharides. Ces techniques permettent aussi de mieux définir l'état de complexation entre les deux biopolymères ou l'état d'agrégation des complexes. Toutefois, un des principaux inconvénients de ces méthodes est que le produit visualisé ou 'capturé' par l'objectif peut ne pas être

représentatif de la totalité de l'échantillon. La méthode de préparation de l'échantillon peut aussi influencer significativement la morphologie observée. Mis à part la nature de l'échantillon à analyser, il faut aussi prendre en considération le contraste de cet échantillon afin de choisir l'instrument le plus adéquat (Li & Huang, 2015). La méthode la plus courante est la microscopie optique qui a servi par exemple pour étudier la structure des complexes formés entre les isolats de protéines de lactosérum et la gomme de lin (Liu *et al.*, 2017b). La microscopie confocale à balayage laser présente plusieurs avantages comme l'optimisation de la profondeur du champ et l'élimination du bruit de fond. Elle permet d'obtenir des images tridimensionnelles en visualisant différentes sections à travers l'objectif et présente une bonne technique pour l'étude des surfaces rugueuses (Cooper *et al.*, 2005). Elle a été utilisée pour caractériser les complexes formés entre la  $\beta$ -lactoglobuline et la gomme d'acacia (Schmitt *et al.*, 2001). La microscopie à fluorescence a servi pour visualiser les complexes obtenus entre le caséinate de sodium et la pectine et qui ont été marqués par la sonde bleu du Nil (Eghbal *et al.*, 2016). La microscopie électronique à balayage a également été employée pour mieux comprendre la nature et la morphologie des coacervats formés. Celle-ci est caractérisée par un pouvoir de résolution important et permet de réaliser des grossissements très élevés. En utilisant cette technique, il a ainsi été possible d'étudier la surface de films obtenus par voie solvant (Eghbal *et al.*, 2016; Eghbal *et al.*, 2017) ou bien la morphologie de surface, la forme et la taille des microcapsules formées par séchage par atomisation à base de complexes protéines/polysaccharides (Timilsena *et al.*, 2016). La microscopie électronique à transmission a également été employée pour caractériser les coacervats protéines/ polysaccharides dans le but d'encapsuler différents ingrédients (Devi *et al.*, 2017). La microscopie à force atomique permet de définir la topographie de surface d'un échantillon à travers des images 3D. De nombreux systèmes de complexes ont été étudiés grâce à cette technique comme les protéines et les polysaccharides de soja, la gélatine de poisson et la pectine ou encore le lysozyme et l'héparine (Chen *et al.*, 2016 ; Tian *et al.*, 2016 ; Huang *et al.*, 2017). La microscopie à contraste de phase a également été employée pour étudier les complexes formés entre la  $\beta$ -lactoglobuline et la pectine (Girard *et al.*, 2004).

#### **I.1.6.2. Les techniques basées sur le principe de la diffusion**

La diffusion dynamique de la lumière permet de donner le profil de distribution de taille des complexes protéines/polysaccharides. Le calcul du diamètre des particules et de la taille moyenne se fait par la mesure de la diffusion des particules due au mouvement brownien. Le coefficient de diffusion calculé est relié au rayon hydrodynamique par l'équation de Stokes-



Einstein. Le rayon hydrodynamique est obtenu à partir de la position du pic de la courbe représentant la distribution des diamètres hydrodynamiques des complexes formés. Avec cette méthode, il est possible d'analyser des échantillons contenant des agrégats de protéines ou ayant un large spectre de masses. Toutefois, une turbidité élevée de l'échantillon ou la présence d'impuretés peut influencer la mesure (Li & Huang, 2015). Des complexes  $\beta$ -lactoglobuline/pectine, albumine de sérum bovin/alginat de sodium ou protéines de lactosérum/pectine ont été étudiés par cette méthode (Sperber *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2009 ; Wagoner & Foegeding, 2017).

La diffraction laser est une technique qui sert à fournir des informations sur la taille des particules en se basant sur le principe de la diffraction de la lumière (angle de diffusion). Il s'agit d'une méthode complémentaire à la technique de diffusion dynamique de la lumière puisque chacune favorise un intervalle de taille donné. La distribution de taille des particules est représentée par le  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$  et le volume moyen ( $D_{[4,3]}$ ). Le  $D_{[4,3]}$  est un volume moyen et peut donc être faussé par un petit nombre de grosses particules, étant donné qu'elles occupent un volume plus important que les petites particules. Par contre, les valeurs de  $D_{50}$  et  $D_{90}$  ne sont pas faussées par la présence de grosses particules. La diffusion statique de la lumière permet de donner la masse moléculaire d'une macromolécule (une protéine ou un polymère en solution) ainsi que le rayon de gyration des complexes formés et a servi pour étudier les complexes  $\beta$ -lactoglobuline/pectine et  $\beta$ -lactoglobuline/gomme d'acacia (Girard *et al.*, 2004 ; Sanchez *et al.*, 2006).

La structure de la phase de coacervats a été analysée en utilisant la technique de diffusion des rayons X aux petits angles. De même, la technique de diffusion des neutrons aux petits angles a été employée aussi afin d'étudier la forme, la taille et l'organisation interne des complexes protéines/polysaccharides ainsi que leur contenu en eau (Devi *et al.*, 2017).

La diffusion électrophorétique de la lumière est une technique qui se base sur la mesure de la mobilité électrophorétique et le calcul du potentiel zêta (charge au niveau de la surface des particules). L'importance des facteurs environnementaux (principalement du pH et de la force ionique) est à considérer particulièrement étant donné qu'ils ont un impact significatif sur la charge à la surface des particules étudiées. Avec cette technique, il est possible de déterminer le point isoélectrique de la protéine et sa charge ainsi que celle du polysaccharide et de définir la gamme de pH au niveau de laquelle une protéine et un polysaccharide peuvent interagir par des interactions électrostatiques (Eghbal *et al.*, 2016).

### **I.1.6.3. Les techniques spectroscopiques**

La turbidité d'un mélange peut être mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible ou un turbidimètre. La turbidimétrie est une technique, simple et reproductible, qui offre la possibilité d'étudier le phénomène de séparation de phase comportant les phases de complexation et d'agrégation (Li & Huang, 2015). Elle permet d'avoir une idée sur la transparence du système et de révéler la vitesse d'agrégation ainsi que le nombre et la taille des agrégats formés. Les conditions optimales de pH et de ratio protéine/polysaccharide afin de former des coacervats sont souvent reportées en évaluant la turbidité. La turbidité est également utilisée afin d'étudier les transitions induites par le pH et de déterminer les trois valeurs de pH critiques ( $pH_c$ ,  $pH_\phi$  et  $pH_{opt}$ ) (Figure I.11). Généralement, la turbidité est maximale lorsque l'interaction entre les biopolymères ayant des charges opposées est maximale (Devi *et al.*, 2017). Cette technique de mesure est toutefois non qualitative et révèle moins d'informations que le diagramme de phase (Li & Huang, 2015).

La spectrophotométrie UV-Visible permet d'étudier les modifications au niveau du microenvironnement des acides aminés aromatiques présents dans la structure de nombreuses protéines (intensité des spectres et décalage de la longueur d'onde correspondant à l'intensité maximale du pic), d'étudier la formation des complexes et d'avoir une meilleure compréhension des interactions entre les protéines et les polysaccharides. La complexation entre le lysozyme et le sulfate de dextrane ainsi que les changements structuraux au niveau de la protéine ont été étudiés par cette méthode (Antonov *et al.*, 2015). Toutefois, l'utilisation de cette méthode requiert d'autres techniques complémentaires afin d'obtenir des conclusions fondées (IR, dichroïsme circulaire, ...). Il faut aussi contrôler la présence d'impuretés pouvant absorber à certaines longueurs d'ondes et éviter les systèmes complexes ayant une faible transmission (Li & Huang, 2015).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'analyser les pics correspondant à la protéine ou au polysaccharide, de déceler les décalages de nombre d'onde pouvant avoir lieu au niveau de ces pics (« shifts »), d'identifier les nouveaux pics et de mieux comprendre la nature des interactions intra- ou inter-moléculaires intervenant dans l'interaction. Il s'agit d'une bonne méthode pour l'étude de la structure secondaire des protéines ou pour la détermination du pourcentage en structures secondaires (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , ...) par dérivation des spectres. De nombreux travaux ont utilisé cette technique afin d'étudier le phénomène de complexation entre des protéines et des polysaccharides et afin de mieux caractériser les interactions impliquées (Zhao *et al.*, 2009 ; Mohajer *et al.*, 2017). Bien que cette méthode soit

caractérisée par sa spécificité, il serait plus judicieux d'utiliser d'autres techniques complémentaires.

La fluorescence est une méthode sensible qui a été utilisée pour étudier les changements structuraux au niveau des protéines suite à leur complexation. Lorsqu'une protéine contient des acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine ou tyrosine) au niveau de sa structure, il est possible par analyse des spectres correspondants à la fluorescence intrinsèque de ces acides aminés (spécialement les résidus tryptophane) et des décalages des longueurs d'ondes correspondant à l'intensité maximale de fluorescence (« shift »), de mieux comprendre le phénomène de complexation, d'étudier la structure tertiaire de la protéine et de déceler le changement au niveau de l'environnement des acides aminés aromatiques (plus apolaires ou polaires) (Antonov *et al.*, 2015). La fluorescence extrinsèque nécessite l'utilisation de sondes fluorescentes et permet aussi de mieux comprendre le phénomène de complexation mais aussi d'étudier les modifications structurales au niveau des protéines (exemple : hydrophobicité de surface). Toutefois, l'utilisation de marqueurs fluorescents peut affecter la structure des biopolymères présents et les interactions existantes au sein des complexes (Li & Huang, 2015). La fluorescence extrinsèque a été utilisée dans le système protéines de lait/carboxyméthylcellulose pour mesurer l'hydrophobicité de surface à l'aide de la sonde 1-AnilinoNaphthalène-8-Sulfonate (ANS) (Cheng *et al.*, 2015). Les auteurs ont attribué la diminution de l'hydrophobicité de surface suite à l'introduction de concentrations croissantes en carboxyméthylcellulose aux interactions attractives entre les deux types de biopolymères entraînant des réarrangements ou des modifications dynamiques au niveau des protéines. La fluorescence a été également utilisée pour étudier l'adsorption des protéines marquées ainsi que la dynamique d'adsorption de ces protéines au niveau des surfaces colloïdales et planaires (Cooper *et al.*, 2005 ; Li & Huang, 2015).

La méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment est utilisée pour étudier la mobilité locale de molécules marquées. Lorsqu'un échantillon est formé d'une population fluorescente homogène, il est possible d'inhiber d'une manière irréversible la fluorescence dans une zone donnée par photoblanchiment en utilisant un laser. Ceci permet d'obtenir une population fluorescente et une autre qui ne l'est pas. Dans le cas où il y a un déplacement des molécules dans le milieu, on peut avoir une redistribution des deux populations entre la zone excitée et la zone fluorescente adjacente. Cette méthode a été utilisée afin d'étudier la diffusivité de protéines marquées adsorbées ou incorporées dans des couches de polysaccharides ou formant des coacervats avec des polysaccharides. Videcoq *et al.* (2013) ont

étudié la diffusion de deux enzymes pectinolytiques de différentes origines (des méthylestérases) dans des solutions et des gels physiques à base de pectine en utilisant la redistribution de fluorescence après photoblanchiment. Dans cette étude, cette technique a été couplée à une autre méthode complémentaire, la spectroscopie de corrélation de fluorescence afin d'analyser la diffusion des deux enzymes. [Weinbreck \(2004c\)](#) a étudié les propriétés structurales de coacervats formés entre des protéines de lactosérum et la gomme arabique en utilisant également cette technique. Ainsi, la diffusion des deux polymères marqués par des sondes fluorescentes dans la phase de coacervats a été étudiée en fonction du pH. Le temps de redistribution de fluorescence étant relié à l'inverse du coefficient de diffusion a été évalué à partir des mesures.

Le dichroïsme circulaire est une technique qui permet d'étudier les changements au niveau de la structure secondaire des protéines au sein des complexes et la nature des interactions moléculaires mises en jeu. Il est intéressant de coupler cette technique avec d'autres méthodes (spectroscopie FTIR, fluorescence,...) afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la complexation.

La spectroscopie Raman est une technique spectroscopique qui permet d'identifier les changements au niveau de la structure secondaire de la protéine (détermination du contenu en structures secondaires de la protéine). Cette méthode a servi pour étudier les changements conformationnels de la gliadine et des protéines globulaires de pois suite à la formation de coacervats avec la gomme arabique ([Chourpa et al., 2006](#)). Les bandes relatives aux coacervats ainsi que la structure secondaire des protéines peuvent être reportées en analysant les intensités des spectres Raman. La spectroscopie par ondes diffuses permet de mesurer le mouvement des particules à l'échelle microscopique. Elle est utilisée pour l'étude de la stabilité des dispersions de coacervats formés entre des protéines et des polysaccharides en fonction du temps. Cette technique considère la diffusion multiple de la lumière dans un milieu contenant des particules. Dans cette méthode, le transport de la lumière est supposé être de nature diffusif et il est capable de suivre plusieurs trajectoires dans le milieu ([Devi et al., 2017](#)).

#### **I.1.6.4. Les techniques calorimétriques**

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permet de mesurer les différences d'échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence au cours d'une variation contrôlée de la température, d'étudier les paramètres thermodynamiques qui leur sont associés. Elle permet ainsi d'examiner la stabilité thermique des protéines au sein des complexes. Il a été

montré que l'enthalpie de dénaturation de la gélatine au sein des coacervats formés avec la carboxyméthylcellulose (correspondant à la quantité d'énergie requise pour dégrader la structure native de la protéine) a augmenté de 4,5 J.g<sup>-1</sup> à 236 J.g<sup>-1</sup> pour la gélatine seule et pour la gélatine complexée, respectivement, indiquant que la protéine complexée requiert une énergie thermique plus élevée que lorsqu'elle est non complexée ce qui signifie que la complexation lui a conféré une stabilité thermique (Duhoranimana *et al.*, 2017).

La titration calorimétrique isotherme (ITC) est une technique permettant d'étudier l'interaction entre deux espèces en titrant la solution correspondant à l'une de ces espèces dans l'autre et en mesurant la chaleur dégagée. Les mesures calorimétriques peuvent être endothermiques ou exothermiques indiquant les interactions entre la protéine et le polysaccharide. Elle représente une méthode puissante afin de collecter les paramètres thermodynamiques associés aux interactions moléculaires (constante d'affinité, la stœchiométrie des sites d'interaction, l'énergie libre ( $\Delta G$ ), l'entropie ( $\Delta H$ ) et l'enthalpie ( $\Delta S$ )). La sensibilité de cette méthode est limitée si l'agrégation des molécules a un effet exothermique/endothermique faible. Il faut aussi prendre en considération la méthode de préparation de l'échantillon et il est préférable d'utiliser un échantillon avec une pureté élevée (Li & Huang, 2015).

#### **I.1.6.5. La microbalance à cristal de quartz**

La microbalance à cristal de quartz consiste en une plaque fine de quartz. Le changement de la masse dû à l'adsorption d'une couche à sa surface entraîne des changements au niveau de la fréquence de résonance. Elle permet de mesurer *in situ* la masse de couches fines adsorbées à la surface ainsi que les propriétés visco-élastiques de ce dépôt (Cooper *et al.*, 2005). La formation d'un film par la déposition alternée de polylysine et d'acide hyaluronique a été étudiée en utilisant cette technique (Picart *et al.*, 2001). Les mesures à différentes fréquences ont permis de mettre en évidence un comportement viscoélastique des films.

#### **I.1.6.6. La résonance plasmonique de surface**

Cette technique est connue pour son utilisation afin de mesurer la liaison d'une molécule immobilisée sur une surface métallique avec une autre molécule, en solution, passée sur cette surface par écoulement. La liaison entre les deux molécules entraîne un changement au niveau de l'indice de réfraction de la lumière réfléchi à la surface. Il s'agit d'une méthode qui permet d'étudier les interactions moléculaires intervenant dans la formation de complexes. L'avantage de cette technique par rapport aux essais classiques en phase solide est que la formation et la

décomposition des complexes sont suivies en temps réel ce qui offre la possibilité de déterminer le mécanisme d'interaction. L'inconvénient est que la détection est limitée lorsque l'interaction entre les deux molécules étudiées est faible (Li & Huang, 2015). La résonance plasmonique de surface a été utilisée afin d'étudier les interactions entre l'héparine et les protéines du système du complément (groupe de 35 protéines de sérum) et afin de déterminer les constantes d'affinité correspondantes (Yu *et al.*, 2005).

#### **I.1.6.7. La résonance magnétique nucléaire**

Cette technique permet d'étudier la structure des complexes protéines/polysaccharides dans les solutions aqueuses et d'identifier les types d'interactions mises en jeu ainsi que les sites d'interactions intervenant dans la formation des complexes (Devi *et al.*, 2017 ; Li & Huang, 2015). Cette technique se base sur la détermination de la mobilité des molécules d'eau par la mesure du temps de relaxation. L'interaction électrostatique au niveau des complexes est importante dans le mouvement des molécules d'eau (Devi *et al.*, 2017). Cette technique nécessite un échantillon avec une pureté élevée et une certaine expertise pour l'interprétation des résultats (Li & Huang, 2015).

#### **I.1.6.8. La rhéologie**

La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement des matériaux sous l'effet d'une contrainte appliquée. Elle permet d'étudier le comportement dynamique des gels, de caractériser les propriétés viscoélastiques (viscosité et modules) et de définir les relations entre les propriétés mécaniques et structurales des coacervats (Cooper *et al.*, 2005 ; Li & Huang, 2015). Toutefois, cette méthode est très sensible aux conditions environnementales et à la pureté de l'échantillon. De plus, la plupart des complexes protéines/polysaccharides sont caractérisés par un comportement non-Newtonien (Li & Huang, 2015).

#### **I.1.7. Les applications potentielles des complexes protéines/polysaccharides**

Les complexes protéines/polysaccharides sont caractérisés par de meilleures propriétés fonctionnelles que lors de l'utilisation de chaque polymère seul. En effet, des fonctionnalités nouvelles ou améliorées peuvent être obtenues en utilisant les deux biopolymères ensemble. Les complexes qui en découlent, avec leurs propriétés uniques d'hydratation (solubilité, viscosité), de structure (taille, morphologie) et de surface (propriétés moussantes et émulsifiantes) peuvent être utilisés dans de nombreux domaines comme la purification macromoléculaire, la stabilisation des protéines, la microencapsulation et la formulation en industrie agroalimentaire (amélioration de la viscosité, agents de texture, remplacement de la

matière grasse ou de la viande) ou pour synthétiser des biomatériaux (Schmitt *et al.*, 1998). Ces complexes peuvent donc servir pour élaborer différents types de produits ainsi que pour améliorer leur qualité.

#### **I.1.7.1. Purification des protéines par précipitation sélective ou coacervation avec des polysaccharides**

L'utilisation des polysaccharides représente une méthode fiable, simple, sélective et efficace pour éliminer des protéines indésirables ou afin de purifier les protéines sans pour autant altérer leur activité biologique naturelle. La complexation sélective peut être obtenue dans les systèmes contenant des protéines et des polysaccharides en se basant sur les interactions électrostatiques attractives préférentielles entre les deux biopolymères dans certaines conditions. La sélectivité est définie comme étant la capacité de la protéine à être transférée dans la phase condensée avant une autre. Dans des conditions environnementales bien connues, un polysaccharide, de poids moléculaire élevé par rapport à celui de la protéine, chargé négativement, peut être ajouté à une solution contenant des protéines et puis suite à un ajustement du pH, la coacervation entre la protéine et le polysaccharide peut avoir lieu. Les protéines sont ensuite récupérées par centrifugation et filtration. Il a été montré que la carboxyméthylcellulose peut être utilisée afin de fractionner les protéines de lactosérum par la formation de complexes (Hansen *et al.*, 1971) et les pectines ont également été utilisées afin de récupérer les protéines de lactosérum avec un pourcentage de récupération de 90% (Serov *et al.*, 1985).

Lorsque deux protéines ont des *pI* différents, l'une pourra former des complexes avec le polysaccharide à des pH appropriés alors que l'autre non. Si les deux protéines ont des *pI* proches, la séparation sélective par coacervation peut se faire si l'une des protéines présente une meilleure affinité pour le polysaccharide que l'autre selon la distribution des charges à la surface de cette protéine. La coacervation sélective par l'acide hyaluronique a été employée afin d'isoler l'albumine de sérum bovin à partir d'un mélange contenant une autre protéine ayant un *pI* similaire (la  $\beta$ -lactoglobuline). Cette séparation a été attribuée à une meilleure affinité de l'albumine de sérum bovin pour l'acide hyaluronique que pour la  $\beta$ -lactoglobuline à cause de la présence d'un domaine concentré en groupements portant des charges positives (Du *et al.*, 2014).

### **I.1.7.2. Amélioration de la stabilité des peptides/protéines dans des complexes à base de polysaccharides**

La complexation avec les polysaccharides peut améliorer la stabilité des peptides ou des protéines à certains facteurs (température, pH, pression) pouvant induire leur dénaturation. Il a été montré que la stabilité de l' $\alpha$ -lactalbumine et de la  $\beta$ -lactoglobuline a été améliorée suite à leur complexation avec la carboxyméthylcellulose par comparaison aux protéines non complexées (Capitani *et al.*, 2007). La thermostabilité de la  $\beta$ -lactoglobuline a augmenté de 6–8 °C et celle de l' $\alpha$ -lactalbumine de 26 °C approximativement ce qui pourrait être dû à l'incorporation des molécules de protéines dans des complexes, formés essentiellement par des interactions électrostatiques. Dans une autre étude, il a été démontré qu'une meilleure stabilisation physique d'un polypeptide (la  $\epsilon$ -polylysine) a été obtenue suite à sa complexation électrostatique avec la gomme arabique à de fortes concentrations (Chang *et al.*, 2014). Une autre étude a montré que la stabilité de la lactoferrine est améliorée lorsqu'elle est sujette à des températures élevées, en présence de la gomme arabique en même proportion. La gomme arabique a formé une couche autour de la lactoferrine à cause de ses propriétés filmogènes et encapsulantes. Toutefois, lorsque la protéine était en excès, le polysaccharide était insuffisant pour masquer les molécules de lactoferrine et donc empêcher leur agrégation (Gulão *et al.*, 2014).

### **I.1.7.3. Encapsulation et libération de composés actifs**

En industrie agroalimentaire, il y a un intérêt croissant pour développer des aliments sains avec une bonne qualité nutritionnelle et sensorielle et avec une stabilité améliorée, incorporant des composés bioactifs. Le challenge pour les industriels consiste à développer des systèmes d'encapsulation sans affecter la qualité organoleptique de l'aliment ou sa durée de vie. Incorporer un composé actif dans un aliment présente de nombreux challenges puisque ce composé peut interagir chimiquement avec d'autres constituants mais aussi subir différentes conditions (oxydation, traitement thermique, humidité, acidité, lumière,...) au cours de la production, du traitement ou du stockage de l'aliment ou encore au niveau du transit gastro-intestinal. Les composés d'intérêt peuvent donc être dégradés ou perdre leur activité (Moschakis & Biliaderis, 2017).

La microencapsulation peut être définie comme étant la technologie incorporant un composé solide, liquide ou gazeux dans un second matériel (matrice ou enveloppe) afin de former des petits assemblages qui pourront d'une part protéger les molécules sensibles (arômes



ou agents bioactifs) mais également assurer une libération de ces agents à une certaine vitesse (relargage contrôlé) comme dans des matrices alimentaires dans le cas des composés antimicrobiens, dans la bouche pour les arômes ou encore dans le tractus digestif et même viser des sites spécifiques dans l'organisme humain. Cette technologie est aussi utilisée en industrie pharmaceutique (production de médicaments ou de vaccins) mais aussi dans le domaine de l'agriculture (exemple : fertilisants) (Champagne & Fustier, 2007 ; Augustin & Hemar, 2009, Moschakis & Biliaderis, 2017).

Les complexes formés entre des protéines et des polysaccharides ont été utilisés pour encapsuler différents composés actifs puisqu'ils sont dotés d'excellentes propriétés de surface. Si un composé insoluble est présent dans le milieu, les coacervats peuvent former une couche autour de ce composé. Une bonne homogénéisation est nécessaire afin d'éviter la sédimentation des coacervats et afin d'assurer la formation d'une couche homogène autour du composé à encapsuler. La coacervation a été utilisée afin d'encapsuler différents ingrédients comme des arômes (Koupantsis *et al.*, 2014), des acides gras (Eratte *et al.*, 2015), des huiles essentielles (Lv *et al.*, 2012), des polyphénols (Thongkaew *et al.*, 2014), des antioxydants (Calderón-Oliver *et al.*, 2017), des minéraux (Lauth *et al.*, 2014), des vitamines (Chapeau *et al.*, 2016), des sucres (Rocha-Selmi *et al.*, 2013), des protéines (Da S. Gulão *et al.*, 2014), des enzymes (Bayarri *et al.*, 2014), des bactériocines (Calderón-Oliver *et al.*, 2017) et des probiotiques (Bosnea *et al.*, 2014, Bosnea *et al.*, 2017). Avec cette technique, il est possible d'encapsuler des composés thermolabiles puisqu'aucun traitement thermique n'est nécessaire ou encore des composés sensibles aux solvants organiques (Koupantsis *et al.*, 2016). Cette méthode a aussi été utilisée afin de masquer des goûts indésirables ou de réduire les odeurs non souhaitées de certaines vitamines ou minéraux mais aussi pour inhiber la réactivité de certaines molécules actives avec d'autres ingrédients (Moschakis & Biliaderis, 2017).

Les caractéristiques de l'encapsulation produite par la coacervation complexe et plus particulièrement celles de la couche de coacervats (épaisseur, stabilité, efficacité d'encapsulation, vitesse de solubilisation) seraient dépendantes d'un ensemble de facteurs tels que le type du produit encapsulant ou de l'agent à encapsuler, le pH du milieu, la force ionique, la concentration en biopolymère ainsi que la technique utilisée (homogénéisation, séchage par atomisation,...) qui peut imposer aux complexes différents stress (pression, cisaillement, déshydratation). Ainsi, la gomme de lin a été encapsulée par coacervation complexe en utilisant les protéines de soja et la gomme arabique et il a été constaté qu'un certain ratio de protéine/polysaccharide et un pH optimal ont permis d'obtenir un rendement de coacervation

maximal ce qui a assuré une bonne microencapsulation du produit (Dong *et al.*, 2015). Fioramonti *et al.* (2014) ont formé des agrégats d'isolats de protéines de lactosérum par traitement thermique sur lesquels ils ont déposé un polysaccharide anionique, l'alginate de sodium, et ont montré par l'établissement d'un diagramme de phase que quelque soit le ratio protéine/polysaccharide, des complexes solubles ont été formés entre les deux biopolymères à pH 4. Les auteurs ont souligné l'intérêt potentiel de ce type de système puisque ces particules représenteraient une perspective pour le transport et/ou la libération contrôlée de composés bioactifs lipophiles qui seraient liés aux sites hydrophobes de la protéine. De plus, d'après cette étude, le masquage des sites hydrophobes des protéines par les chaînes d'alginate à des ratios protéine/polysaccharide élevés permettrait une meilleure protection des composés hydrophiles liés aux particules de biopolymères.

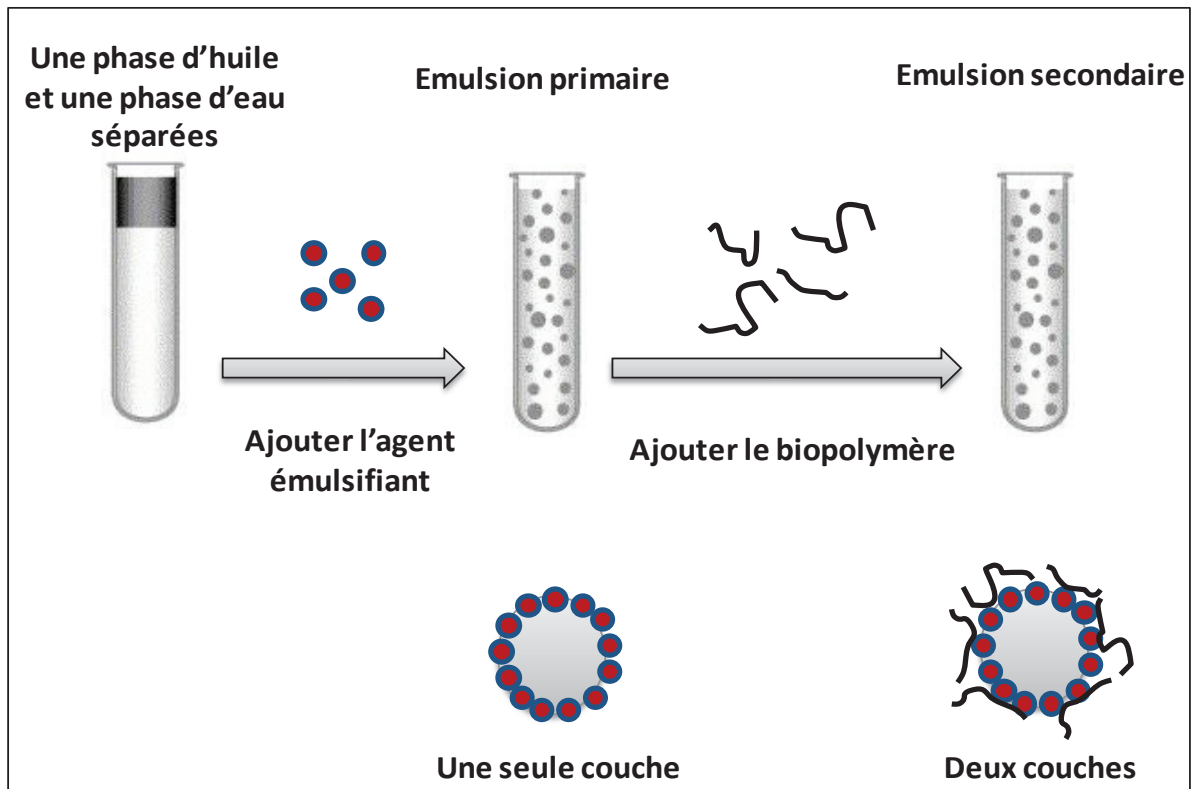
Le procédé de coacervation complexe est reconnu pour ses résultats prometteurs, grâce à un bon rendement d'encapsulation. Il a été montré que l'efficacité d'encapsulation de la nisine dans des matrices à base de collagène/alginate ou de collagène/pectine était meilleure que celle obtenue par d'autres techniques ayant servi pour encapsuler ce peptide comme le séchage par atomisation en utilisant la zéine ou encore la microencapsulation de la nisine en réalisant l'atomisation à différentes pressions d'air en utilisant l'alginate et la gomme de Guar, toutefois, le rendement était plus faible que celui obtenu par la méthode des liposomes (Calderón-Oliver *et al.*, 2017). La libération des composés encapsulés en utilisant la coacervation complexe peut être contrôlée suite à un traitement mécanique, à des variations de pH ou suite à l'action d'enzymes (Schmitt & Turgeon, 2011 ; Devi *et al.*, 2017). Un autre avantage de la coacervation complexe est relié à la structure des coacervats qui sont des assemblages macromoléculaires de nature liquide et qui peuvent donc être incorporés dans des produits alimentaires liquides sans altérer leurs propriétés mécaniques et sensorielles. Les complexes protéines/polysaccharides peuvent aussi être facilement utilisés afin de produire des microcapsules destinées à la commercialisation (Bosnea *et al.*, 2017).

Toutefois, l'encapsulation par coacervation est aussi limitée par sa sensibilité aux facteurs environnementaux (température, pH, force ionique). Une fois formés, les coacervats de complexes sont susceptibles de se désintégrer lorsque les conditions de la solution sont modifiées de manière à affaiblir les interactions électrostatiques entre les biopolymères. Par conséquent, il serait nécessaire d'avoir des coacervats moins sensibles en augmentant leur robustesse et leur stabilité et dans ce cas plusieurs alternatives se présentent telles que la réticulation enzymatique (exemple : transglutaminase), physique en utilisant une variété de

déclencheurs environnementaux (température, pH,...) ou chimique (exemples : glutaraldéhyde, formaldéhyde) (Chanasattru *et al.*, 2009 ; Schmitt & Turgeon, 2011).

#### **I.1.7.4. Stabilisation des émulsions**

Les complexes protéines/polysaccharides combinent des propriétés fonctionnelles et physico-chimiques à partir des molécules qui les constituent et plus particulièrement leur caractère hydrophobe/hydrophile. Ils peuvent donc être utilisés afin de former des mousses ou pour stabiliser des émulsions huile dans l'eau ou eau dans l'huile. Contrairement à la formation des mousses, la stabilisation des émulsions a été beaucoup plus étudiée durant ces dernières années et ceci peut être relié à la faisabilité pratique concernant le contrôle de la formation des émulsions en le comparant à la formation des mousses (Schmitt & Turgeon, 2011). Des complexes qui consistent en des protéines tensioactives reliées à des polysaccharides (la plupart des polysaccharides ne présentent pas une tension de surface considérable) peuvent s'adsorber aux interfaces augmentant ainsi l'épaisseur et les propriétés mécaniques des couches interfaciales. Le choix d'une protéine ayant de bonnes propriétés émulsifiantes et d'un polysaccharide capable de s'adsorber sur les surfaces est important. Généralement, il y a différentes méthodes d'assemblage des polymères aux interfaces liquide/liquide afin de stabiliser des émulsions. Les émulsions peuvent être obtenues à partir des complexes préalablement préparés ou préformés et rajoutés à l'huile. L'émulsion est formée après une étape d'homogénéisation (Schmitt & Turgeon, 2011). La méthode 'couche par couche' est aussi très courante. La formation d'une couche de complexes autour d'une gouttelette d'huile est représentée dans la **Figure I.12**. Tout d'abord, une émulsion primaire contenant des gouttelettes d'huile stabilisées par un agent émulsifiant (généralement une protéine) est préparée par homogénéisation. Par la suite, un biopolymère (généralement un polysaccharide) de charge opposée est incorporé à l'émulsion primaire afin de former une émulsion secondaire stabilisée par une couche formée de l'agent émulsifiant et du biopolymère. Cette procédure peut être répétée afin d'obtenir des émulsions multicouches (McClements, 2006).



**Figure I.12.** Représentation schématique de la production d'émulsions huile dans l'eau contenant des gouttelettes stabilisées par des complexes à l'interface formés par une protéine et un polysaccharide (d'après [McClements, 2006](#))

Ces émulsions peuvent être utilisées comme des matrices afin d'encapsuler et de libérer des composés actifs. Les émulsions multicouche permettent d'avoir des gouttelettes d'huile ayant une meilleure stabilité contre les stress environnementaux (pH, température, force ionique, congélation, déshydratation,...) que les émulsions monocouche ([McClements, 2006](#)). Une autre alternative consiste à utiliser les coacervats qui vont s'adsorber sur une émulsion préalablement formée ce qui entraîne la formation de gouttelettes d'huiles enfermées dans une matrice complexe tertiaire. Dans ce cas, la stabilité des émulsions est améliorée et des propriétés structurales et mécaniques intéressantes sont générées et il est possible d'encapsuler des molécules bioactives non polaires sensibles ([Moschakis \*et al.\*, 2010](#)). De plus, il faut prendre en considération les phénomènes de déstabilisation pouvant avoir lieu comme la floculation par pontage ou par déplétion ([McClements, 2006](#)). Plusieurs paramètres doivent être pris en compte comme la concentration en polysaccharide et le ratio protéine/polysaccharide afin d'assurer la stabilité des émulsions ([Schmitt & Turgeon, 2011](#)).

#### **I.1.7.5. Propriétés visqueuses et gélifiantes**

Les propriétés rhéologiques des protéines et des polysaccharides dans des conditions permettant leur association résultent des différents comportements rhéologiques de chaque polymère et ceci serait lié aux caractéristiques moléculaires des polymères (structure, poids moléculaire, flexibilité) ainsi qu'à d'autres facteurs comme le pH, le ratio protéines/polysaccharides, la force ionique, la concentration totale en biopolymères, la nature des polymères utilisés, l'interaction des polymères avec l'eau et la présence d'autres composés. Le comportement rhéologique de plusieurs systèmes protéines/polysaccharides a été étudié et il a été montré qu'il peut être visqueux ou viscoélastique avec certains systèmes montrant un comportement élastique. En effet, l'association des polymères entraînerait une augmentation de la viscosité du milieu puisque des entités de plus grande taille sont formées. Il a été reporté que dans des conditions permettant la neutralisation des charges, la viscosité est maximale. Généralement, le comportement rhéologique des complexes est rhéoépaississant. Ceci a été relié au comportement rhéoépaississant des polysaccharides et à plusieurs solutions concentrées de protéines (Schmitt & Turgeon, 2011). Récemment, Liu *et al.* (2017b) ont étudié les propriétés rhéologiques des complexes formés entre la gomme de lin et les isolats de protéines de lactosérum en fonction du pH et du ratio et ont montré que les coacervats formés étaient caractérisés par un comportement rhéoépaississant et par des propriétés gélifiantes. La coacervation était maximale à pH 3,8 et à un ratio 2:1 (p/p) (neutralisation des charges). Les coacervats non chargés obtenus dans ces conditions étaient caractérisés par des propriétés rhéologiques améliorées avec un comportement viscoélastique et une viscosité dynamique élevée. La capacité à augmenter la viscosité du milieu ou à former des gels a permis d'étendre les applications des systèmes protéines/polysaccharides dans plusieurs domaines comme le développement de nouveaux gels alimentaires (Devi *et al.*, 2017).

#### **I.1.7.6. Les hydrogels**

Les coacervats de complexes protéines/polysaccharides sont des structures qui sont essentiellement obtenues dans des mélanges sous des conditions associatives lorsque les deux biopolymères sont caractérisés par des charges opposées et des conditions spécifiques sont nécessaires afin d'avoir des hydrogels. Il s'agit d'un gel dont la structure tridimensionnelle est stabilisée essentiellement par des interactions électrostatiques. Les gels électrostatiques de protéines/polysaccharides sont connus comme étant des hydrogels à cause de leur teneur élevée en eau (Matalanis *et al.*, 2011). La gélification a lieu dans des conditions spécifiques (exemple : acidification lente) et suit la complexation avec la formation de complexes solubles suivie par

la formation de complexes interpolymériques qui peuvent alors former des zones de jonction entraînant l'obtention d'une structure rigide. La séparation de phase est arrêtée au point de gélification. L'équilibre entre la séparation de phase et la gélification dépend essentiellement des charges électriques des biopolymères et donc des facteurs permettant de les moduler (température, pH, force ionique) ou encore des cinétiques de chauffage/refroidissement (Le *et al.*, 2017). Le *et al.* (2017) ont proposé un mécanisme de formation des gels à base de protéines/polysaccharides. Quand le pH du milieu est élevé, la protéine et le polysaccharide sont négativement chargés et aucune structure ne se forme à cause des fortes répulsions électrostatiques. Durant l'acidification, le pH va se rapprocher du *pI* de la protéine et des interactions électrostatiques peuvent s'établir entre quelques groupements chargés positivement de la protéine et le polysaccharide et des complexes solubles vont donc se former. Un pH avoisinant le *pI* de la protéine est suffisant pour initier la formation du gel. Plusieurs agrégats de protéines vont se lier sur les chaînes de polysaccharides entraînant une réduction de la charge des complexes solubles formés. Il s'en suit une agrégation des complexes solubles afin de former des complexes interpolymériques à cause de l'établissement de zones de jonction où deux chaînes du polysaccharide peuvent se lier à la même molécule de protéine. Puis, à un pH au-dessous du *pI* de la protéine, les groupements amines de la protéine ( $-NH_2$ ) seront protonés ( $-NH_3^+$ ) et donc la protéine serait chargée positivement tandis que le polysaccharide serait chargé négativement. Des interactions électrostatiques peuvent donc s'établir entre les deux biopolymères. L'association qui consiste à l'augmentation des interactions électrostatiques associatives et à la diminution des répulsions électrostatiques entraîne la transition solution/gel au point de gélification (Le *et al.*, 2017).

Les gels à base de protéines/polysaccharides peuvent être utilisés comme des agents texturants ou pour la protection et le relargage contrôlé de molécules actives, surtout lorsque le procédé de fabrication ne nécessite pas de traitement thermique. La nature électrostatique des interactions rend ces gels sensibles aux facteurs environnementaux (température, pH, force ionique) (Le *et al.*, 2017). Zhang *et al.* (2016) ont encapsulé des isolats de protéines de lactosérum dans des microbilles gélifiées à base d'alginate et ont montré que l'encapsulation, la rétention ainsi que la libération des protéines de ces billes sont significativement influencées par le pH étant donné que les interactions électrostatiques entre les protéines et le polysaccharide dépendent fortement de ce paramètre. A pH 3, les deux biopolymères ont des charges opposés et les protéines ont été bien retenues dans les billes d'hydrogel. Par contre, à

pH 5 et pH 7, les deux biopolymères étaient caractérisés par des charges similaires et la protéine avait tendance à être relarguée plus facilement des billes.

#### **I.1.7.7. Utilisation en tant qu'additifs alimentaires**

Les coacervats à base de complexes peuvent être utilisés comme des agents de texture afin de remplacer la matière grasse ou encore comme des analogues pour la viande. [Krzeminski et al. \(2014\)](#) ont montré que les complexes formés entre une pectine hautement méthylée et les protéines de lactosérum peuvent être utilisés comme des agents de texture ou encore pour remplacer la matière grasse dans un yaourt réduit en matière grasse. L'utilisation des complexes formés a permis l'obtention d'un yaourt ayant une texture similaire à celle d'un échantillon témoin riche en matière grasse. [Bakker et al. \(1994\)](#) ont développé des complexes entre la gomme d'acacia et la gélatine qui peuvent mimer la matière grasse. Le ratio entre la gomme d'acacia et la gélatine était compris entre 1/5 et 5/1. Les coacervats résultants de la complexation étaient caractérisés par une forme sphérique, un diamètre de 11 µm ainsi qu'une température de fusion de 31,5 °C ce qui donne une sensation en bouche comparable à celle de la matière grasse. Certains complexes impliquant des protéines et des polysaccharides sont caractérisés par une structure qui ressemble aux fibres de la viande. [Soucie & Chen \(1986\)](#) ont développé une méthode permettant l'obtention de complexes entre la gomme de xanthane et des protéines comestibles (protéines de soja, caséine,...) ayant une structure fibreuse pouvant donc être utilisés pour substituer la viande.

#### **I.1.7.8. Elaboration de matériaux : films**

Etant donné que les protéines et les polysaccharides sont de nature biologique, ils peuvent être utilisés afin de substituer les polymères synthétiques, en limitant les problèmes de pollution. Leurs applications en industrie agroalimentaire sont donc nombreuses et ils peuvent être en contact direct avec les aliments. La biodégradabilité, la biocompatibilité et la comestibilité de ces composés sont à l'origine de l'intérêt croissant pour leur utilisation pour l'élaboration de matériaux d'emballages. Ainsi, les complexes protéines/polysaccharides ont déjà été exploités afin de développer des films composites destinés à la conservation des aliments et à la prolongation de leur durée de vie avec la possibilité d'un relargage contrôlé des agents qui y sont incorporés. Dans ce contexte, des films contenant des complexes formés entre le lysozyme et une pectine faiblement méthylée ont été produits et il a été montré que le relargage du lysozyme de la matrice pectique a été plus rapide lorsque des pectinases ont été rajoutées dans le milieu ([Bayarri et al., 2014](#)). Il est également important de mentionner que les

films à base de polysaccharides peuvent présenter certains inconvénients incluant leur flexibilité limitée par rapport aux polymères synthétiques et leur forte perméabilité à une humidité élevée (Gohil, 2011). Ainsi, plusieurs études ont montré que les films composites protéines/polysaccharides peuvent présenter de bonnes propriétés barrières et mécaniques par rapport aux films formés de polysaccharides. Liu *et al.* (2007) ont indiqué que l'incorporation de la gélatine extraite de la peau de poisson et de la protéine de la farine de soja dans des films de pectine a permis d'améliorer les propriétés mécaniques de ces films incluant la force et la rigidité mais aussi de réduire la vitesse de transfert de la vapeur d'eau par rapport au film témoin à base de pectine. Récemment, Eghbal *et al.* (2016) ont étudié la formation de complexes entre le caséinate de sodium et la pectine à pH 3 en fonction du ratio protéine/polysaccharide et ont également étudié les propriétés des films obtenus à partir de ces complexes. Les auteurs ont montré qu'en augmentant la concentration en caséinate, la formation de complexes a induit une diminution de la teneur en eau des films obtenus. De plus, les propriétés mécaniques de ces films ont été hautement influencées par la formation de complexes électrostatiques. Des films résistants avec de bonnes propriétés mécaniques ont été obtenus à un ratio caséinate/pectine de 0,05 (p/p).

#### **I.1.8. Conclusion**

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour le développement de produits pharmaceutiques innovants et d'aliments fonctionnels tout en garantissant une encapsulation efficace des composés à haute valeur ajoutée (nutraceutiques, arômes, vitamines, conservateurs). En effet, cette technologie, flexible et économique, permet à la fois de protéger le composé d'intérêt mais aussi de contrôler sa libération en fonction du temps. En raison de leur source naturelle et de leur abondance, les protéines et les polysaccharides ont été largement exploités afin de produire des matrices fonctionnelles. Les microstructures complexes qui en découlent ont reçu un intérêt particulier du fait de leur excellente capacité de rétention et ont donc servi pour développer divers systèmes comme les films ou les microparticules obtenues par le procédé de séchage par atomisation. A l'échelle moléculaire, plusieurs interactions contribuent à l'association entre les protéines et les polysaccharides comme les interactions électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et de van der Waals et qui seraient influencées par un ensemble de paramètres physico-chimiques. Parmi ces interactions, les interactions électrostatiques sont considérées comme étant les forces dominantes dans le phénomène de coacervation complexe.



## **I.2. Positionnement et objectifs du sujet de recherche**

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'étape la plus importante dans le développement d'un système d'encapsulation à base de peptides et/ou de protéines et de polysaccharides consiste à comprendre les interactions moléculaires mises en jeu entre agent encapsulé et agent encapsulant et qui sont dépendantes d'un ensemble de facteurs physico-chimiques (ratio protéine/polysaccharide, pH, température, pression,...). En effet, la réussite d'une opération de microencapsulation implique la préservation de la structure des composés encapsulés et qui dans notre cas correspondent à des molécules dotées d'une activité antimicrobienne. Les interactions moléculaires entre la protéine (lysozyme) ou le peptide (nisine) et les polysaccharides (pectine et alginate) ayant fait l'objet de cette thèse n'ont été que peu étudiées jusqu'à nos jours. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'étudier les interactions mises en jeu dans le but de développer des systèmes d'encapsulation avec de nouvelles fonctionnalités bien précises. Cette démarche comprend plusieurs étapes importantes dont les principales sont :

-La sélection de composés adéquats, utilisés de préférence dans le domaine agroalimentaire comme additifs, qui peuvent servir pour élaborer des matériaux d'emballage comestibles pouvant être directement appliqués à la surface de l'aliment. Dans notre cas, ces composés correspondent à des molécules ayant une activité antimicrobienne (nisine et lysozyme) et à des polysaccharides pouvant être utilisés comme matrices d'encapsulation (pectine et alginate) ;

-L'étude de l'effet de certains facteurs physico-chimiques (ratio polysaccharides-protéine ou peptide, pH, force ionique) sur les interactions moléculaires mises en jeu entre le lysozyme ou la nisine et les polysaccharides sélectionnés et qui peuvent jouer un rôle déterminant pour l'élaboration de particules/matériaux fonctionnels et innovants ;

-La caractérisation des propriétés des complexes formés (taille, structure, charge,...) et l'étude des phénomènes d'association/dissociation de ces complexes en fonction des paramètres physico-chimiques étudiés (ratio polysaccharides-protéine ou peptide, pH, force ionique) ;

-La production par voie solvant (« casting ») de films à base de complexes formés entre les molécules antimicrobiennes et les polysaccharides filmogènes sélectionnés ;

-L'étude de la structure et de l'activité antimicrobienne des films obtenus ;

-La production de microparticules à base de complexes formés entre les molécules antimicrobiennes et les polysaccharides sélectionnés par le procédé de séchage par atomisation ;

- L'étude de la structure et de l'activité antimicrobienne des microparticules obtenues ;
- L'étude de l'effet du procédé de séchage par atomisation sur les interactions moléculaires mises en jeu entre le lysozyme ou la nisine et les polysaccharides sélectionnés et sur la préservation de la structure moléculaire de la nisine ou du lysozyme ;
- La caractérisation des propriétés des complexes formés avant et après séchage par atomisation et reconstitution des poudres séchées.

La démarche globale que nous avons menée nous a permis de travailler à l'échelle moléculaire, microscopique et macroscopique avec différentes méthodes analytiques comme indiqué dans le schéma suivant décrivant notre approche :

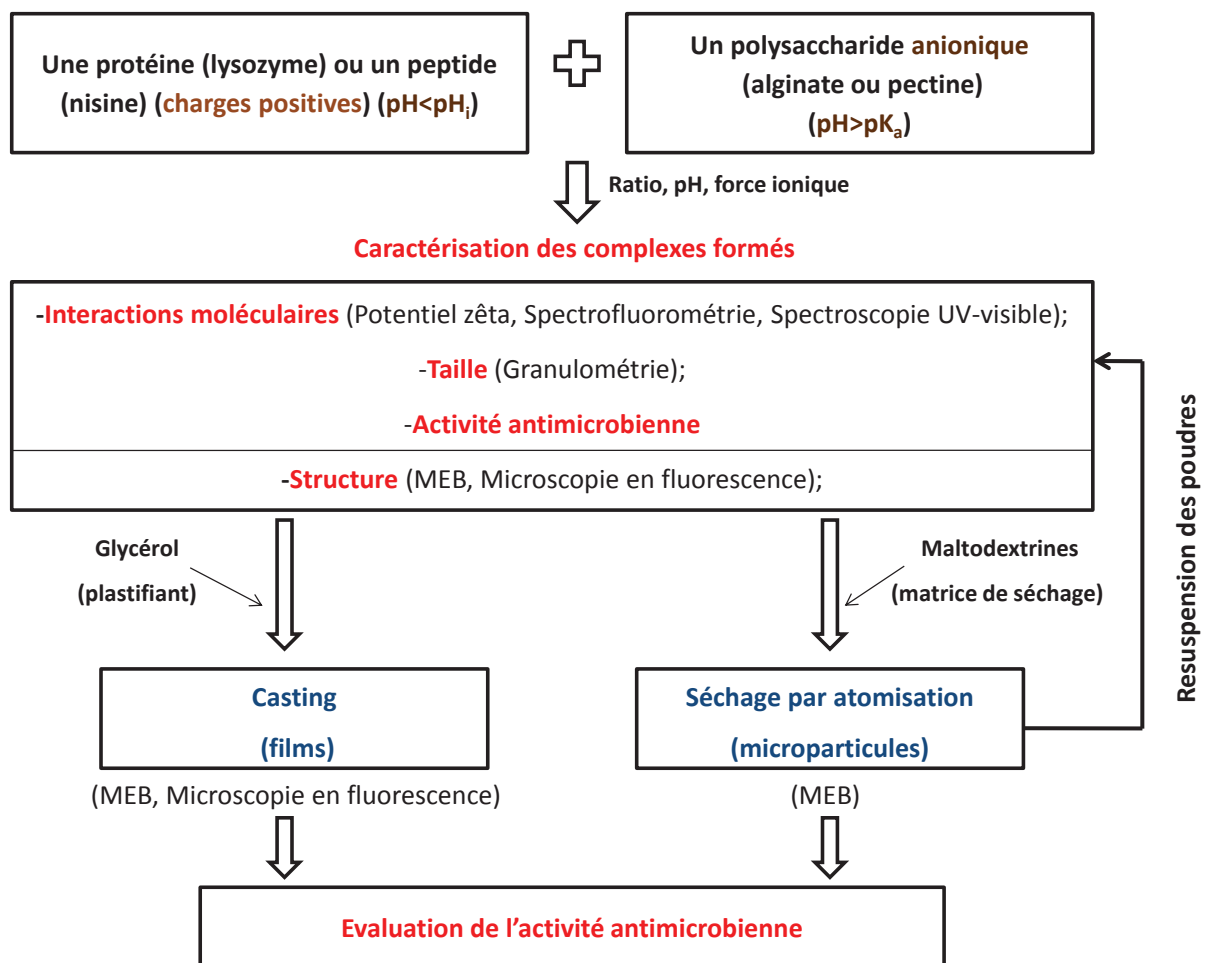


Figure I.13. Représentation schématique de la démarche scientifique adoptée

Ainsi, l'objectif ultime de ce travail est de proposer de nouvelles formes de matrices d'encapsulation élaborées à partir de biopolymères et destinées à des applications alimentaires et/ou pharmaceutiques que nous avons abordé sous l'angle de la protection de la structure des composés encapsulés avec la possibilité d'une libération contrôlée au cours du temps.

L'utilisation des complexes formés entre des molécules antimicrobiennes et des polysaccharides afin de développer des matrices d'encapsulation représente une approche originale du présent travail. La nisine et le lysozyme, connus en industrie alimentaire pour leur utilisation en tant qu'additifs, ont déjà été incorporés dans des films élaborés par « casting » ou dans des microparticules préparées par le procédé de séchage par atomisation pour des applications alimentaires ou pharmaceutiques. Toutefois, peu d'études ont été réalisées sur les interactions moléculaires mises en jeu entre l'agent à encapsuler et la matrice. De plus, l'étude des phénomènes d'association/dissociation des complexes formés en fonction des conditions physico-chimiques nous semble un bon sujet dans la mesure où la protection et la libération de l'agent encapsulé en dépendent. Cette étude des interactions moléculaires a été réalisée entre la nisine ou le lysozyme et l'alginate, polysaccharide anionique linéaire et non estérifié. D'autre part, une pectine faiblement méthylée, caractérisée par une proportion importante de groupements carboxyliques ionisables a été choisie dans le cadre de ce travail afin de favoriser les interactions électrostatiques avec la nisine ou le lysozyme sur une large gamme de pH.

## **Chapitre II. Matériel et méthodes**

Pour des raisons de synthèse, nous avons fait le choix de regrouper les différents protocoles expérimentaux utilisés dans le cadre de cette thèse dans la section « Matériel et méthodes » même si les parties de cette section sont données dans les articles de revues publiés ou soumis présentés au chapitre « Résultats et discussions ».

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1. Le lysozyme**

Le lysozyme utilisé dans le cadre de ce travail provient du blanc d'œuf de poule et est commercialisé par Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France) sous la référence Fluka-62971. Le lysozyme utilisé a une activité de 70000 U/mg et un point isoélectrique de 11,35 ainsi qu'un poids moléculaire de 14,3 kDa.

### **II.1.2. La nisine**

La nisine utilisée dans cette étude est de type A. Il s'agit d'une poudre sèche (95% m/m de nisine A et 5% m/m d'humidité selon la fiche du produit). Elle a été produite par fermentation en utilisant la bactérie *Lactococcus lactis* et est commercialisée par la société Handary SA (Lendeledede, Belgique) sous le nom Nisin A<sup>®</sup> P.

### **II.1.3. Parois lyophilisées des bactéries *Micrococcus lysodeikticus***

Il s'agit de parois lyophilisées des bactéries à Gram positif *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) qui sont sensibles à l'action du lysozyme. Elles sont commercialisées par la société Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France) sous la référence M3770. Une unité de l'activité du lysozyme représente la quantité d'enzyme qui cause une diminution de 0,001 dans l'absorbance à 450 nm en 1 min d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* (substrat), à pH 6,24 et à 25 °C.

### **II.1.4. La pectine**

La pectine a été choisie pour stabiliser, protéger et améliorer les propriétés fonctionnelles des agents antimicrobiens utilisés (nisine ou lysozyme) puisqu'il s'agit d'un polysaccharide très utilisé en industrie agroalimentaire et du fait de son caractère anionique, il est susceptible d'interagir avec le lysozyme ou la nisine positivement chargés sur une large gamme de pH en raison de leur point isoélectrique élevé.

Les pectines natives sont des pectines hautement méthylés au niveau desquelles la majorité des groupements d'acides carboxyliques sont estérifiés par le méthanol et par conséquent non ionisables. C'est pour cette raison que dans le cadre de cette thèse, on a choisi de travailler avec une pectine faiblement méthylée qui est caractérisée par une proportion plus importante de groupements carboxyliques ionisables afin de favoriser les interactions avec la nisine ou le

lysozyme. La pectine utilisée dans cette étude est caractérisée par un degré d'estérification compris entre 22 et 28% et un degré d'amidation compris entre 20 et 23% (selon la fiche du fournisseur). Elle est extraite à partir de l'écorce de citron et est commercialisée par la société Cargill (Baupte, France) sous la référence Unipectine™ OF 305 C SB.

#### **II.1.5. L'alginate de sodium**

L'alginate de sodium a été choisi puisqu'il s'agit d'un polysaccharide anionique, non estérifié, largement employé dans l'industrie agroalimentaire. L'alginate de sodium utilisé dans ce travail est commercialisé par la société Cargill (Baupte, France) sous la référence Algogel 6020.

#### **II.1.6. L'alginate lyase**

L'alginate lyase avec une activité spécifique de 125 unités spécifiques/mg (2500 unités spécifiques/mL) a été fournie par la société Libios (Pontcharra Sur Turdine, France).

#### **II.1.7. Les maltodextrines**

Les maltodextrines utilisées comme matrice de déshydratation ont été fournies par la société Roquette-frères SA (Lestrem, France). Ce sont des hydrolysats d'amidon de maïs obtenus par hydrolyse acide et enzymatique et qui possèdent une valeur de dextrose équivalent (DE) de 19.

#### **II.1.8. Le bleu de Nil**

Le bleu de Nil A est commercialisé par la société Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France) sous la référence N0766.

#### **II.1.9. Le 1-anilino-8-naphtalène sulfonate (ANS)**

Le 1-anilino-8-naphtalène sulfonate (ANS) est commercialisé par la société Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France) sous la référence 10417. Lorsque cette sonde fluorescente est excitée à 380 nm, elle émet une faible fluorescence à 545 nm. Son intensité de fluorescence augmente lorsqu'elle se lie aux régions hydrophobes d'une protéine. Le complexe protéine-ANS est caractérisé par un spectre d'émission avec une intensité maximale de fluorescence à 470 nm. La sonde ANS est utilisée pour étudier les changements conformationnels au niveau des protéines en se liant aux régions hydrophobes situées à leur surface.

### **II.1.10. Les milieux de culture pour les essais microbiologiques**

Le bouillon Tryptone Sel (TS), le bouillon Tryptone Soja (TSB) et la gélose Tryptone Soja (TSA) sont commercialisés par la société Biokar Diagnostics (Beauvais, France).

### **II.1.11. Les autres produits utilisés**

Le tampon imidazole/acétate de pH allant de 3 jusqu'à 9, est un mélange équimolaire d'imidazole et d'acide acétique à 5 mM.

Les autres produits chimiques utilisés sont commercialisés par la société Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France).

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1. Préparation des solutions mères**

Les solutions mères de nisine à 10 g/L ou de lysozyme à 7,14 g/L et des deux polysaccharides (alginate ou pectine) à 30 g/L ont été préparées en dispersant les poudres dans du tampon imidazole/acétate 5 mM ajusté au pH convenable. Les solutions sont ensuite laissées sous agitation jusqu'à la dissolution complète de la poudre (au moins 2 h pour les polysaccharides et 3 h pour la nisine ou le lysozyme). Après hydratation, les solutions de lysozyme, de nisine et de polysaccharides sont centrifugées à 10000 g pendant 30 min (Sigma 3K18, Bioblock Scientific, Illkirch, France) afin d'éliminer toutes les particules insolubles et seuls les surnageants ont été récupérés.

### **II.2.2. Préparation des solutions de complexes**

#### **II.2.2.1. Les complexes lysozyme/pectine et lysozyme/alginate**

Les solutions de complexes lysozyme/pectine ou lysozyme/alginate ont été préparées aux pHs adéquats afin de contenir une concentration fixe en lysozyme de 0,714 g/L et une concentration finale en pectine ou en alginate variable allant de 0 jusqu'à 4 g/L. Ces solutions ont été préparées en mélangeant différents ratios des solutions protéiques et polysaccharidiques avec des solutions tampon ajustées aux pHs appropriés. Le pH de chacune des solutions contenant les mélanges est ajusté de nouveau.

#### **II.2.2.2. Les complexes nisine/pectine et nisine/alginate**

Les solutions de complexes nisine/pectine ou nisine/alginate ont été préparées aux pHs convenables de manière à avoir une concentration finale en nisine de 5 g/L et une concentration

en pectine ou en alginate variable de 0 à 4 g/L en mélangeant différents ratios des solutions peptidiques et polysaccharidiques avec des solutions tampon ajustées aux pHs appropriés.

### **II.2.3. Préparation des poudres séchées par atomisation**

Des solutions de complexes lysozyme/pectine (0,714 g/L de lysozyme ; 0-4 g/L de pectine ; 20 % (m/m) de maltodextrines) et des solutions de complexes nisine/pectine ou nisine/alginate (5 g/L de nisine, 2 g/L de pectine ou d'alginate ; 10 % (m/m) de maltodextrines) ont été préparées et homogénéisées. Ces solutions dites d'alimentation de l'atomiseur (« feed solutions ») ont été séchées dans un atomiseur de laboratoire équipé d'une buse de 0,5 mm de diamètre (Mini spray-dryer B-290, BUCHI, Suisse). Les solutions ont été pompées dans l'atomiseur à un débit de 0,5 L/h à température ambiante. Les températures d'entrée (« *inlet temperature* ») et de sortie (« *outlet temperature* ») étaient de 180 °C et de 90 °C, respectivement. Les suspensions ont été agitées à l'aide d'un barreau magnétique tout au long du séchage afin d'assurer une bonne homogénéité de la distribution des complexes. Les poudres séchées sont par la suite collectées et conservées dans des bocaux étanches, à l'abri de la lumière à 4 °C. Il est important de signaler que les conditions opératoires de séchage par atomisation ont été fixées afin d'être les mêmes pour toutes les expérimentations effectuées dans le cadre de ce travail. Ces conditions permettent d'avoir, dans tous les cas, des poudres sèches avec de bonnes propriétés d'usage.

### **II.2.4. Resuspension des poudres séchées**

Les poudres séchées sont pesées puis mélangées avec du tampon imidazole/acétate (5 mM) préparé au pH adéquat de manière à obtenir des suspensions reconstituées avec la même teneur en matière sèche que les suspensions de complexes avant séchage par atomisation (en tenant compte de l'humidité résiduelle). Les échantillons sont analysés après 1 h d'agitation à 200 rpm de la même façon que les solutions avant séchage.

### **II.2.5. Mesure de la turbidité**

La turbidité des suspensions de complexes aux différents pHs est évaluée par spectrophotométrie (spectrophotomètre Jenway 7305, Villepinte, France) par mesure de l'absorbance à 600 nm et à 25 °C. La solution contenant 0 g/L de polysaccharide est utilisée comme blanc lors de la mesure.



### II.2.6. Mesure du potentiel zêta ( $\zeta$ )

Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique de particules en suspension dans un milieu liquide. Il permet de déterminer la charge électrique au voisinage de la surface de la particule, en fonction de son environnement. En se basant sur ce paramètre, il est possible d'étudier les interactions entre les espèces chargées présentes en solution en fonction de différents paramètres (ratio, pH, ...).

Le potentiel  $\zeta$  de la nisine, du lysozyme et des polysaccharides (alginate et pectine) en fonction du pH ainsi que le potentiel  $\zeta$  des différents complexes qui en découlent formés en solution a été mesuré à l'aide d'un instrument électrophorétique (Zetasizer NanoZS90, Malvern Instruments, Malvern, Royaume-Uni) (Figure II.1). Le potentiel  $\zeta$  est déterminé par la mesure de la direction et de la vitesse de déplacement des particules dans le champ électrique appliqué. Les échantillons sont dilués à une concentration d'environ 0,5 % (m/m) dans le tampon imidazole/acétate 5 mM préalablement ajusté au pH approprié. Les échantillons dilués sont soigneusement mélangés puis injectés à l'aide d'une seringue dans la cellule de mesure de l'instrument. Les valeurs du potentiel  $\zeta$  sont reportées en tenant compte de la moyenne et de la déviation standard des mesures effectuées sur trois échantillons fraîchement préparés.

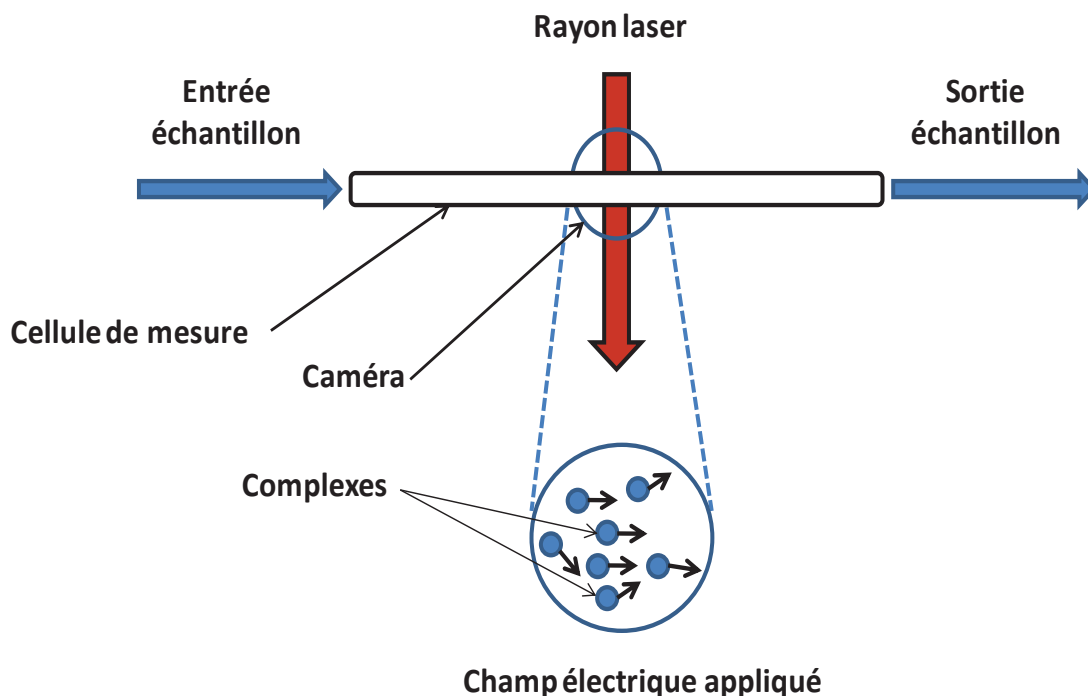


Figure II.1. Représentation schématique du principe de mesure du potentiel zêta

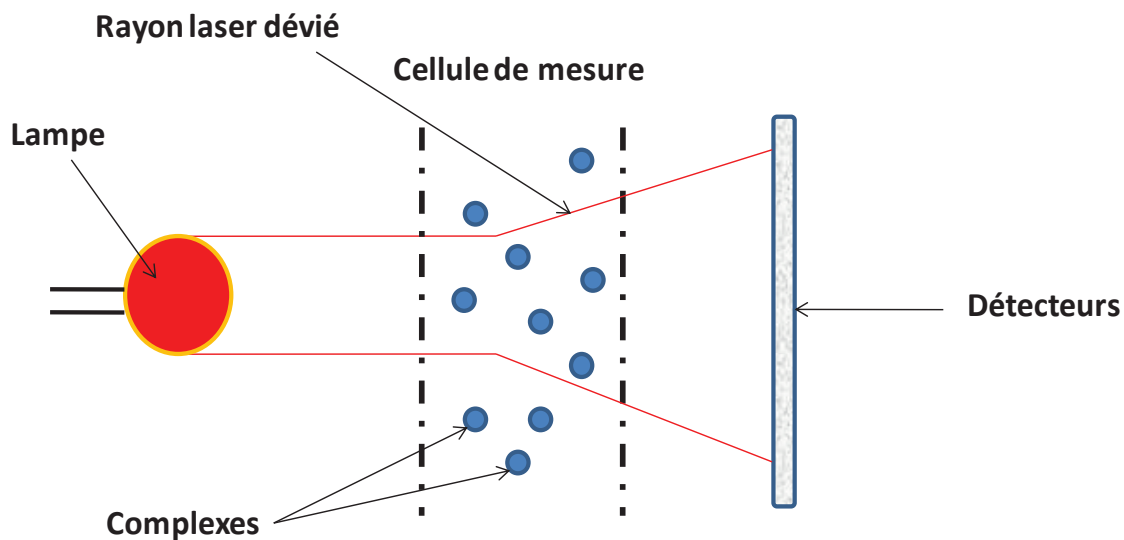
## II.2.7. Mesure de la distribution granulométrique des complexes

### Principe :

La distribution de taille des particules a été déterminée à l'aide d'un granulomètre à diffraction laser Mastersizer (Malvern Instruments, Malvern, Royaume-Uni) qui mesure la dispersion de la lumière induite par les particules d'un échantillon.

Cet appareil est composé d'une lampe qui émet un rayon laser ainsi que de plusieurs détecteurs. Après étalonnage, l'appareil mesure la dispersion de lumière induite par les particules. La taille des particules est déterminée par une relation mathématique qui permet de corréler le diamètre de ces particules à l'angle de déviation selon l'intensité de lumière reçue par chaque détecteur (Figure II.2).

Cette méthode se base sur deux théories fondamentales de Fraunhofer et de Mie. Selon la théorie de Fraunhofer, l'intensité du rayonnement lumineux diffracté est une fonction du rayon des particules. Plus les particules sont petites, plus l'angle de diffraction est grand. Cette théorie repose sur certaines hypothèses : (i) les particules sont considérées de forme sphérique ; (ii) elles doivent être suffisamment distantes les unes des autres ; (iii) les particules sont animées d'un mouvement aléatoire ; (iv) les particules diffractent la lumière avec la même efficacité quelle que soit leur taille.



**Figure II.2.** Principe de mesure de la taille des complexes dans une solution (la déviation du rayon laser est corrélée au diamètre des particules)

La théorie de Mie est une extension de la théorie de Fraunhofer, la lumière laser n'est pas seulement diffractée par la particule mais aussi réfléchié et diffusée quand la taille des particules

est inférieure à 100 µm. Cette partie réfractée de lumière pénétrant dans la particule va sortir en étant toujours soumise aux phénomènes de réflexion et de réfraction dû à la différence des milieux. Les résultats de granulométrie sont généralement représentés soit en fréquence de nombre ( $f_i = n_i/N$  où  $N$  est le nombre total des particules et  $n_i$  le nombre de particules de taille  $i$ ) soit en fréquence de volume ( $f_i = v_i/V$ ) où  $V$  est le volume total de la solution et  $v_i$  est le volume des particules de taille  $i$ ).

Le diamètre moyen des gouttelettes peut être exprimé de deux manières :

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$

$d_{32}$  est le diamètre calculé à partir de la surface des particules (appelé aussi le diamètre moyen de Sauter). Ou aussi :

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

$d_{43}$  est le diamètre calculé à partir du volume des particules. Selon cette définition, ce diamètre est plus influencé par les grosses particules que le  $d_{32}$ .

La mesure de la largeur de distribution de taille des particules en solution est représentée par le span. Cette mesure permet de caractériser l'étendue de la distribution en volume, et est représentée par la formule suivante :

$$Span = \frac{[d(v, 90) - d(v, 10)]}{d(v, 50)}$$

Dans cette formule,  $d(v,10)$ ,  $d(v,50)$  et  $d(v,90)$  sont, respectivement, les diamètres à 10, 50 et 90 % du volume cumulé. En d'autres termes,  $[d(v,90) - d(v,10)]$  est la plage des données analysées et  $d(v,50)$  est le diamètre médian.

La distribution de taille des particules peut présenter une allure monomodale ou multimodale, qui se traduit au niveau des résultats par la présence d'un seul ou de plusieurs pics. Ce type de résultat peut être rencontré par exemple lors de la dissociation des complexes formés.

### **Mode opératoire :**

Afin d'éviter que l'obscurité ne soit trop élevée, les échantillons à analyser sont dilués au préalable. On peut déterminer la distribution de taille des particules sphériques par le principe de la diffraction laser. Afin que les mesures puissent être valides, ces particules doivent être caractérisées par une taille comprise entre 0,02 et 2000 µm. Toutes les mesures ont été réalisées sur des échantillons frais nouvellement préparés. Les résultats obtenus sont présentés comme étant la moyenne d'au moins trois mesures. L'échantillon doit être dilué avec un tampon

au même pH que celui de la suspension de complexes analysée. Le tampon serait à l'origine d'une diffraction qui est considérée dans ce cas comme bruit de fond. Il est nécessaire avant la mesure de procéder à un étalonnage de l'appareil avec le tampon. Une agitation est maintenue dans la cuve tout au long de l'analyse afin d'assurer une meilleure dilution. A la fin de chaque mesure, l'appareil est nettoyé avec un mélange eau/éthanol (3:1) puis avec de l'eau distillée plusieurs fois.

### **II.2.8. Mesure de l'absorbance dans l'UV-Visible**

La mesure des spectres d'absorbance en UV-Visible relatifs à la nisine ou au lysozyme est réalisée par balayage (spectrophotomètre Lightwave II 109233, Biochrom, Cambridge, Royaume-Uni) entre 190 et 350 nm et à 25 °C dans une cuve en quartz double face ayant une longueur de trajet optique égale à 1 cm. Le tampon est utilisé comme blanc lors de la mesure. Le mélange à analyser est dilué avec le facteur de dilution adéquat et homogénéisé au préalable dans le tampon préparé au pH adéquat.

### **II.2.9. Mesure de la fluorescence**

#### **II.2.9.1. Mesure de la fluorescence intrinsèque**

Les changements au niveau de la fluorescence intrinsèque du lysozyme seul ou au sein des complexes formés avec l'alginate ou la pectine sont déterminés par balayage de la longueur d'onde entre 300 et 500 nm suite à une excitation à 280 nm. Les ouvertures des fentes relatives à l'excitation et à l'émission ont été fixées à 6 et à 3 nm, respectivement. La vitesse de balayage est de 500 nm/min. Le mélange à analyser est introduit dans une cuve en quartz à 4 faces ayant une longueur de trajet optique égale à 1 cm. La cuve est ensuite placée, sous agitation, dans un spectrofluorimètre LS 55 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Le logiciel d'utilisation de cet appareil s'appelle 'FL Winlab'. Les mesures sont réalisées à température ambiante (25 °C).

#### **II.2.9.2. Mesure de la fluorescence extrinsèque (hydrophobicité de surface)**

Afin d'étudier l'hydrophobicité de surface de la nisine seule ou complexée avec l'alginate ou la pectine, l'acide-8-anilino-1-naphtalène-sulfonique (ANS) a été utilisé comme sonde pour marquer le peptide selon le protocole décrit par [Khodarahmi et al. \(2012\)](#) avec certaines modifications. La solution de la sonde a été préparée à 0,02% (m/m) dans du tampon imidazole acétate (5 mM, pH 5). Pour chaque solution analysée, des volumes de la solution de la sonde allant de 5 à 25 µL ont été ajoutés à 5 mL de la suspension. Les spectres d'émission ont été obtenus par balayage de la longueur d'onde entre 420 et 650 nm suite à une excitation à 380 nm. Les ouvertures des fentes relatives à l'excitation et à l'émission ont été fixées à 5 et à 4 nm,

respectivement. La vitesse de balayage était de 500 nm/min. Les changements de l'intensité de fluorescence associés à la liaison des molécules d'ANS aux régions hydrophobes du peptide ont été mesurés à l'aide du spectrofluorimètre LS 55 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). L'augmentation de l'intensité de fluorescence suite à l'ajout de concentrations croissantes en sonde a été mesurée jusqu'à ce qu'aucune augmentation ne soit observée. L'intensité maximale de fluorescence a été tracée en fonction de la concentration en ANS. La pente initiale de l'intensité de fluorescence (unité arbitraire, U.A) en fonction de la concentration en ANS (mg/L) a été calculée et a été utilisée comme indice de l'hydrophobicité de surface de la nisine ( $S_0$ ). Chaque mesure a été répétée au moins trois fois. Les mesures ont été réalisées à température ambiante (25 °C), en utilisant une cuve en quartz à 4 faces ayant une longueur de trajet optique égale à 1 cm.

#### **II.2.10. Mesure de l'activité enzymatique du lysozyme**

La détermination de l'activité du lysozyme dans les solutions préparées a permis d'évaluer l'effet de la complexation avec les polysaccharides utilisés (alginate ou pectine) ainsi que l'influence du séchage par atomisation sur son activité enzymatique. Le lysozyme possède une action antibactérienne dirigée principalement contre les bactéries à Gram positif. Les parois parois lyophilisées des bactéries *Micrococcus lysodeikiticus* sont utilisées comme substrat du lysozyme. L'hydrolyse des parois bactériennes par le lysozyme entraîne une baisse de l'absorbance de la suspension bactérienne mesurée à 450 nm. La suspension utilisée pour mesurer l'activité du lysozyme est obtenue après dilution des parois bactériennes lyophilisées dans du tampon imidazole/acétate 5 mM à pH 7 jusqu'à ce que l'absorbance soit égale à 1. Le temps  $t_0$  correspond à l'absorbance de la suspension bactérienne avant ajout de la solution de lysozyme. Dans une cuvette, 0,1 mL de la solution de lysozyme sont ajoutés rapidement à 2,9 mL de la suspension bactérienne *Micrococcus lysodeikiticus* (préparée au même pH). L'absorbance à 450 nm est ensuite mesurée toutes les 30 secondes pendant 5 minutes en utilisant un spectrophotomètre (Jenway 7305, Villepinte, France) jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint. L'activité est calculée à partir de la pente de la portion linéaire initiale de la courbe de diminution de l'absorbance en fonction du temps. L'activité antibactérienne du lysozyme mesurée est exprimée en UI/mL. Une UI équivaut à la perte d'une quantité de substrat (parois bactériennes) responsable d'une baisse de 0,001 unités d'absorbance par minute pour 1 mL de solution. L'activité hydrolytique initiale peut être calculée en utilisant la formule ci-dessous :

$$\text{Activité}(U/mL) = \frac{S}{0,001 \times V}$$

Où  $S$  est la pente de la portion linéaire initiale de la courbe d'absorbance en fonction du temps et  $V$  est le volume de la solution de lysozyme (0,1 mL).

## **II.2.11. Préparation des films antimicrobiens par voie solvant**

### **II.2.11.1. Préparation des films antimicrobiens lysozyme/alginate**

Les solutions filmogènes aqueuses ont été préparées afin de contenir 15 g/L d'alginate, du glycérol ajouté comme agent plastifiant (0,2 g/g d'alginate de sodium) et du lysozyme comme agent antimicrobien (4,285 g/L). Les films ont été préparés afin de contenir 2,695 mg de lysozyme par  $\text{cm}^2$  ( $2 \times 10^5$  unités spécifiques/ $\text{cm}^2$ ). L'alginate de sodium a été dissous dans le tampon imidazole/acétate (5 mM ; pH 7) à 25 °C pendant 2 h sous agitation magnétique. Par la suite, le glycérol et la solution de lysozyme ont été incorporés dans les mêmes conditions et l'agitation a été maintenue pendant 30 min. Chaque film a été préparé en pesant 40 g de la solution filmogène dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Les films ont été formés par séchage durant une nuit à 25 °C sous une hotte à flux laminaire. Les films secs ont été par la suite manuellement détachés de la surface de la boîte de Pétri.

### **II.2.11.2. Préparation des films antimicrobiens nisine/alginate ou nisine/pectine**

Pour l'étude de l'effet du pH sur les interactions nisine/pectine et nisine/alginate, les solutions filmogènes aqueuses ont été préparées dans du tampon imidazole/acétate 5 mM à pH 3, 5 et 7 afin de contenir 5 g/L de pectine ou d'alginate, du glycérol ajouté comme agent plastifiant (0,3 g/g de pectine ou d'alginate) et de la nisine comme agent antimicrobien (0,2 g/L). Les films ont été préparés afin de contenir 0.63  $\mu\text{g}$  de nisine par  $\text{cm}^2$ . La pectine ou l'alginate de sodium ont été dissous dans le tampon imidazole/acétate (5 mM ; pH 3, 5 ou 7) à 25 °C pendant 2 h sous agitation magnétique. Par la suite, le glycérol et la solution de nisine ont été incorporés dans les mêmes conditions et l'agitation a été maintenue pendant 15 min. Chaque film a été préparé en pesant 20 g de la solution filmogène dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Les films ont été formés par séchage durant une nuit à 25 °C sous une hotte à flux laminaire. Les films secs ont été par la suite manuellement détachés de la surface de la boîte de Pétri.

## **II.2.12. Microscopie électronique à balayage**

La microscopie électronique à balayage a été utilisée afin d'étudier la structure des complexes formés, la surface et les sections transversales des films ainsi que la morphologie de surface et la structure interne des poudres séchées. Les poudres obtenues ont été fracturées à l'aide d'un scalpel afin de pouvoir observer leur structure interne. Les complexes, les films ou

les poudres ont été fixées sur un support-échantillon à l'aide d'un ruban adhésif à double face. Les échantillons ont été par la suite observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Hitachi, TM 3030, Japon) à une tension d'accélération de 15 kV.

### **II.2.13. Microscopie en fluorescence**

Afin d'examiner la microstructure des complexes formés, un microscope optique Axiovert 25 CFL (Prolabo, France) a été utilisé en mode fluorescence. Les complexes ou les films ont été marqués à l'aide de la sonde Bleu de Nil (le volume adéquat d'une solution à 1 % (m/m) de colorant a été ajouté aux solutions de complexes ou aux films pour obtenir un rapport colorant/protéines ou colorant/peptides de 1/100 (m/m)). Les observations ont été effectuées au moins 30 min après la coloration afin de permettre la diffusion du colorant dans la matrice à observer. Les complexes et les films sont ensuite placés entre lame et lamelle puis observés à l'aide d'un objectif à immersion d'huile ayant un taux de grossissement de 100x. La sonde fluorescente est par la suite excitée à 630 nm et les données correspondant à l'intensité de fluorescence ont été recueillies dans une plage de longueur d'onde allant de 610 à 660 nm. Les images numériques ont été acquises à l'aide d'un appareil photo Nikon F90X connecté à un système de traitement d'image numérique (AxioVision, Zeiss, Allemagne).

### **II.2.14. Evaluation de l'activité antimicrobienne des poudres et des films**

Des stocks de cultures de deux bactéries à Gram positif, *Listeria innocua* (ATCC 33090) et *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) ont été maintenus à -20 °C dans le bouillon Tryptone Soja (TSB) supplémenté avec 15% de glycérol (v/v). Avant chaque test, la culture des deux souches a été réalisée dans le milieu TSB à 10% (v/v) pendant 8 h puis dans le milieu TSB à 10% (v/v) pendant 16 h à 30 °C puis la préculture a été réalisée dans le milieu TSB pendant 5 h à 30 °C. Les cellules ont été diluées dans le bouillon Tryptone Sel (TS) aux concentrations désirées puis incorporées à 5 % (v/v) dans le milieu gélosé Tryptone Soja (TSA) puis les milieux ensemencés ont été refroidis dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre).

L'activité antibactérienne des microcapsules produites par séchage par atomisation et celle des films élaborés par voie solvant ont été étudiées en plaçant des disques de diamètre défini (10 ou 15 mm) formés de microcapsules ou de films sur les boîtes TSA inoculées avec les concentrations adéquates de *L. innocua* ou *K. rhizophila*. Les films formés uniquement de pectine ou d'alginate (sans agent antimicrobien) ont été utilisés comme des contrôles négatifs. Les boîtes de Pétri ont été par la suite incubées pendant 3 h à 4 °C pour que la libération de l'agent antimicrobien puisse avoir lieu puis pendant 24 h à 30 °C afin de permettre la croissance

bactérienne. Les zones d'inhibition ont été calculées en réalisant la soustraction du diamètre correspondant au film ou aux microcapsules du diamètre total de la zone d'inhibition.

Afin d'étudier l'effet de l'ajout du  $\text{CaCl}_2$  ou de l'alginate lyase sur l'activité antimicrobienne des films lysozyme/alginate préparés à pH 7, 30  $\mu\text{L}$  de la solution de  $\text{CaCl}_2$  (40 g/L) et de la solution d'alginate lyase (120 unités spécifiques/mL) ont été ajoutés sous le film. Le tampon, le  $\text{CaCl}_2$  et l'alginate lyase ont été utilisés comme des témoins négatifs pour les souches bactériennes testées, tandis qu'une solution contenant la même quantité de lysozyme que les disques a été utilisée comme témoin positif.



## **Chapitre III. Résultats et discussions**

### **III.1. Effet du pH sur les interactions entre le lysozyme et la pectine**

#### **III.1.1. Introduction**

Le pH a un effet sur la structure du lysozyme (Li *et al.*, 2012), et sur son activité enzymatique qui est optimale à pH 7 (Bayarri *et al.*, 2014). Des études récentes ont montré que le lysozyme, du fait de son point isoélectrique élevé (~11,0) qui lui confère une charge positive sur une large gamme de pH, est capable d'interagir *via* des interactions électrostatiques avec la pectine en raison de son caractère anionique (Bayarri *et al.*, 2014 ; Ormus *et al.*, 2015). Toutefois, il y a un manque d'informations concernant les facteurs qui permettent de moduler ces interactions et de contrôler la taille et les propriétés physico-chimiques des complexes formés entre ces deux types de biopolymères. Comme indiqué dans le chapitre bibliographique, le pH est un paramètre important qui affecte la densité des charges des protéines et des polysaccharides et donc l'amplitude des interactions entre eux, et d'autre part, ce facteur peut entraîner des modifications structurales au niveau de ces deux types de biopolymères.

Les résultats présentés dans cette partie sous forme d'un article original de recherche publié dans le journal « *Food Chemistry* » en 2017 visent à étendre la compréhension de l'effet du pH sur les interactions moléculaires qui s'établissent entre le lysozyme et la pectine. Ainsi, le rôle de ces interactions dans la formation des complexes lysozyme/pectine a été étudié en relation avec la densité de charges des deux biopolymères et les propriétés structurales du lysozyme.

#### **III.1.2. pH-dependent complexation of lysozyme with low methoxyl (LM) pectin**



Contents lists available at ScienceDirect

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## pH-dependent complexation of lysozyme with low methoxyl (LM) pectin



Chedia Ben Amara, Pascal Degraeve, Nadia Oulahal, Adem Gharsallaoui\*

Univ Lyon, Université Lyon 1, ISARA Lyon, Laboratoire BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil, n°3733, IUT Lyon 1, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 January 2017  
 Received in revised form 17 March 2017  
 Accepted 22 March 2017  
 Available online 23 March 2017

## Keywords:

Lysozyme  
 LM pectin  
 Complexes  
 Electrostatic interactions  
 Molecular conformation

## ABSTRACT

In order to understand the effect of pH on the formation of electrostatic complexes between lysozyme and low methoxyl (LM) pectin, mixtures were prepared at a fixed lysozyme concentration ( $0.714 \text{ g.L}^{-1}$ ) by progressive addition of LM pectin (from 0 to  $4 \text{ g.L}^{-1}$ ). Turbidity analysis allowed to determine specific conditions of pH and lysozyme/LM pectin ratio for optimal complex aggregation. The intrinsic fluorescence enhancement observed upon binding of LM pectin to lysozyme was correlated with the formation of intermolecular aggregates. Conversely, the intrinsic fluorescence decrease observed at higher LM pectin amounts was correlated with the dissociation of intermolecular aggregates. UV absorption spectroscopy showed modifications in lysozyme conformation during both the aggregation phase and the dissociation phase. The role of electrostatic interactions in the formation of lysozyme/LM pectin complexes is discussed in relation to the overall structure and the charge density profile of the two biopolymers.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Despite the high number of published studies, the interactions between polysaccharides and proteins in food systems are still one of the most challenging topics to understand. This type of research is particularly important when one of these biopolymers has a biological activity like antimicrobial properties. Food grade hen egg white lysozyme, also known as 1,4-*N*-acetylmuramidase (EC 3.2.1.17), degrades peptidoglycan in the cell wall of Gram-positive bacteria leading to bacteriolytic and bactericidal activities. This well characterized two-domain globular protein (Goldberg & Guillou, 1994), having a molecular weight of 14.3 kDa with 129 amino acids and an isoelectric point (pI) near 11, has been used to develop antimicrobial films (Tavassoli-Kafrani, Shekarchizadeh, & Masoudpour-Behabadi, 2016) because of its high stability over a broad range of temperature and pH (Makki & Durance, 1996). The high pI of lysozyme gives it a net positive electrostatic charge over a wide pH range, which covers almost all foods.

The lysozyme tertiary structure is compact with several  $\alpha$ -helical regions surrounding a small  $\beta$ -sheet region. Circular dichroism spectroscopy of lysozyme at pH 7 has indicated that it consists of 36%  $\alpha$ -helix, 15%  $\beta$ -sheet, 15% turns, and 34% unordered struc-

ture (Day et al., 2014; Greenfield & Fasman, 1969). Six tryptophan (Trp) residues (positions: 28, 62, 63, 108, 111, and 123) and 3 tyrosine (Tyr) residues are present in the primary structure of lysozyme. Three of the Trp residues are located at the substrate binding sites, two in the hydrophobic matrix box, while one is separated from the others (Croguennec, Nau, Molle, Le Graet, & Brule, 2000). Trp62 and Trp108, both being located at the substrate binding sites, play crucial roles in binding to a substrate and in stabilizing the structure of lysozyme. Moreover, they are the most dominant fluorophores of lysozyme (Imoto, Forster, Rupley, & Tanaka, 1972; Koutsopoulos, Patzsch, Bosker, & Norde, 2007). Consequently, the intrinsic lysozyme fluorescence can be used as a reporter of protein chemical environment either by determining the magnitude of emission intensity or shifts in wavelength of maximum emission intensity (Kudryashova, Visser, van Hoek, & de Jongh, 2007).

In previous works, we have studied complex formation between lysozyme and LM pectin, as well as their stability against heat and proteolytic enzymes at neutral pH (Bayarri, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2014; Ormus, Oulahal, Noël, Degraeve, & Gharsallaoui, 2015). The formed complexes had a spherical shape and an overall negative electrostatic charge which suggests that LM pectin chains are able to entrap positively-charged lysozyme molecules within a polysaccharide network. Results have shown that this complexation seems to be mainly attributed to electro-

\* Corresponding author.

E-mail address: [adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr](mailto:adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr) (A. Gharsallaoui).

static attractions (Bayarri et al., 2014). In these two articles (Bayarri et al., 2014; Ormus et al., 2015), the authors studied interactions between lysozyme and LM pectin but there is still a lack of understanding of the factors that control the size and physico-chemical properties of the formed biopolymer complexes.

The interactions between lysozyme and some small molecules or other macromolecules have already been reported. For instance, Liang et al. (2013) have investigated the interactions of lysozyme with procyanidin B<sub>3</sub> (a catechin dimer) in order to provide insights into the mechanism of protein/polyphenol aggregation. These interactions have been shown to induce the formation of insoluble complexes followed by many structural changes in lysozyme. Moreover, the influence of two carbohydrates: gum arabic and sucrose on lysozyme/procyanidin B<sub>3</sub> complexation was also studied and results showed that gum arabic effectively inhibited the formation of insoluble aggregates while sucrose was able to decrease the size of complexes. Similarly, the interactions of lysozyme with other molecules (e. g. apo or holo  $\alpha$ -lactalbumin (Nigen, Le Tilly, Croguennec, Drouin-Kucma, & Bouhallab, 2009); vitamin B<sub>12</sub> (Li, Yang, Cao, Xu, & Ji, 2012); benzocaine (Li & Li, 2011); tetracyclin analogues (oxytetracyclin, doxycycline, methacycline) (Jiang & Wang, 2004); and lead (II) acetate (Zhang, Hao, & Liu, 2013)) were also studied.

In this work, molecular interactions between LM pectin and lysozyme were studied using spectroscopic approaches. In order to understand the pH influence on these interactions and their effect on the properties of the entrapped lysozyme, turbidimetry was used in combination with UV-visible absorption spectroscopy and spectrofluorimetry.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Low methoxyl amidated pectin (Unipectine™ OF 305 C SB, degree of esterification: 22–28%, degree of acetylation: 20–23%) was acquired from Cargill (Baupre, France). Lysozyme lyophilized powder from hen egg white (specific activity of 70000 specific units.mg<sup>-1</sup> and isoelectric point of 11.35), analytical grade imidazole (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH) and acetic acid were acquired from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). One unit of lysozyme activity represents the amount of enzyme that causes a 0.001 decrease in absorbance at 450 nm in 1 min of a solution of *Micrococcus lysodeikticus*, used as a substrate, at pH 6.24 and 25 °C. All solutions were prepared using deionized water.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Preparation of biopolymer solutions

Lysozyme (7.142 g.L<sup>-1</sup> = 5 × 10<sup>8</sup> specific units.L<sup>-1</sup>) and LM pectin (30 g.L<sup>-1</sup>) stock solutions were obtained by dissolving powders in an imidazole-acetate buffer (5 mmol.L<sup>-1</sup>) at pH 3, pH 5, pH 7 and pH 9 and dispersed under continuous magnetic stirring during at least 2 h until complete hydration was obtained. HCl (1 mol.L<sup>-1</sup>) and NaOH (1 mol.L<sup>-1</sup>) were used to adjust the pH. After hydration, the remaining insoluble residues in LM pectin solution were removed by centrifugation (10000g; 30 min) (Sigma 3K18, Bio-block Scientific, Illkirch, France).

#### 2.2.2. Formation of biopolymer complexes and turbidity measurement

To prepare biopolymer solutions containing lysozyme (0.714 g.L<sup>-1</sup> = 5 × 10<sup>7</sup> specific units.L<sup>-1</sup>) and LM pectin (0–4 g.L<sup>-1</sup>), appropriate ratios of the biopolymers stock solutions were mixed with imidazole-acetate buffer at pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9. The suspen-

sions were then homogenized for 1 min with a vortex mixer (Bayarri et al., 2014). Immediately after vortexing, the pH of the mixtures was adjusted and turbidity measurements were done as a function of pH with a UV/Vis spectrophotometer (Jenway 3705, Villepinte, France). The absorbance at 600 nm was measured at room temperature (25 °C) against lysozyme control solutions (without LM pectin) in imidazole-acetate buffer with different pH (5 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9).

#### 2.2.3. Zeta potential measurement

The zeta potential ( $\zeta$ -potential) of lysozyme and LM pectin was measured using a Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Imidazole-acetate buffer adjusted to the desired pH value was used to dilute the samples (0.5% (w/w)) (Bayarri et al., 2014). The mean values of  $\zeta$ -potential (ZP) and the standard deviations ( $\pm$ SD) were recorded from the instrument.

#### 2.2.4. Fluorescence spectral measurements

The variations of the intrinsic fluorescence spectra of lysozyme upon complexation with LM pectin were monitored under stirring as a function of pH in a wavelength ranging from 300 to 500 nm upon excitation at 280 nm (Li et al., 2012). The bandwidths of excitation and emission were 6 nm and 3 nm, respectively. The scan speed was 500 nm/min. The intrinsic fluorescence spectra were measured with a LS 55 spectrofluorometer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France), using a quartz cell with 1.0 cm path length. All measurements were carried out at room temperature (25 °C).

#### 2.2.5. UV-Vis absorption measurements

UV absorption spectra were measured from 200 nm to 350 nm (Li et al., 2012) with an UV/Vis spectrophotometer (Lightwave II 109233, Biochrom, Cambridge, UK) in a 1.0 cm quartz cell at room temperature (25 °C) against imidazole-acetate buffer (5 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9). Samples were vortexed for 1 min before assays.

#### 2.2.6. Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate using fresh solutions. The results are provided as the averages with their respective standard deviations that were determined from these measurements. A Student's *t*-test statistical analysis was performed, and a *P*-value < 0.05 was considered significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Turbidity

The influence of pH on complex formation was studied by monitoring turbidity for increasing amounts of LM pectin (from 0 to 4 g.L<sup>-1</sup>) added to lysozyme at a fixed concentration of 0.714 g.L<sup>-1</sup> (Fig. 1). All solutions exhibited turbidity maxima for a given LM pectin concentration which depended on pH. These turbidity maxima can be understood from the effect of changing lysozyme/LM pectin complexes size. An increase of the overall scattering intensity was initiated at low LM pectin concentrations, increased up to a maximum and then declined when further increasing LM pectin concentrations. Bayarri et al. (2014) attributed turbidity maxima during the titration of lysozyme with LM pectin to the formation of individual complexes between the two biopolymers followed by aggregation. The rapid increase of turbidity following pectin addition suggests that the number and/or the size of lysozyme/LM pectin aggregates were increasing. The turbidity decrease after reaching a maximum can be interpreted in terms of progressive dissociation of formed large aggregates to re-form individual complexes and therefore the apparent size of lyso-

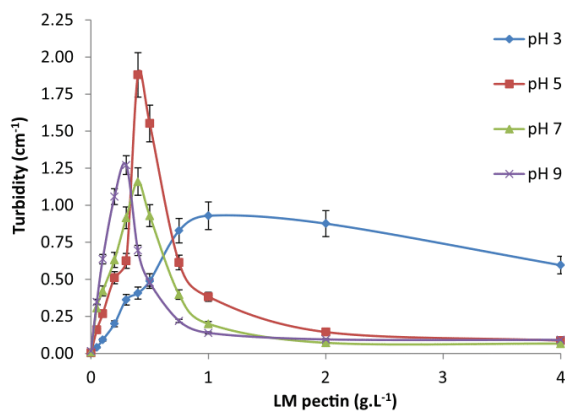


Fig. 1. Dependence of the turbidity (at 600 nm and 25 °C) of mixed biopolymer solutions on LM pectin concentration and pH when LM pectin solution was added to lysozyme solution (final concentration: 0.714 g.L<sup>-1</sup> = 5 × 10<sup>7</sup> specific units.L<sup>-1</sup>) (in 5 mmol.L<sup>-1</sup> imidazole-acetate buffer, pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9).

zyme/LM pectin complexes decreased until a complete dissociation (Bayarri et al., 2014).

Turbidity peaks were reached at LM pectin concentrations of 1 g.L<sup>-1</sup> at pH 3; 0.4 g.L<sup>-1</sup> at pH 5; 0.4 g.L<sup>-1</sup> at pH 7; and 0.3 g.L<sup>-1</sup> at pH 9. Thus, decreasing the positive net charge of lysozyme via increasing pH (Fig. 2) likely reduced its binding ability to the anionic polymer LM pectin. However, at the same time, this pH increase led to supplementary negative charges apparition on the LM pectin chains (Fig. 2) through carboxylic acid groups' dissociation, inducing a sharp decrease of the aggregates turbidity. The opposite effects on the positive lysozyme charge (which decreased) and the negative LM pectin charge (which increased) when pH increased caused different turbidity maxima with both different turbidity values and LM pectin concentrations.

At pH 7 and pH 5, turbidity was maximal for a LM pectin concentration of 0.4 g.L<sup>-1</sup> indicating that aggregation of biopolymers is promoted at intermediate LM pectin concentrations. However, at pH 5, turbidity maxima measured for the same LM pectin concentration was greater than that at pH 7 indicating a higher rate of aggregation of biopolymers and a larger size of aggregates formed. Indeed, the electrical charge of lysozyme (pI ~ 11) is higher at pH 5 (Fig. 2) favoring electrostatic attractive interactions with anionic LM pectin chains. The higher turbidity at pH 5 likely

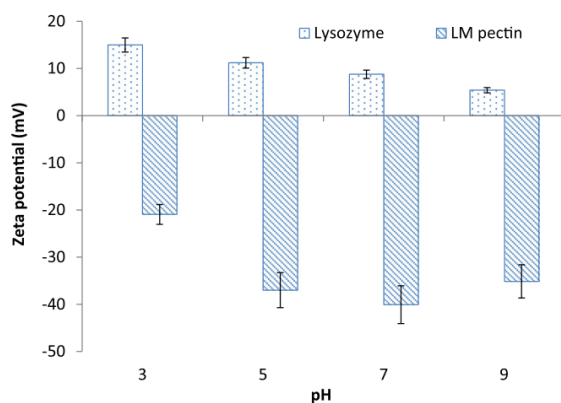


Fig. 2. Dependence of the ζ-potential of lysozyme and LM pectin on pH (5 mmol.L<sup>-1</sup> imidazole-acetate buffer, 25 °C).

resulted from the larger amount of formed aggregates due to the larger number of positively charged lysozyme molecules available to neutralize LM pectin negative charges.

At pH 9, a well-defined peak of turbidity was noticed at a 0.3 g.L<sup>-1</sup> LM pectin concentration. The formation of complexes between the two biopolymers and their aggregation were faster at this pH compared to the other studied pHs. Indeed, electrostatic interactions with cationic sites of lysozyme were probably promoted as LM pectin chains were highly negatively charged at pH 9 (Fig. 2). Turbidity maximum was reduced as compared to that recorded at pH 5 indicating that the aggregates formed had a smaller size because of the importance of electrostatic repulsions. Thus, the stronger the electrostatic interactions, the lower are the required LM pectin amounts for the entrapment, and the charge compensation occurred at lower LM pectin concentrations since lysozyme has a lower net positive charge at pH 9 compared to its net charge at other pH values. Moreover, small size aggregates were thus obtained at pH 9.

At pH 3, turbidity increased slowly until a LM pectin concentration of 1 g.L<sup>-1</sup>. Then, there was a slight decrease of turbidity until a LM pectin concentration of 4 g.L<sup>-1</sup> without forming a real peak indicating that the formation of complexes between lysozyme and LM pectin and their aggregation increased more progressively when increasing LM pectin concentration at this pH. In addition, the turbidity maximum reached at pH 3 was lower than turbidity maxima reached at the other tested pHs which could be due to a lower aggregation rate, and a smaller size of the complexes because of the importance of electrostatic repulsions. In fact, LM pectin chains carried less negative charges at this pH while lysozyme carried a significant positive charge (Fig. 2). Therefore, it was likely necessary to add further amounts of LM pectin to neutralize the lysozyme positive groups.

### 3.2. Intrinsic fluorescence emission studies

Emission spectra of the intrinsic fluorescence of the protein after excitation at 280 nm were collected to study mainly the variation of lysozyme fluorescence intensity throughout complexation by LM pectin. A precious feature of intrinsic protein fluorescence is the high sensitivity of aromatic amino acids residues to their local environment. Fluorescence spectral changes of aromatic amino acids residues often occur in response to conformational transitions, subunit association, substrate binding, or denaturation (Lakowicz, 2006).

#### 3.2.1. Effect of pH on the lysozyme fluorescence spectrum

The conformational changes of lysozyme induced by pH were investigated by fluorescence spectroscopy: the fluorescence spectra are shown in Fig. 3A and the corresponding maximum intensity wavelengths are presented in Fig. 3B. It is known that fluorescence intensity is affected by movement of charged groups along with hydrophobic changes in the microenvironment, whereas the shift in wavelength is uniquely sensitive to hydrophobic changes in the microenvironment (Khanna, Tokuda, & Waisman, 1986). Fig. 3A and B showed that there was no apparent shift in the fluorescence emission wavelength between pH 7 and pH 5, suggesting that the tertiary structure of the whole protein molecule may not be greatly altered when the pH changed from pH 7 to pH 5.

A slight blue shift of the emission band from 345.5 nm (pH 7 and pH 5) to 344.5 nm and a reduction of fluorescence intensity have occurred at pH 3 (Fig. 3A and B). Therefore, under acidic conditions, lysozyme may have undergone slight conformational changes added to a modification of the local polarity of the aromatic amino acids residues. This is consistent with Li et al. (2012) observation of a spectral blue shift of lysozyme in phosphate buffer solution when the pH changed from pH 9.0 to 7.4 or

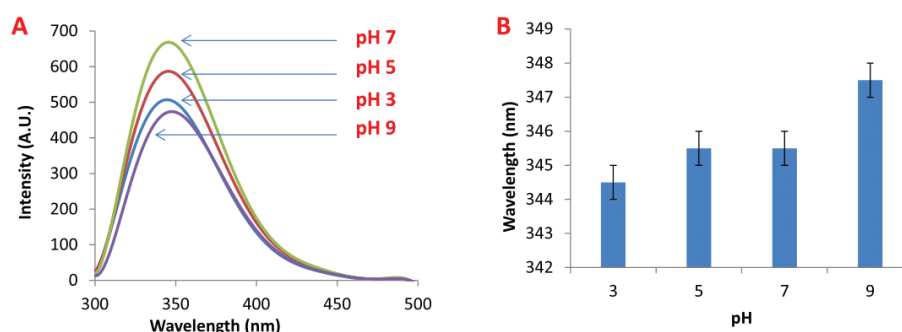


Fig. 3. Influence of pH on the intrinsic fluorescence emission spectrum (A) and the maximum fluorescence intensity wavelength (B) of free lysozyme (final concentration:  $0.714 \text{ g.L}^{-1} = 5 \times 10^7$  specific units. $\text{L}^{-1}$ ) (in  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  imidazole-acetate buffer, pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9 at  $25^\circ\text{C}$ ).

3.4. On the other hand, an apparent red shift from 345.5 nm (pH 7 and pH 5) to 347.5 nm was observed at pH 9 presumably because of exposure of tryptophan residues to the polar solvent and amino acids deprotonation.

### 3.2.2. Effect of LM pectin concentration on the maximum fluorescence intensity

Emission spectra of the intrinsic fluorescence of lysozyme were recorded upon addition of increasing amounts of LM pectin from 0 to  $4 \text{ g.L}^{-1}$  at different pH values (Fig. 4). It can be observed that whatever the pH, the maximum intrinsic fluorescence intensity (determined from the fluorescence emission spectra) of the protein changed after the gradual addition of LM pectin. The variations of the fluorescence intensity corresponding to the emission maxima observed can be mainly attributed to a variety of molecular interactions between the two biopolymers forming complexes and/or aggregates as previously evidenced by measuring turbidity (Fig. 1). According to Fig. 4, fluorescence intensity peaks were observed at LM pectin concentrations of  $0.3 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 5 and  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 7 and pH 9. At pH 7 and pH 9, the maximum fluorescence profiles were similar. However, at pH 5 (characterized by an extensive insoluble complexes formation (Fig. 1)), the increase in fluorescence intensity was more important than at pH 7 and at pH 9. It can be suggested that during complexation/aggregation

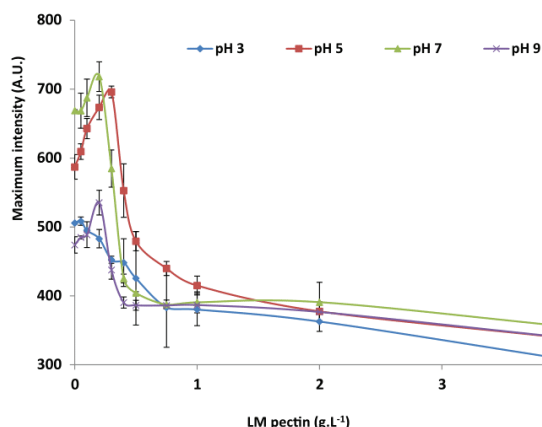


Fig. 4. Dependence of the maximal fluorescence intensity of mixed biopolymer solutions on LM pectin concentration and pH when LM pectin solution was added to lysozyme solution (final concentration:  $0.714 \text{ g.L}^{-1} = 5 \times 10^7$  specific units. $\text{L}^{-1}$ ) (in  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  imidazole-acetate buffer, pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9 at  $25^\circ\text{C}$ ). Excitation and emission wavelengths were 280 nm and 300–500 nm, respectively.

phases, lysozyme was entrapped within LM pectin based network and that this resulted in an increase in its fluorescence intensity.

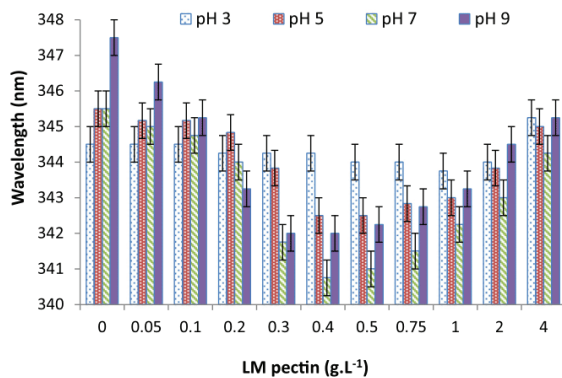
When the amount of LM pectin rose above that corresponding to the fluorescence peaks, a rapid decline in fluorescence emission intensity was observed. This decrease can be attributed to the dissociation of formed large aggregates into smaller insoluble complexes which. Nevertheless, it is important to note that the maximal fluorescence intensities recorded at higher amounts of LM pectin were significantly lower than those obtained for uncomplexed lysozyme at the same pH (LM pectin:  $0 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Fig. 4). This may be due to the reduced availability of the cationic binding sites on lysozyme surface to interact with anionic groups carried by pectin present in excess during the phase of dissociation. Indeed, electrostatic forces could increase upon the addition of the polysaccharide, especially at higher pH values, at which LM pectin chains are more charged. If we assume a “caging” phenomenon of lysozyme in a LM pectin based network as proposed by Bayarri et al. (2014), one can assume that the protein “is exchanged” between pectin chains: this may thus result in a significant decline in the fluorescence intensity.

At pH 3, no peak of fluorescence intensity maxima was observed (Fig. 4) when increasing LM pectin concentration, which is consistent with the reduced electrostatic interactions between lysozyme and LM pectin at this pH. The fluorescence intensity decreased gradually and remained stable for pectin concentrations exceeding  $0.75 \text{ g.L}^{-1}$ . To interpret this result, we can consider that because of low electrostatic charges of pectin chains at this pH, interactions that contributed to form small aggregates having a low turbidity (Fig. 1), are not stable compelling a lysozyme molecule to move between several pectin chains thereby decreasing the fluorescence intensity when LM pectin concentration increased (Fig. 4).

For all pH values, we can notice that the intrinsic fluorescence intensity reached a plateau and did not change for high LM pectin amounts ( $>1 \text{ g.L}^{-1}$ ). This result may be interpreted in terms of saturation of the binding sites of lysozyme by LM pectin chains forming individual complexes and making the protein structure stable when the polysaccharide was in excess.

### 3.2.3. Shift of the fluorescence emission maximum intensity wavelength

The shifts of the fluorescence emission maximum intensity wavelength are shown in Fig. 5. When LM pectin concentration increased from 0 to  $4 \text{ g.L}^{-1}$ , the maximum intensity wavelength first decreased gradually to reach a minimal value and then increased again at higher LM pectin concentrations. Except at pH 3 and at the highest polysaccharide concentration ( $4 \text{ g.L}^{-1}$ ), a blue shift compared to free lysozyme can be noticed for all LM pectin



**Fig. 5.** Dependence of the maximal fluorescence emission intensity wavelength shift of mixed biopolymer solutions on LM pectin concentration and on pH when LM pectin solution was added to lysozyme solution (final concentration:  $0.714 \text{ g.L}^{-1} = 5 \times 10^7$  specific units. $\text{L}^{-1}$ ) (in  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  imidazole–acetate buffer, pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9 at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

concentrations. The decrease in the wavelength is more significant at pH 9. In fact, at pH9, a blue shift from 347.5 nm for free lysozyme to 342 nm was observed for a LM pectin concentration of  $0.3 \text{ g.L}^{-1}$ . The position of this negative peak was pH-dependent:  $1 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 3,  $0.4 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 5 and pH 7, and  $0.3 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 9. These concentrations of LM pectin were perfectly correlated with the end of the phases of aggregation for all the studied pHs previously identified by monitoring turbidity upon LM pectin addition (Fig. 1).

The blue shift indicates that the aromatic amino acids residues are exposed to a more hydrophobic environment (Li & Li, 2011). In fact, this local hydrophobicity increase could be related to a more compact protein tertiary conformation and lower water availability due to lysozyme caging in pectin polymer network, which is consistent with the increase in fluorescence intensity (Fig. 4). Moreover, the blue shift increase during the formation of aggregates could illustrate that LM pectin is able to enhance the stability of the protein structure by deeply burying some amino acids residues in the hydrophobic core of the protein. These results suggest that major modifications in the protein conformation took place at the end of the aggregation.

At pH 3, increasing the concentration of LM pectin from  $0 \text{ g.L}^{-1}$  to  $1 \text{ g.L}^{-1}$  resulted in a small blue shift from 344.50 nm to 343.75 nm. This may be ascribed to weak electrostatic interactions of the protein with the polysaccharide at this pH that may induce only limited changes in lysozyme structure enhancing its conformational stability. However, the gradual fluorescence intensity decrease (Fig. 4) and the gradual turbidity increase (Fig. 1) with LM pectin concentration increase suggest that complex formation likely also contributed to stabilize the conformation of lysozyme at pH 3. When aggregates dissociated at pH 3, the increment in LM pectin concentration has led to an increase in the wavelength (Fig. 5) indicating that the hydrophobic segments of lysozyme were exposed to a more polar environment, which is in correlation with the fluorescence intensity (Fig. 5) and turbidity (Fig. 1) decreases. It can be also suggested that during the phase of dissociation, the increase in the wavelength reflected the tendency of the protein to recover its initial conformation. At pH 3 and a LM pectin concentration of  $4 \text{ g.L}^{-1}$ , lysozyme underwent a small red shift (from 343.75 nm to 345.25 nm) which could indicate that lysozyme starts unfolding at acidic conditions.

The results obtained in this section suggested that both the medium pH and the polysaccharide concentration have a signifi-

cant effect on the intrinsic fluorescence of lysozyme but also on its molecular conformation. In order to check this hypothesis, UV–vis absorption spectroscopic measurements were carried out and results are discussed in the next section.

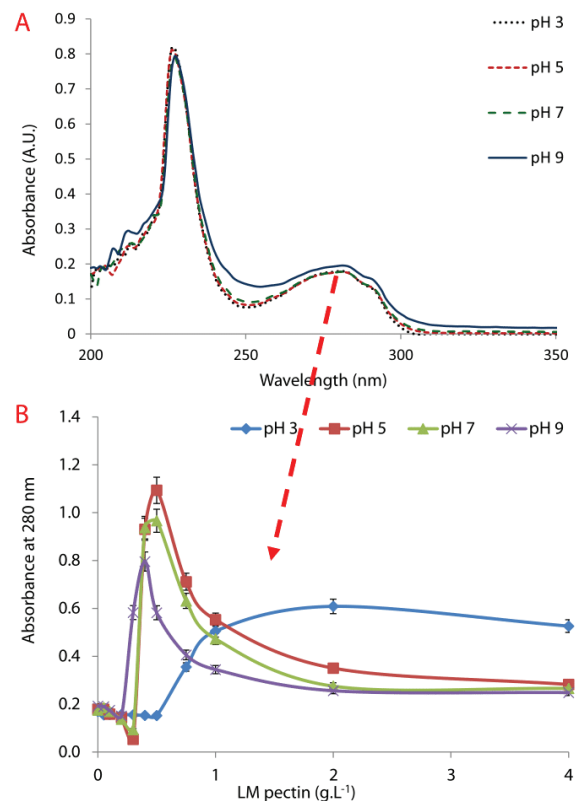
### 3.3. UV–vis spectroscopic analysis of lysozyme upon LM pectin addition

#### 3.3.1. Effect of pH on the lysozyme UV–vis spectrum

UV–vis absorption spectra were used to study the changes of protein conformation under different pH conditions (Fig. 6A). The absorption spectra of lysozyme in the buffer solutions exhibited two characteristic peaks. The first peak was in the far UV region at 226 nm and reflected the secondary structure of the protein. The peak located at 280 nm is due to the absorption of aromatic amino acids residues. When pH varied from 3 to 9, no obvious changes occurred in the UV–vis absorption spectra of the protein suggesting that pH variation did not affect the conformation of the polypeptide backbone.

#### 3.3.2. Effect of LM pectin addition on the UV–vis spectrum of lysozyme

UV–vis absorption spectra of lysozyme upon addition of increasing amounts of LM pectin ( $0\text{--}4 \text{ g.L}^{-1}$ ) at different pH conditions were recorded to investigate conformational changes of lysozyme induced by the polysaccharide and pH effect on lysozyme/LM pectin interactions. The absorbance intensity maxima of the



**Fig. 6.** (A) Effect of pH on UV–vis absorption spectra of lysozyme. (B) Dependence of absorbance at 280 nm on LM pectin concentration and pH when LM pectin solution was added to lysozyme solution (final concentration:  $0.714 \text{ g.L}^{-1} = 5 \times 10^7$  specific units. $\text{L}^{-1}$ ) (in  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  imidazole–acetate buffer, pH 3, pH 5, pH 7, or pH 9 at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Suspensions of complexes were diluted 10 times before measurements.

formed complexes measured at 226 nm and 280 nm changed with no wavelength shift of these peaks upon increasing LM pectin concentration regardless of the pH value (data not shown). In order to explore the influence of pH and complex formation on the molecular properties of the protein, the variation of the absorbance intensity at 280 nm was plotted from the UV–vis absorption spectra (Fig. 6B).

According to Fig. 6B, the absorbance measured at 280 nm changed at the four studied pH values suggesting that changes occurred in the microenvironment of aromatic amino acids upon LM pectin addition and that the polysaccharide interacted with the protein in a concentration dependent manner. When LM pectin was gradually added to lysozyme solution, the intensity of absorbance at 280 nm decreased slightly until a LM pectin concentration of  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 3;  $0.3 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 5 and pH 7; and  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 9. The decrease in the absorbance during complex formation and aggregation suggests that lysozyme structure changed (Li & Li, 2011). This may imply that aromatic amino acids residues have been concealed due to the unfolding of lysozyme secondary structure after interacting with LM pectin.

The different LM pectin concentrations leading to a minimal absorbance at 280 nm can be correlated with the positive charge density of lysozyme that increased from pH 3 to pH 9 (Fig. 2) inducing lysozyme entrapment and complexes formation at lower LM pectin concentrations. These results are consistent with turbidity measurements (Fig. 1). The minimum absorbance at 280 nm was the most significant at pH 5 (Fig. 6B). Thus, we can suggest that the most important changes in the protein backbone structure have occurred at this pH which may be the consequence of the formation of larger lysozyme/LM pectin aggregates (Fig. 1). As a result, it can be supposed that complexes with larger diameter (containing more LM pectin chains) allowed larger lysozyme surface interactions and therefore larger perturbations of the protein secondary structures. This finding was confirmed at pH 3 where the absorbance decreased more slowly reflecting the slowness of complexes formation when LM pectin was added to lysozyme at this pH (Fig. 1).

A leaping of absorbance intensity was observed after reaching its minimum: the intensity of absorbance at 280 nm increased up to a polysaccharide concentration of  $2 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 3;  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 5 and pH 7; and  $0.4 \text{ g.L}^{-1}$  at pH 9. This significant increase in UV absorption intensity may indicate the end of the structural rearrangements of lysozyme after complexation. This could refer to the beginning of the dissociation of lysozyme/LM pectin aggregates resulting in individual complexes formation (Bayarri et al., 2014). This positive peak appeared quickly when the repulsive electrostatic forces were more important. In other words, the positive peak appeared at lower LM pectin amounts when the polysaccharide was more charged (at high pH values). All these phenomena and analyses demonstrated that the interaction of LM pectin with lysozyme induced conformational changes in lysozyme molecule. These major conformational changes occurred during the end of the aggregation and during the beginning of dissociation to form individual complexes.

Above LM pectin amounts corresponding to the absorbance maxima, there was a progressive decline in the absorbance (except at pH 3) until a plateau was reached at a LM pectin concentration of about  $2 \text{ g.L}^{-1}$  (Fig. 6B) (corresponding to the presence of individual complexes between the two biopolymers (Bayarri et al., 2014)) and remained stable even when LM pectin concentration was further increased. Thus, one can suppose that the lysozyme backbone modifications caused by complexation with LM pectin were reversible and that this allowed the enzyme to regain its structure and consequently its antimicrobial activity. A previous study has confirmed this hypothesis by showing that the treatment of these complexes by pectinases has led to recover all the lysozyme enzy-

matic activity (Bayarri et al., 2014). At pH 3, the UV absorbance intensity gradually increased and remained stable at its maximum value even if the LM pectin content continued to further increase which may indicate a weak dissociation of aggregates. This finding is in agreement with the measured values of turbidity which were still high when the polysaccharide concentration increased (Fig. 1).

#### 3.4. General discussion on the effect of pH on the lysozyme/LM pectin interactions

LM pectin is a polyanionic polymer along which the number of deprotonated carboxyl groups increases as the pH increases. Simultaneously, when pH varied from 3 to 9, the number of positive charges of lysozyme decreased. As a result, the formation rate of complexes and their size will depend on the difference between the densities of opposite charges along both biopolymers at each pH. Therefore, the effect of biopolymer mixing ratio is critical for controlling the charge balance within the mixed systems. Our observations showed that complexes between lysozyme and LM pectin can be formed regardless of the polysaccharide concentration and the pH. The LM pectin concentration change had an effect only on the association of these complexes with each other through a bridging mechanism which caused a change in the apparent particle size (Bayarri et al., 2014). It can be observed that the maximal fluorescence intensity and the minimal UV intensity at 280 nm (Figs. 4 and 6B) occurred at LM pectin concentrations slightly lower than those corresponding to the turbidity peak for all studied pHs. Thus, it can be assumed that at the end of the aggregation phase, lysozyme was completely immobilized with a slightly modified structure, but aggregation continued by using probably the latest pectin chains responsible for the complex bridging before the beginning of the phase of dissociation.

Concerning the shift of the fluorescence intensity maximum wavelength, the change from a blue shift to a red shift occurred at values of LM pectin concentration exactly corresponding to those of turbidity peaks whatever the medium pH (Figs. 1 and 5). This change of the wavelength shift direction could thus be used as a means for accurately locating the end of aggregation phase and the beginning of the complex dissociation phase permitting to re-form individual complexes. Moreover, it can be noted that the maximum UV–vis intensity at 280 nm occurred at pectin concentrations higher than those corresponding to the turbidity peaks (Figs. 1 and 6B). It is thus assumed that at the beginning of the dissociation phase, the structural rearrangements continued in the released complexes. It also seems important to note that the zone between LM pectin concentrations inducing a minimal and a maximal absorption at 280 nm of lysozyme could correspond to a rearrangement interval of protein structure in which phenomena of folding and unfolding may coexist. This can be explained by the fact that some pectin chains bind to lysozyme while other chains detach simultaneously. In terms of pectin concentration, this zone was wider at pH 3 which could be due to the low charge density of pectin molecules at this pH inducing a more limited structural rearrangement upon LM pectin addition.

Taken together, these results allow us to infer that the interactions between the two biopolymers generated two phases: (i) formation of individual complexes and aggregation and (ii) dissociation of aggregates. In contrast, the immobilization of lysozyme occurred before the end of the first phase while the structural changes continued until the beginning of dissociation phase. Moreover, the strong pH dependence of lysozyme/LM pectin interactions confirms that the complexation seems to be mainly due to electrostatic attractions.



#### 4. Conclusion

Results from this study described the effects of pH and biopolymer mixing ratio on the formation of insoluble complexes resulting from gradual LM pectin addition to a fixed lysozyme concentration. Complexation was supposed to involve interactions between the two biopolymers which resulted in changes in lysozyme intrinsic fluorescence and conformation. The results also suggested that lysozyme entrapment could be stopped before the end of the aggregation phase, while structural changes continued even during the dissociation phase. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and circular dichroism could be employed to better understand the behavior of both biopolymers upon electrostatic complexation of lysozyme by LM pectin especially during the phase covering aggregation stage end and the dissociation stage beginning. Such fundamental studies on lysozyme/LM pectin interactions and conformational stability of lysozyme when associated with LM pectin will be of practical interest for the rational design of antimicrobial lysozyme/LM pectin particles and/or films for food preservation. Fine-tuning of these interactions could, for instance, be favorably exploited to increase lysozyme stability and control its release once in contact with perishable foods matrices.

#### Acknowledgments

Chedia BEN AMARA received a Ph D grant from the French Ministry of Higher Education and Research. The authors are indebted to Conseil Départemental de l'Ain and Bourg en Bresse Agglomération for their financial support.

#### References

Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, *131*, 18–25.

Croguennec, T., Nau, F., Molle, D., Le Graet, Y., & Brule, G. (2000). Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. *Food Chemistry*, *68*, 29–35.

Day, L., Zhai, J., Xu, M., Jones, N. C., Hoffmann, S. V., & Wooster, T. J. (2014). Conformational changes of globular proteins adsorbed at oil-in-water emulsion

interfaces examined by Synchrotron Radiation Circular Dichroism. *Food Colloids*, *34*, 78–87.

Goldberg, M. E., & Guillou, Y. (1994). Native disulfide bonds greatly accelerate secondary structure formation in the folding of lysozyme. *Protein Science*, *3*, 883–887.

Greenfield, N. J., & Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, *8*, 4108–4116.

Imoto, T., Forster, L. S., Rupley, J. A., & Tanaka, F. (1972). Fluorescence of lysozyme: Emissions from tryptophan residues 62 and 108 and energy migration. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*, pp. 1151–1155.

Jiang, C., & Wang, T. (2004). Study of the interactions between tetracycline analogues and lysozyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *12*, 2043–2047.

Khanna, N. C., Tokuda, M., & Waisman, D. M. (1986). Conformational changes induced by binding of divalent cations to calregulin. *Journal of Biological Chemistry*, *261*, 8883–8887.

Koutsopoulos, S., Patzsch, K., Bosker, W. T. E., & Norde, W. (2007). Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic Surfaces. *Langmuir*, *23*, 2000–2006.

Kudryashova, E. V., Visser, A. J. W. G., van Hoek, A., & de Jongh, H. H. J. (2007). Molecular details of ovalbumin–pectin complexes at the air/water interface: a spectroscopic study. *Langmuir*, *23*, 7942–7950.

Lakowicz, J. (Ed.). (2006). Protein fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 529–575). US: Springer.

Li, S., & Li, D. (2011). Investigation on the pH-dependent binding of benzocaine and lysozyme by fluorescence and absorbance. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *82*, 396–405.

Li, D., Yang, Y., Cao, X., Xu, C., & Ji, B. (2012). Investigation on the pH-dependent binding of vitamin B12 and lysozyme by fluorescence and absorbance. *Journal of Molecular Structure*, *1007*, 102–112.

Liang, M., Liu, R., Qi, W., Su, R., Yu, Y., Wang, L., & He, Z. (2013). Interaction between lysozyme and procyanidin: Multilevel structural nature and effect of carbohydrates. *Food Chemistry*, *138*, 1596–1603.

Makki, F., & Durance, T. D. (1996). Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. *Food Research International*, *29*, 635–645.

Nigen, M., Le Tilly, V., Croguennec, T., Drouin-Kucma, D., & Bouhallab, S. (2009). Molecular interaction between apo or holo  $\alpha$ -lactalbumin and lysozyme: Formation of heterodimers as assessed by fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, *1794*, 709–715.

Ormus, S., Oulahal, N., Noël, C., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2015). Effect of low methoxyl (LM) pectin complexation on the thermal and proteolytic inactivation of lysozyme: A kinetic study. *Food Hydrocolloids*, *43*, 812–818.

Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 360–374.

Zhang, H., Hao, F., & Liu, R. (2013). Interactions of lead (II) acetate with the enzyme lysozyme: A spectroscopic investigation. *Journal of Luminescence*, *142*, 144–149.

### **III.1.3. Conclusion**

Les résultats présentés dans cet article montrent que la quantité de pectine nécessaire à la complexation totale du lysozyme dépend du pH. Pour un pH allant de 3 à 9, l'ajout de quantités croissantes de pectine à une quantité fixe de lysozyme s'est traduit par une phase d'association des complexes formés en agrégats suivie par une phase de dissociation. En particulier, à pH 3, la formation des complexes entre les deux biopolymères est apparue plus limitée ce qui peut s'expliquer par la faible densité de charges négatives portées par la pectine à cette valeur de pH. Les études spectroscopiques réalisées ont permis de démontrer que le lysozyme a subi des modifications structurales aussi bien au niveau de la phase d'association qu'au cours de la phase de dissociation. Ces propriétés de charge du lysozyme et de la pectine en fonction du pH semblent être intéressantes si on envisage de former des films par voie solvant ou des microparticules par séchage par atomisation *via* des interactions électrostatiques entre ces deux molécules ou si on envisage de déclencher la déstabilisation de ces complexes pour contrôler la libération des composés encapsulés.

## **III.2. Séchage par atomisation des complexes lysozyme/pectine**

### **III.2.1. Introduction**

L'objectif de ce travail consiste à étudier les mécanismes moléculaires et les conditions qui permettent de préserver la structure de l'agent d'intérêt. Dans ce contexte, l'objectif de cette section, présentée sous forme d'un article publié dans le journal « *Journal of Food Engineering* » en 2016 consiste à répondre à la question suivante : la pectine, qui peut former des complexes électrostatiques avec le lysozyme, permet-elle d'améliorer la stabilité de cette même protéine aux différents processus de déstabilisation qu'elle subit lors du procédé de séchage par atomisation, à savoir, le cisaillement et le traitement thermique ? Pour cela, plusieurs propriétés des complexes lysozyme/pectine avant et après séchage/reconstitution ont été étudiées en présence de maltodextrines comme matrice de séchage. Intentionnellement, ce travail a été réalisé à pH neutre, pH auquel le lysozyme possède une activité enzymatique optimale (Bayarri *et al.*, 2014). L'objectif scientifique général de ce travail consiste à déceler d'une manière assez claire l'effet du cisaillement et du traitement thermique lors de l'atomisation sur les propriétés du lysozyme encapsulé ainsi que l'effet de la complexation avec des concentrations croissantes en pectine sur la préservation de la structure et de l'activité enzymatique du lysozyme.

### **III.2.2. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying**



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfoodeng](http://www.elsevier.com/locate/jfoodeng)

## Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying

Chedia Ben Amara<sup>a</sup>, Noushin Eghbal<sup>b</sup>, Pascal Degraeve<sup>a</sup>, Adem Gharsallaoui<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ Lyon, Université Lyon 1, ISARA Lyon, Laboratoire BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000, Bourg en Bresse, France

<sup>b</sup> Department of Food Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 February 2016

Received in revised form

22 March 2016

Accepted 25 March 2016

Available online 30 March 2016

#### Keywords:

Encapsulation

Lysozyme

Antimicrobial activity

Pectin

Complexation

Spray-drying

### ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the properties of encapsulated lysozyme (at 0.714 g/L concentration) by spray-drying as well as the effect of complexation with increased pectin concentrations (0–4 g/L) on the preservation of lysozyme structure and activity. Maximum turbidity of spray-dried complexes was lower than unprocessed ones at a threshold pectin concentration above which turbidity was reduced. This result could be attributed to the formation of more individual complexes with decreased aggregation upon application of spray-drying due to configurational changes of the complexes. At higher pectin concentrations (above 0.5 g/L), spray-dried complexes exhibited lower antimicrobial activity compared with unprocessed complexes probably because of high limitation in diffusion and accessibility of substrate to active sites of the encapsulated enzyme within the polysaccharide network. Conformational changes of lysozyme and formation of complexes with pectin upon spray-drying were determined by using fluorescence and UV–Vis absorption measurements. The results revealed that spray-drying had a significant effect on lysozyme structure, activity, and mobility particularly at higher pectin concentrations (above 0.5 g/L).

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Lysozyme, a compact globular protein with 14.4 kDa molecular weight, is a small spheroidal hydrolase with antibacterial properties that is naturally present in avian eggs, saliva, and mucus. Being a natural food preservative, lysozyme has been used for extending shelf life of different food products such as raw and processed meat, dairy products as well as fruits and vegetables (Tiwari et al., 2009). Antimicrobial activity of lysozyme against wide range of food spoilage organisms is due to its ability in hydrolyzing  $\beta$ -1–4 glycosidic bonds between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamin of bacterial cell wall peptidoglycan. Gram-negative bacteria are less sensitive toward lysozyme as a result of the presence of a protective lipopolysaccharide (LPS) on the bacterial cell wall. However, it is possible to increase the susceptibility of Gram-negative bacteria to lysozyme by adding membrane disruptive compounds like chelators (EDTA) and detergents (Branen and Davidson, 2004).

Lysozyme is made up of 129 amino acid residues, five  $\alpha$  helices, a three stranded antiparallel  $\beta$ -sheet and a large amount of random coil and  $\beta$ -turns. Regarding the location of most of cysteins in the  $\alpha$ -helix, four disulfide bonds can lead to stabilization of its structure (Wu and Narsimhan, 2008). Lysozyme contains six tryptophan (Trp) residues at different locations (28, 62, 63, 108, 111, and 123). The two dominant fluorophores of lysozyme are Trp 62 and Trp 108 which have great effect in binding with a substrate or an inhibitor and play an important role in the stabilization of the structure (Zhang et al., 2010). Tryptophan fluorescence can be applied for the characterization of changes in the tertiary conformation of proteins. Protein's tertiary structure determines its function as well as its solubility. Conformational changes of most proteins are related to flexibility of their tertiary structure that can undergo some limited alterations.

Spray-drying is the most common method used for microencapsulation in food industry. Applying spray-drying for the encapsulation of proteins may impose stresses on the product through exposure to high temperature, distribution of air-water interfaces, shearing, and dehydration. It is obvious that heat treatments of protein solutions can be accompanied by reversible

\* Corresponding author.

E-mail address: [adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr](mailto:adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr) (A. Gharsallaoui).

and irreversible changes in structure and properties (like solubility) of various proteins. Indeed, raising temperature up to 60 °C, can result in protein structural changes through losing three-dimensional protein structure and changing protein hydration. Above denaturation temperature, protein undergoes irreversible structural changes which is mostly affected by various environmental conditions (pH, ionic strength, protein concentration ...) (deWit and Klarenbeek, 1984). Denatured proteins are characterized by less high-ordered structures, less initially buried amino acid groups in the protein core, and a greater exposure to the solvent environment of hydrophobic and sulphhydryl groups compared with initial structure (Bernard et al., 2008). Denaturation of lysozyme native structure during spray-drying is mainly related to dehydration process. In fact, according to Liao et al. (2002), sugars like sucrose can protect lysozyme structure during dehydration step of spray-drying by establishing hydrogen bonds with protein molecules which contribute to increasing changes of negative value of free energy between native and denatured states of lysozyme.

Protein/polysaccharide complexes are important for industrial applications including micro- and nano-encapsulation, design of multilayered structures, formation and stabilization of food emulsions and gels, and recovery of proteins from industrial byproducts (Turgeon et al., 2007). However, the functional properties of proteins including solubility, surface activity, conformational stability, gel forming ability, emulsifying properties, and foaming properties will be influenced by interactions with polysaccharides (Ye, 2008). Moreover, it has been reported that the interactions between proteins and polysaccharides in complexes may lead to an increase in the extent of protein secondary structure. In fact, complexes formation between poly(L-lysine) (PLL) and *i*-carrageenan lead to an increase in the  $\alpha$ -helix content of the polypeptide. Better interactions between PLL and *i*-carrageenan have been shown to occur through high ordered protein conformation (Girod et al., 2004).

Several studies revealed that complexation of oppositely charged macromolecules including whey protein-carrageenan (Weinbreck et al., 2004), lysozyme-pectin (Bayarri et al., 2014), lentil protein isolates-gum Arabic (Aryee and Nickerson, 2012), whey protein-exopolysaccharide B 40 (Weinbreck et al., 2003) occurs mainly by electrostatic interactions. By reaching stoichiometry of opposite charges to 1 (neutralization), maximum amount of aggregates are formed. Complexation by electrostatic interactions can be influenced by different parameters such as pH, ionic strength, concentration, protein to polysaccharide ratio, charge distribution on the protein, and relative hydrophobicity of molecules (Schmitt et al., 1998). Cousin et al. (2005), studied the structure and the conformation of each compound in lysozyme-sodium polystyrene sulfonate (PSSNa) complexes by small angle neutron scattering (SANS). Three main types of protein-polyelectrolyte complexes were formed at pH 4.7 via electrostatic interactions, depending on the PSS length chain and charge ratio of components. Complexes with dense 3-D spheres were formed by reaching charge ratio close to one.

In the present study, complexation of different low methoxyl (LM) pectin concentrations with lysozyme upon spray-drying was studied. Pectin, a water soluble compound, consists of D-galacturonic acid units linked via  $\alpha$ -1-4 glycosidic bonds (Bierholz et al., 2012). The high proportion of ionized carboxylic acid groups in the pectin backbone make the macromolecule to be negatively charged contributing to electrostatic attractive interactions with cationic lysozyme at neutral pH. The main aim of this work was to encapsulate antimicrobial lysozyme by spray-drying and to study the effect of protein complexation with different added LM pectin concentrations on the structural properties by using SEM micrographs, turbidity, fluorescence, and UV-Vis absorption

measurements as well as on the antimicrobial activity of the enzyme.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Low methoxyl amidated pectin (Unipectine™ OF 305 C SB, degree of esterification from 22% to 28% and degree of acetylation from 20% to 23%) was purchased from Cargill (Baupre, France). Hen egg white lysozyme, in lyophilized form with a specific activity of 70,000 specific units/mg, analytical grade imidazole (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), acetic acid, sodium hydroxide (NaOH), and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). One unit of lysozyme activity corresponds to the quantity of lysozyme enhancing a 0.001 decrease in 450 nm absorbance in 1 min of a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* (as substrate) at pH 6.24 and 25 °C. Maltodextrin DE 19 was obtained from Roquette-frères SA, (Lestrem, France). Deionized water was used for the preparation of all solutions.

### 2.2. Lysozyme and LM pectin solutions preparation

Stock solutions of lysozyme (7.142 g.L<sup>-1</sup> = 5 × 10<sup>8</sup> specific units/L) and LM pectin (30 g/L) were prepared by dispersing powders in an imidazole-acetate buffer (5 mM) at pH 7 and stirred for at least 2 h with a magnetic stirrer until the proper hydration was reached. The pH was adjusted by adding HCl (1 mM) or NaOH (1 mM). LM pectin solution was then centrifuged (10,000 × g; 30 min) (Sigma 3K18, Bioblock Scientific, Illkirch, France) to remove insoluble residues.

### 2.3. Zeta potential measurement

The zeta potential ( $\zeta$ -potential) of lysozyme and LM pectin was determined using a Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). The samples were diluted (0.5% (w/w)) with imidazole-acetate buffer adjusted to the suitable pH value. The mean  $\zeta$ -potential (ZP) values ( $\pm$ SD (standard deviation)) were obtained from the instrument.

### 2.4. Lysozyme/LM pectin complex formation and turbidity measurement

Biopolymer mixtures containing lysozyme (0.714 g/L = 5 × 10<sup>7</sup> specific units/L) and LM pectin (0–4 g/L) were prepared by mixing different ratios of the stock solutions with imidazole-acetate buffer at pH 7. The resulting suspensions were mixed for 1 min using a vortex mixer and their pH was adjusted again. Turbidity measurements were performed with a UV/Vis spectrophotometer (Jenway 3705, Villepinte, France). The absorbance was measured at 600 nm at room temperature (25 °C) against pure lysozyme solutions (without LM pectin) in imidazole-acetate buffer (5 mM; pH 7).

### 2.5. Spray-drying of lysozyme/LM pectin complexes

The suspensions of lysozyme/LM pectin complexes prepared in imidazole-acetate buffer (5 mM; pH 7) containing 20 wt.% maltodextrin DE 19 were dried in a laboratory scale spray-drier equipped with a 0.5 mm nozzle atomizer (Mini spray-dryer B-290, BUCHI, Switzerland). Suspensions were pumped to the spray-drier at a feed rate of 0.5 L/h at room temperature and dried at an inlet temperature of 180 °C and an outlet temperature of 90 °C. The dried powders were collected and stored in airtight containers at 4 °C. Dry powders were then weighted and mixed with imidazole/

acetate buffer (5 mM, pH 7) to obtain reconstituted suspensions of complexes with the same dry matter as before drying (the residual moisture was taken into account). After 1 h of rotation at approximately 200 rpm, samples were analyzed.

2.6. Scanning electron microscopy (SEM)

Spray-dried microcapsules were attached to a sample stub with double-sided sticky tape. Then, the specimens were sputter coated with gold using a Polaron SC 7620 Mini Sputter Coater and examined using a Philips scanning electron microscope (SEM-FEI XL30 ESEM) at an accelerating voltage of 10 or 15 kV.

2.7. Lysozyme activity evaluation

Lysozyme activity was assayed by monitoring the reduction of absorbance at 450 nm (OD<sub>450</sub>) due to the lysis of *M. lysodeikticus* cells by lysozyme at 25 °C. Briefly, in a 1 cm cuvette, 2.9 mL of the *M. lysodeikticus* suspension (OD<sub>450</sub> = 1) in 5 mM imidazole-acetate buffer adjusted to pH 7 and 0.1 mL of the enzyme solution (prepared at the same pH) were mixed quickly, and the reduction in the absorbance was recorded using an UV/Vis spectrophotometer (Jenway 3705, Villepinte, France) until reaching a plateau. Lysozyme activity was calculated from the slope of the initial linear portion of absorbance vs. time curve. The hydrolytic activity of the lysozyme solution can be calculated using formula (1) below (one unit was 0.001 change in absorbance in one minute):

$$Activity(U/mL) = \frac{S}{0.001 \times V} \tag{1}$$

where S is the slope of the initial linear portion of absorbance vs. time curve and V is the volume of lysozyme solution (0.1 mL).

2.8. Fluorescence of lysozyme/LM pectin complexes

Changes of lysozyme's intrinsic fluorescence upon complexation with LM pectin and spray-drying were monitored at pH 7 in a wavelength range of 300–500 nm following an excitation at 280 nm. The excitation and emission bandwidths were 6 nm and 3 nm, respectively. Intrinsic fluorescence intensity measurements were performed with a LS 55 spectrofluorometer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). All measurements were performed at room temperature (25 °C) using a quartz cuvette (1 cm path length).

2.9. UV–vis absorption measurements

UV absorption spectra were measured from 200 nm to 350 nm with an UV/Vis spectrophotometer (Lightwave II 109233, Biochrom, Cambridge, UK) in a 1 cm quartz cuvette at 25 °C against imidazole-acetate buffer (5 mM; pH 7). Samples were diluted 10 times in buffer before assays.

2.10. Statistical analysis

All experiments were performed using at least three freshly prepared samples. The results presented are the averages and standard deviations that were calculated from these replicate measurements.

3. Results and discussion

3.1. Lysozyme-LM pectin interactions

To characterize the influence of pH on the electrostatic charge of

lysozyme and LM pectin, Zeta potential measurements were performed on both biopolymers separately (Fig. 1). As the pH was increased from 3.0 to 11.0, the positive charge on the lysozyme molecules decreased and changed from positive to negative at a point of zero charge around 10.8. LM pectin was negatively charged from 3.0 to 11.0, but the magnitude of the charge increased significantly above pH 4.0, which can be attributed to deprotonation of the carboxylic groups on the pectin backbone. In the mixed biopolymer suspensions at pH 7 (condition used in this work), one would therefore expect the positively charged patches on the lysozyme molecules to interact with negatively charged segments of the LM pectin molecules, leading to the formation of electrostatic complexes. In fact, the negative charges carried by LM pectin at pH 7 were relatively important promoting electrostatic interactions with lysozyme which is characterized by a higher positive electric charge at this pH (Fig. 1).

3.2. Morphology of spray-dried complexes

Fig. 2 shows the scanning electron micrographs of the dry microcapsules obtained by spray-drying lysozyme/pectin complexes by using maltodextrins as a drying matrix. Whatever the pectin concentration, dried microcapsules consisted of well-separated spherical particles, having similar diameters (2–20 μm), rounded shape, and smooth surface with some dents. Some broken microcapsules showed the internal structure of the microcapsules that consisted of a thicker shell matrix and an air bubble (so called void) at the center of the microcapsule. It has been reported that void formation is caused by expansion of air bubbles trapped inside the droplet. The mechanisms associated with the formation of these central voids are related also to the expansion of the particles during the latter stages of the drying process (Teixeira et al., 2004). Thus, the formation of large voids could be attributed to the higher viscosity caused mainly by maltodextrins and lysozyme/pectin aggregates in the feed suspension. According to Fig. 2, pectin concentration did not have a remarkable effect on the aspect of the obtained microcapsules. Indeed, the shear undergone during the spray-drying process may cause the dissociation of complex aggregates. In addition, the presence of maltodextrins generates a “dilution” of these complexes in the powder making it difficult to distinguish the morphological differences between microcapsules containing various levels of pectin.

3.3. Turbidity measurements

The effect of both complex coacervation and spray-drying on the turbidity of suspensions containing lysozyme at a constant

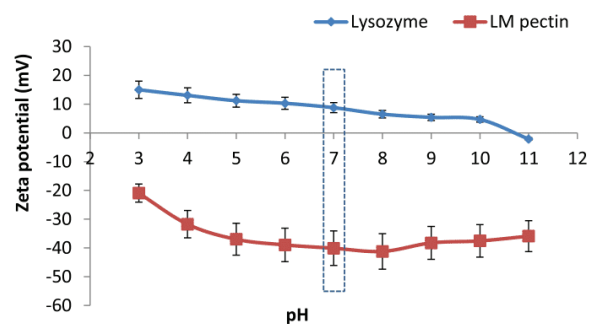


Fig. 1. Dependence of the ζ-potential of lysozyme and LM pectin on pH (5 mM imidazole-acetate buffer).

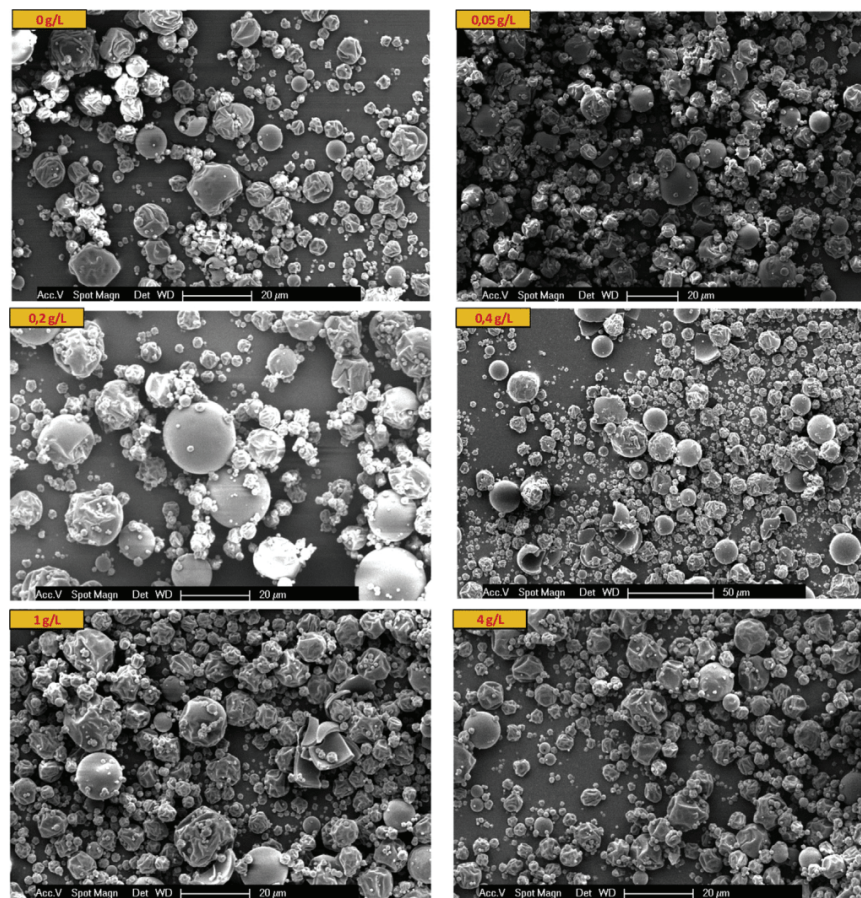


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of spray-dried lysozyme/LM pectin complexes containing different LM pectin concentrations (0–4 g/L) and a constant lysozyme concentration (0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) in the presence of maltodextrin DE 19 (20 wt.%) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).

concentration (0.714 g/L) and LM pectin at different concentrations (0–4 g/L) was examined (Fig. 3). In our previous work, we have shown that aggregation of complexes, which is the main reason for increasing turbidity value, is related to the establishment of electrostatic interactions between anionic pectin molecules and free

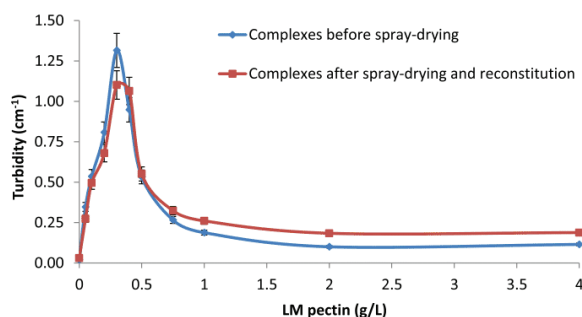


Fig. 3. LM pectin concentration dependency of turbidity (at 600 nm) of unprocessed and spray-dried lysozyme/LM pectin complexes at different LM pectin concentrations (0–4 g/L) and a constant lysozyme concentration (0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).

lysozyme cationic sites at the surface of individual complexes (Bayarri et al., 2014). Turbidity reduced by increasing LM pectin concentration from 0.4 g/L, demonstrating that high negatively charged free LM pectin molecules inhibited aggregation of complexes due to high repulsive electrostatic forces. Thus, by increasing the amount of LM pectin, turbidity decreased as a result of gradual dissociation of aggregates for reformation of smaller ones and/or individual complexes. Minimum turbidity value could indicate that all charged sites of lysozyme at 0.714 g/L concentration are saturated with pectin molecules by electrostatic forces.

Reconstituted spray-dried complexes showed maximum turbidity at the same pectin concentration as unprocessed complexes (0.4 g/L) due to extensive biopolymer aggregation at this concentration. However, it can be seen from Fig. 3 that spray-dried biopolymer complexes had lower maximal turbidity compared to unprocessed complexes. In fact, application of shear, heat, and dehydration stresses during spray-drying can destabilize the configuration of aggregates resulting in their partial dissociation and/or increasing the number of individual complexes at intermediate LM pectin concentration (Jones et al., 2009). The turbidity value reached a plateau for 1 g/L LM pectin concentration for both types of complexes but with slight higher values for spray-dried complexes. Larger aggregates could be formed after spray-drying as the LM pectin concentration increased which can be observed

by high turbidity of spray-dried complexes at high pectin concentrations. Consequently, we can assume that when the pectin concentration increased, strong electrostatic repulsions make complexes more susceptible to thermal aggregation.

### 3.4. Antimicrobial activity

The aim of this section was to study the effect of spray-drying along with increasing LM pectin concentration on lysozyme antimicrobial activity that is determined by evaluating the initial degradation kinetics of the *M. lysodeikticus* cell wall. It can be seen from Fig. 4, that addition of pectin decreased gradually lysozyme activity that reached its minimum value at 0.4 g/L pectin concentration. Then, from 0.4 g/L pectin concentration, antimicrobial activity of lysozyme increased and reached a plateau at 1 g/L pectin concentration for both types of complexes. Main reasons for reduction of enzyme antimicrobial activity upon addition of pectin concentration can include (Bayarri et al., 2014): (i) decreased enzyme mobility due to immobilization through complexation within pectin network; (ii) substrate diffusional limitations as a result of reduced enzyme molecular flexibility upon immobilization; (iii) inaccessibility of some active sites of hidden complexed lysozyme to substrate; and (iv) decreased interactions between lysozyme/anionic sites of microbial cell wall because of lysozyme-pectin electrostatic interactions. Lowest activity of lysozyme at pectin concentration relating to highest solution turbidity may be the result of slower substrate diffusion compared with free lysozyme. However, increased polysaccharide concentration led to formation of small and high mobile individual complexes contributing to higher lysozyme activity (Bayarri et al., 2014).

According to Fig. 4 reconstituted spray-dried lysozyme (without added pectin) showed a decrease in its antimicrobial activity (5435 U/mL) than unprocessed one (8560 U/mL) (residual activity: 63.5%). In fact, applied spray-drying conditions had a notable effect on the biological activity of lysozyme although the protective effect of maltodextrins on protein structure against unfolding and denaturation that is considered as the main reason of activity loss. By increasing polysaccharide concentration in the spray-drying feed suspensions, one can distinguish three phases (Fig. 4): during the first phase (0–0.2 g/L), pectin concentration was not sufficient to protect lysozyme during the spray-drying process. Consequently, the residual activity after drying was lower than that of feed suspensions. During the second phase (0.2–0.4 g/L) the enzymatic activity of lysozyme was preserved and the values measured after drying were the same than that obtained before drying. For the last phase (0.4–4 g/L), Fig. 4 shows a decrease in the lysozyme activity

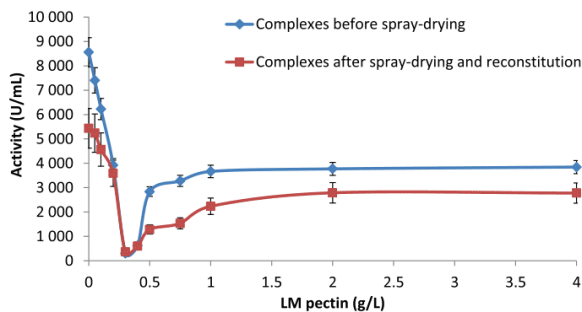


Fig. 4. LM pectin concentration dependency of the antimicrobial activity of unprocessed and spray-dried lysozyme/LM pectin complexes at different pectin concentrations (0–4 g/L) and a constant lysozyme concentration (0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).

after drying probably because of the increased aggregation during this phase (Fig. 3) thereby reducing the mobility and the accessibility of the enzyme.

All of these results show that the spray-drying effect was lower at intermediate pectin concentrations. In fact, if low concentrations did not provide sufficient protection to lysozyme, high pectin concentrations increased the interaction forces and destabilized the lysozyme structure, which led to an increase in turbidity and a decrease in the residual activity.

### 3.5. Fluorescence spectra of lysozyme-LM pectin complexes

The fluorescence emission spectra of free lysozyme and reconstituted spray-dried lysozyme in an imidazole-acetate buffer at pH 7 after excitation at 280 nm were investigated (Fig. 5). Spray-dried lysozyme exhibited a slight decrease in fluorescence maximum wavelength ( $\lambda_{max}$ ) compared to of unprocessed free lysozyme. Moreover, the fluorescence intensity of spray-dried lysozyme was lower than that of unprocessed lysozyme. One probable reason for decreasing of fluorescence intensity after applying spray drying could be related to a thermal quenching phenomenon mainly due to increasing the probability of intermolecular collisions and non-radiative transitions (Yamamoto et al., 2006). In fact, fluorescence intensity of native proteins is highly sensitive to temperature and can be decreased upon heat treatment (Albani, 2004). In the case of lysozyme, this decrease in the fluorescence intensity may be due to some conformational changes inducing the partial hiding of aromatic amino acids in the hydrophobic core.

Fluorescence emission spectra of lysozyme were collected following addition of LM pectin at concentrations varying from 0 to 4 g/L (Fig. 6). It can be observed that the maximum intrinsic fluorescence intensity (determined from the fluorescence emission spectra) of lysozyme changed following the addition of LM pectin. The changes in the intensity of the emission maxima recorded were consistent with the molecular interactions between LM pectin and lysozyme leading to complex formation and aggregation previously monitored by measuring the turbidity (Fig. 3).

Concerning the suspensions before spray-drying, fluorescence intensity peak was observed at a LM pectin concentration of 0.2 g/L (Fig. 6). From 0 to 0.2 g/L pectin concentration, complexation/aggregation with the polysaccharide can be considered as an immobilization of lysozyme that may lead to a decrease in its local mobility and therefore an increase in its fluorescence intensity. When the pectin concentration exceeded that corresponding to the fluorescence peak, one can observe a rapid decrease in fluorescence emission intensity which can be correlated to the dissociation of aggregates and the corresponding increase of lysozyme mobility as

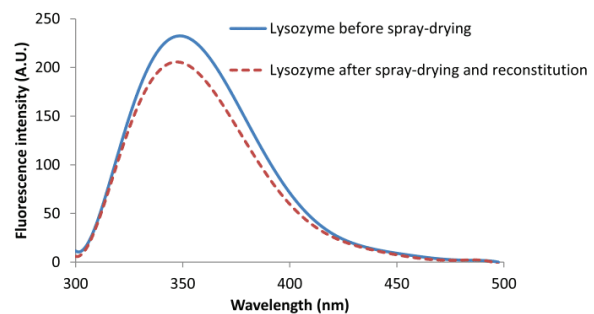


Fig. 5. Fluorescence spectrum of lysozyme before and after spray-drying/reconstitution (wavelength of excitation: 280 nm) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).



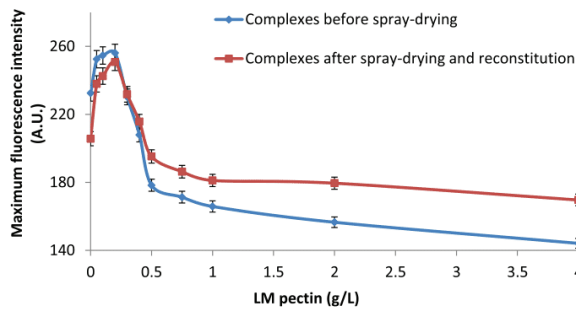


Fig. 6. Maximum fluorescence intensity of lysozyme/LM pectin complexes before and after spray-drying/reconstitution (wavelength of excitation: 280 nm) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).

a consequence. However, it is important to note that the maximal fluorescence intensities at higher pectin concentrations were significantly lower than those recorded for free lysozyme (pectin: 0 g L<sup>-1</sup>) (Fig. 6). This may be due to the competition of negatively charged groups in pectin (being largely in excess at the dissociation phase) for the positively charged binding sites on the protein surface. In fact, increasing LM pectin concentration could cause an increase in electrostatic forces, especially at pH 7, at which pectin chains are clearly negatively charged (Fig. 1). If we assume a “caging” phenomenon of lysozyme in pectin polymer network as proposed by Bayarri et al. (2014), one can assume that lysozyme “is exchanged” between different pectin chains, increasing thus its mobility and leading to a significant decrease in the fluorescence intensity compared to uncomplexed lysozyme. In addition, reduced intensity could be attributed to shielding effect of the pectin molecules bound to lysozyme molecules (Liu et al., 2012) that can form ground state complexes which mask fluorescent contributions of Trp residues.

Compared to unprocessed complexes, after spray-drying/reconstitution the lysozyme intrinsic fluorescence decreased when pectin concentration was ranged between 0 and 0.2 g/L (Fig. 6). This could be due to the enzyme mobility increase caused by the dissociation of aggregates during spray-drying. This result is in agreement with turbidity measurements that showed reconstituted suspensions were less turbid than that of feed complexes (Fig. 3). From 0.2 to 0.4 g/L pectin concentration, the fluorescence intensities of spray-dried complexes were similar to that of unprocessed ones. Thus, we can suppose that at intermediate polysaccharide concentrations, the tertiary structure of lysozyme was preserved during the drying process. This structural stability can be correlated to the preservation of antimicrobial activity at this pectin concentration range (Fig. 4). From 0.5 to 1 g/L pectin concentration, the fluorescence intensity of spray-dried complexes was remarkably higher than that of unprocessed lysozyme/LM pectin complexes (Fig. 6). In this pectin concentration range, Fig. 3 had showed that the drying process increased the turbidity of complexes due to the formation of larger aggregates limiting lysozyme mobility and thus increasing the fluorescence intensity.

It is known that a better indication for the environment of fluorophore is determining the wavelength of the emitted light. According to Fig. 7, in feed suspensions of complexes (before spray-drying) increasing LM pectin concentration until 0.3 g/L resulted in shift of maximum intensity wavelength value of lysozyme-pectin complexes to shorter wavelength (blue shift) to that of free lysozyme. This lowest  $\lambda_{max}$  could indicate highest protein/polysaccharide complex formation and aggregation. Indeed, This LM pectin concentration (0.3 g/L) could be perfectly correlated with the

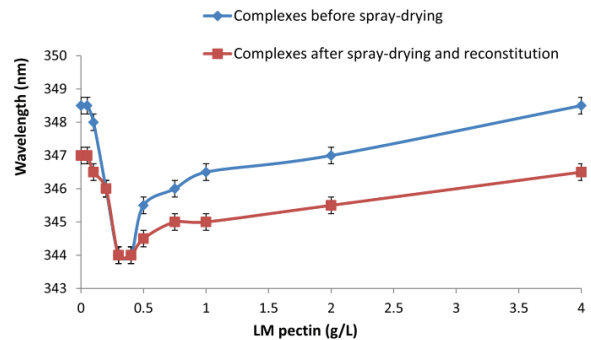


Fig. 7. Emission wavelengths corresponding to the maximum fluorescence intensities of lysozyme/LM pectin complexes before and after spray-drying/reconstitution (wavelength of excitation: 280 nm) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).

end of the aggregation phase (Fig. 3). It can be concluded that lysozyme Trp residues in formed complexes were more surrounded by hydrophobic environment leading to more compacted tertiary conformation through protein folding (Liu et al., 2012). This result suggests that the most important changes in the lysozyme structure occurred at the end of the aggregation. The increment in the LM pectin concentration during the dissociation phase (from 0.4 to 4 g/L) produced an increase in the  $\lambda_{max}$  (Fig. 7) (red shift) reflecting a higher exposure of the protein hydrophobic segments to a more polar environment, which is in accordance with the fluorescence intensity (Fig. 6) and turbidity (Fig. 3) decreases. The increase in the wavelength may also be a reflection of the protein tendency to recover its original conformation during the dissociation phase.

The effect of spray-drying on the structural stability of lysozyme can be summarized as follows (Fig. 7): (i) for low concentrations of pectin (0–0.2 g/L), the obtained  $\lambda_{max}$  values were lower than those of unprocessed complexes. This may reflect the sensitivity of free and partially complexed lysozyme to drying stresses which resulted in protein folding; (ii) for intermediate concentrations of pectin (0.2–0.4 g/L), wavelengths corresponding to the maximum intensity were very close to those obtained before drying. We can therefore assume that these intermediate polysaccharide concentrations were able to better protect the tertiary structure of lysozyme; (iii) when the pectin concentration exceeds 0.5 g/L, lysozyme which is located within aggregated complexes (Fig. 3) and less mobile (Fig. 6) undergone more changes of its tertiary structure (Fig. 7) which could be the cause of the decline in its activity (Fig. 4). The increase in attractive forces between the pectin chains could cause destabilization of the lysozyme structure followed by a change in its spatial conformation.

### 3.6. UV–vis spectra of lysozyme-LM pectin complexes

UV–vis absorption spectra were used to study the changes of protein conformation before and after spray-drying (Fig. 8). The absorption spectra of lysozyme exhibited two main peaks. The first peak was located in the far UV region (226 nm) and reflected the protein secondary structure. The second absorption peak at 280 nm is generally attributed to the aromatic amino acids residues (Trp, Tyr, and Phe). No obvious variations occurred in lysozyme UV–vis absorption spectra after spray-drying suggesting that this process did not cause important changes in the conformation of lysozyme polypeptide backbone. UV–vis absorption spectra of lysozyme for an increasing LM pectin concentration (0–4 g/L) were recorded in order to explore lysozyme conformational changes induced by LM pectin. The absorbance intensity maxima at 226 nm and 280 nm of

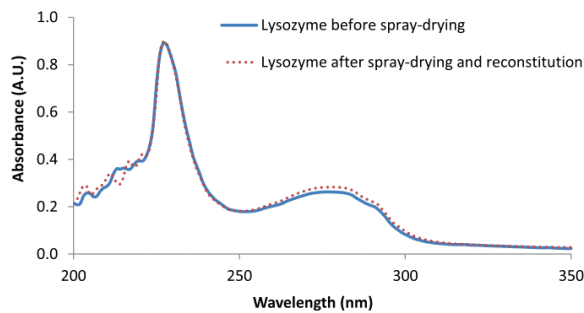


Fig. 8. UV–Vis absorption spectrum of lysozyme before and after spray-drying/reconstitution (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).

LM pectin/lysozyme complexes changed without any shift of the wavelength of these peaks with increasing LM pectin concentration (data not shown). In order to study the effect of LM pectin complexation on the molecular properties of lysozyme, the variation of the intensity at 280 nm was determined from the recorded UV–vis absorption spectra (Fig. 9).

For feed complexes, the absorbance at 280 nm changed suggesting that the microenvironment of the aromatic amino acids was changed by pectin addition and that pectin bound to lysozyme in a concentration dependent manner (Fig. 9). With gradual addition of pectin to lysozyme solution, the absorbance at 280 nm decreased significantly until a pectin concentration of 0.2 g/L. The slight decrease in the absorbance during the complexation and aggregation phases suggests that the protein structure of lysozyme slightly changed (Li and Li, 2011). This may imply that the binding of LM pectin to lysozyme could have led to a concealment of aromatic amino acids residues due to secondary structure unfolding. After reaching its minimal intensity, a leap of absorbance was observed: absorbance at 280 nm was maximal at a LM pectin concentration of 0.5 g/L. This significant UV absorption intensity increase may denote the end of lysozyme structural rearrangement due to complexation which could be an indicator of the beginning of aggregates dissociation leading to individual complexes formation (Bayarri et al., 2014). Above LM pectin concentration corresponding to the absorbance maximum, there was a gradual decrease in the absorbance to reach a plateau at a LM pectin concentration of about 2 g/L (Fig. 9) (corresponding to the presence of individual LM pectin/lysozyme complexes (Bayarri et al., 2014)) and remained constant even when LM pectin concentration was further increased. Thus, one can suppose that the lysozyme backbone modifications caused by LM pectin complexation could be

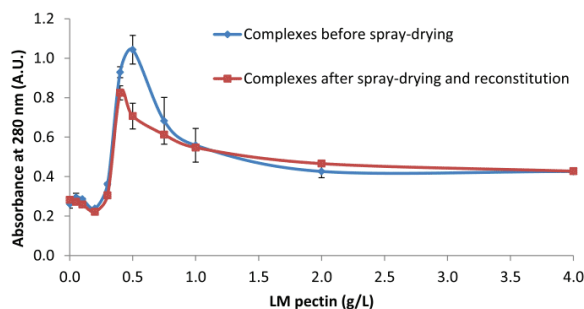


Fig. 9. Absorbance at 280 nm of lysozyme/LM pectin complexes before and after spray-drying/reconstitution (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 7).

reversible and that the enzyme regained its structure and consequently its antimicrobial activity. This hypothesis has been confirmed in a previous study showing that the treatment of these complexes by pectinolytic enzymes had allowed recovering the lysozyme activity (Bayarri et al., 2014).

According to Fig. 9, it is observed that spray-dried and unprocessed complexes had the same absorbance profiles when pectin concentration was changed. However, maximum absorbance of spray-dried lysozyme/pectin complexes was lower than unprocessed complexes. As it was shown previously in Fig. 3, spray-drying of complexes at intermediate polysaccharide concentration resulted in decreased complex aggregation and formation of more individual complexes than unprocessed ones due to shearing and heating stresses undergone during spray-drying process. This decrease in the absorbance observed in the dissociation phase (0.4–1 g/L) shows that during this phase the lysozyme structure was modified by the spray-drying treatment which may explain the decrease in its activity observed previously during this phase (Fig. 4).

#### 4. Conclusion

Spray-drying of lysozyme/LM pectin complexes resulted in encapsulation of the antimicrobial enzyme in different polysaccharide networks formed by increasing pectin concentrations. Formation of electrostatic biopolymer complexes increased turbidity of the solution and decreased lysozyme antimicrobial activity. Upon applying spray-drying more individual complexes with lower aggregation were formed at intermediate pectin concentration. Spray-dried lysozyme showed a decrease in its antimicrobial activity of about 36.5%. However, complexation with intermediate pectin concentrations was shown to protect lysozyme activity during spray-drying process. However, spray-dried lysozyme/pectin complexes exhibited significant activity reduction at lowest and highest pectin concentrations than unprocessed complexes probably due insufficient protection ability and substrate inaccessibility toward active site of encapsulated enzyme, respectively. At these intermediate pectin concentrations, the fluorescence intensities and the corresponding wavelengths of spray-dried complexes were similar to that of unprocessed ones indicating that the tertiary structure of lysozyme was preserved during the drying process. The results obtained in this study suggest that the complexation of lysozyme by pectin concentrations allowing to high turbidity values is an effective way to preserve the antimicrobial activity of this enzyme during the encapsulation by spray-drying. However, other techniques such as Fourier Transform Infrared (FTIR) or circular dichroism should be used to elucidate the molecular mechanisms associated with the protection of lysozyme by pectin chains during spray-drying.

#### References

- Albani, J.R., 2004. Chapter 7-origin of proteins fluorescence. In: Albani, J.R. (Ed.), *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 237–260.
- Aryee, F.N.A., Nickerson, M.T., 2012. Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides. *Food Res. Int.* 48, 520–527.
- Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., Gharsallaoui, A., 2014. Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *J. Food Eng.* 131, 18–25.
- Bernard, C., Broyart, B., Vasseur, J., Granda, P., Relkin, P., 2008. Enhancement of protein structure-forming properties in liquid foams by spray drying. *Dairy Sci. Technol.* 88, 65–80.
- Bierhalz, A.C.K., da Silva, M.A., Kieckbusch, T.G., 2012. Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *J. Food Eng.* 110, 18–25.
- Brannen, J.K., Davidson, P.M., 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 63–74.

- Cousin, F., Gummel, J., Ung, D., Boué, F., 2005. Polyelectrolyte–protein complexes: structure and conformation of each specie revealed by SANS. *Langmuir* 21, 9675–9688.
- deWit, J.N., Klarenbeek, G., 1984. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.* 67, 2701–2710.
- Girod, S., Boissière, M., Longchambon, K., Begu, S., Tourne-Pétheil, C., Devoisselle, J.M., 2004. Polyelectrolyte complex formation between iota-carrageenan and poly(L-lysine) in dilute aqueous solutions: a spectroscopic and conformational study. *Carbohydr. Polym.* 55, 37–45.
- Jones, O.G., Decker, E.A., McClements, D.J., 2009. Formation of biopolymer particles by thermal treatment of  $\beta$ -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocoll.* 23, 1312–1321.
- Li, S., Li, D., 2011. Investigation on the pH-dependent binding of benzocaine and lysozyme by fluorescence and absorbance. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 82, 396–405.
- Liao, Y.-H., Brown, M., Nazir, T., Quader, A., Martin, G., 2002. Effects of sucrose and trehalose on the preservation of the native structure of spray-dried lysozyme. *Pharm. Res.* 19, 1847–1853.
- Liu, Y., Zhao, G., Zhao, M., Ren, J., Yang, B., 2012. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. *Food Chem.* 131, 901–906.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J., 1998. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38, 689–753.
- Teixeira, M.I., Andrade, L.R., Farina, M., Rocha-Leão, M.H.M., 2004. Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. *Mater. Sci. Eng. C* 24, 653–658.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O’Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J., 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5987–6000.
- Turgeon, S.L., Schmitt, C., Sanchez, C., 2007. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12, 166–178.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., de Kruif, C.G., 2003. Complex formation of whey proteins: exocellular polysaccharide EPS B40. *Langmuir* 19, 9404–9410.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., de Kruif, C.G., 2004. Complexation of whey proteins with carrageenan. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3550–3555.
- Wu, X., Narsimhan, G., 2008. Effect of surface concentration on secondary and tertiary conformational changes of lysozyme adsorbed on silica nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Proteins Proteom.* 1784, 1694–1701.
- Yamamoto, T., Fukui, N., Hori, A., Matsui, Y., 2006. Circular dichroism and fluorescence spectroscopy studies of the effect of cyclodextrins on the thermal stability of chicken egg white lysozyme in aqueous solution. *J. Mol. Struct.* 782, 60–66.
- Ye, A., 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 406–415.
- Zhang, H.-M., Tang, B.-P., Wang, Y.-Q., 2010. The interaction of lysozyme with caffeine, theophylline and theobromine in solution. *Mol. Biol. Rep.* 37, 3127–3136.

### **III.2.3. Conclusion**

Dans cet article, il a été montré que le lysozyme a été efficacement encapsulé en présence de concentrations croissantes en pectine pour former différentes matrices polysaccharidiques. L'ajout de quantités croissantes de pectine à une quantité fixe en lysozyme a entraîné une augmentation de la turbidité et une diminution de l'activité enzymatique du lysozyme. Les résultats ont également montré que les agrégats de complexes formés à des concentrations en pectine intermédiaires ont subi une dissociation partielle durant le séchage par atomisation qui pourrait être due au cisaillement, à la déshydratation et/ou au traitement thermique. Toutefois, à ces mêmes concentrations en pectine, il a été démontré que la structure du lysozyme ainsi que son activité enzymatique ont été mieux préservées. Les résultats de cette étude sont intéressants dans la mesure où l'interaction du lysozyme avec la pectine, à certaines concentrations permettant d'avoir des turbidités élevées, représente une alternative intéressante pour protéger le lysozyme contre le cisaillement et le traitement thermique auxquels il est sujet durant le séchage par atomisation.

### **III.3. Films antimicrobiens à base de complexes lysozyme/alginate**

#### **III.3.1. Introduction**

Dans le but de développer un système d'encapsulation à base de complexes protéines/polysaccharides, il nous a semblé nécessaire de comprendre la nature et l'intensité des interactions qui peuvent avoir lieu entre le lysozyme et l'alginate de sodium, un polysaccharide anionique non estérifié. La formation de complexes protéines/polysaccharides *via* des interactions électrostatiques est un processus réversible puisque ces complexes peuvent se dissocier lors d'un changement du pH ou de la force ionique. Cette étude a été conduite à pH neutre (pH 7) en ajoutant des quantités croissantes d'alginate à une quantité fixe de lysozyme pour expliquer les conséquences de cet ajout sur les propriétés moléculaires du lysozyme, sur son activité enzymatique ainsi que sur son activité antimicrobienne lorsqu'il est incorporé dans des films à base d'alginate. L'effet de la force ionique sur les interactions entre ces deux biopolymères a été également évalué pour mieux comprendre si les changements au niveau de l'activité enzymatique du lysozyme sont dus à une limitation de la diffusion du substrat au niveau du site actif du lysozyme ou plutôt à une modification de sa structure suite à son interaction avec l'alginate. Les résultats obtenus, présentés sous forme d'un article original de recherche publié dans le journal « *Food Research International* » en 2016 apportent des éléments permettant d'expliquer les caractéristiques des complexes lysozyme/alginate obtenus et d'estimer l'intérêt de leur utilisation potentielle pour le développement de films d'emballage antimicrobiens.

#### **III.3.2. Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films**



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)



## Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films



Chedia Ben Amara<sup>a</sup>, Noushin Eghbal<sup>b</sup>, Nadia Oulahal<sup>a</sup>, Pascal Degraeve<sup>a</sup>, Adem Gharsallaoui<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Univ Lyon, Université Lyon 1, ISARA Lyon, Laboratoire BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France

<sup>b</sup> Department of Food Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 June 2016

Received in revised form 7 August 2016

Accepted 13 August 2016

Available online 15 August 2016

#### Keywords:

Lysozyme

Sodium alginate

Complexation

Enzymatic activity

Molecular structure

Antimicrobial edible film

### ABSTRACT

Complexation study of lysozyme (0.714 g/L) by sodium alginate at pH 7 showed that aggregates formation was a two-phase process. The first phase (from 0 to 0.1 g/L sodium alginate) corresponded to the combination of individual complexes to form aggregates which caused an increase of turbidity and average size and a rapid sedimentation. Charge neutralization estimated by  $\zeta$ -potential measurements occurred at 0.1 g/L sodium alginate concentration. The second phase (from 0.1 to 4 g/L of sodium alginate) was characterized by the formation of aggregates having a less dense structure with higher average size despite the drop in turbidity and the high dispersion in the medium. Lysozyme enzymatic activity decreased upon complexation with sodium alginate but was fully recovered after calcium chloride addition. In order to check whether lysozyme reversible inactivation was only due to substrate diffusion limitation or to conformational changes upon complexation, fluorescence and UV–Vis absorption measurements were performed. Moreover, lysozyme/sodium alginate complexes were used to manufacture an edible antimicrobial film to target lysozyme sensitive microorganisms.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recently, Fuenzalida and Goycoolea (2015) reviewed soft nanomaterials resulting from self-assembly of negatively charged weak polyelectrolyte polysaccharides and oppositely charged proteins and considered these novel soft materials as promising in expanding the domain of biomedical and biotechnological applications of proteins. Polysaccharide–protein complexes can be exploited to improve stability, reduce immunogenicity and/or control the release of lysozyme for biomedical and biotechnological applications. However, although many studies concerned protein–polysaccharide interactions in various food systems (Tolstoguzov, 2003), further fundamental studies are needed to improve our understanding of (i) proteins stabilization/destabilization or mobility in proteins–polysaccharide complexes and of (ii) parameters like the molecular characteristics of biopolymers as well as medium conditions like pH, ionic composition and temperature which affect polysaccharide–protein interactions (Jones & McClements, 2010). Particularly, interactions between proteins and polysaccharides can lead to complex formation or thermodynamic incompatibility. Proteins and anionic polysaccharides are able to form electrostatic complexes at pH values between the isoelectric point (pI) of the protein and the pKa value of the anionic groups of the polysaccharide.

Complexation of a protein with other biopolymers can improve its functional properties. Indeed, it has been shown that some protein functional properties including solubility, surface activity, conformational stability, emulsifying and foaming properties are influenced by interacting with different polysaccharides (Ye, 2008). However, complexation *via* electrostatic interactions is considered as a reversible process which can be dissociated by increased ionic strength and/or changing the pH.

Natural antimicrobial agent, lysozyme (EC.3.2.17), also called muramidase is a small hydrolase type and ubiquitous enzyme in nature that is present in almost all secretions, human and animal tissues and avian eggs. The lysozyme monomer exhibits strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria *via* breaking  $\beta$  1–4 linkage of glycosidic bonds of *N*-acetyl muramic acid (NAM) and *N*-acetyl glucosamine (NAG) of bacterial cell wall peptidoglycan polymers. Coverage of peptidoglycan layer (substrate of lysozyme) with lipopolysaccharide (LPS) and lipoproteins in Gram-negative bacteria lowers their susceptibility to the antibacterial activity of lysozyme. Hen egg white lysozyme (E1105) is a widely used enzyme authorized for food preservation in European Union under 2008/1333/EC Regulation on food additives. It has also been accepted as an antimicrobial agent in ready-to-eat products by Food and Drug Administration (2000) in the U.S.A. (Lucera, Costa, Conte, & Del Nobile, 2012). This globular protein consists of 129 amino acid residues and has a molecular weight of 14.3 kDa. It is known as a thermophilic enzyme with high stability over a wide pH

\* Corresponding author.

E-mail address: [adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr](mailto:adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr) (A. Gharsallaoui).

range (Makki & Durance, 1996). Net positive charge of lysozyme across an extended range of pH as a result of its high isoelectric point (pI) of 10–11, makes it possible to form complexes with anionic polysaccharides. This possibility has already been investigated for sodium dextran sulfate and chondroitin sulfate C sodium salt (Takahashi, Uchida, & Izumi, 2011), low methoxyl (LM) pectin (Bayarri, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2014; Ben amara, Eghbal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2016; Ormus, Oulahal, Noël, Degraeve, & Gharsallaoui, 2015) and recently sodium alginate (Fuenzalida et al., 2016).

Alginates, natural, hydrophilic and biocompatible polysaccharides, are salts of alginic acids. Algae and bacteria (*Azotobacter* and *Pseudomonas*) are two important sources for the production of alginates. However, commercial alginates are mainly derived from cell wall of brown marine algae (*Phaeophyceae*) mainly by alkaline extraction processes (Goh, Heng, & Chan, 2012). They are binary copolymers made up of  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) and  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) residues, linearly linked via 1–4 linkages. So an alginate molecule is considered as a block copolymer consisting of three types of G, M, and GM blocks with different relative proportions that determine physico-chemical and functional properties of alginates (Draget, Smidsrød, & Skjåk-Bræk, 2005). Tendency of alginates to be negatively charged over a wide range of pH values is attributed to dissociation constants of 3.38 for mannuronic (M) and 3.65 for guluronic acid (G) monomers (Harnsilawat, Pongsawatmanit, & McClements, 2006). Being a stabilizer and a thickener, sodium alginate, the main used form, is applied in various food products including drinks like chocolate milk, deserts like ice cream, jelly, sauces, and soups (Goh et al., 2012). Alginate is able to form a gel structure in the presence of divalent cations like  $\text{Ca}^{2+}$  that interact with deprotonated carboxyl groups.

Some reports have shown the ability of sodium alginate to form complexes with food proteins under different physico-chemical conditions. In fact, advantages of using alginate for complex formation with proteins like whey proteins and fish gelatin were identified long ago and include food acceptability, reversible electrostatic complex formation, cold gelling nature, and ion-exchange properties (Clare, 1993). Complexation between sodium alginate and different proteins like  $\beta$ -lactoglobulin (Harnsilawat et al., 2006), and whey protein isolate (Fioramonti, Perez, Aringoli, Rubiolo, & Santiago, 2014) has been reported. In these studies, the effect of various parameters such as pH, heating temperature, and polysaccharide/protein ratio on the properties of formed alginate-protein complexes were discussed. In a recent article, Fuenzalida et al. (2016) have shown that the properties of lysozyme/alginate complexes are dependent on the alginate chain composition (M/G ratio), their molecular weight, and the presence of calcium ions.

Although lysozyme has been encapsulated in various calcium alginate-based matrices in order to control its release kinetics (Borgogna, Bellich, Zorzini, Lapasin, & Cesàro, 2010; Wei, Cai, Lin, Wang, & Zhang, 2011), to the best of our knowledge, this is the first investigation that reports the consequences of different sodium alginate concentrations on the enzymatic activity and the molecular properties of lysozyme upon complexation at neutral pH as well as its antimicrobial activity when incorporated in sodium alginate based films. The information resulting from this study will be relevant to compare the characteristics of lysozyme-sodium alginate complexes with those from other anionic polysaccharides-lysozyme complexes and estimate their potential application for the design of antimicrobial edible food packaging.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Sodium alginate (Algogel 6020) was purchased from Cargill (Baupte, France). Alginate Lyase with a specific activity of 125 specific units/mg (2500 specific units/mL) was purchased from Libios (Pontcharra Sur Turdine, France). Hen egg white lysozyme, in lyophilized form with a specific activity of 70,000 specific units/mg and an isoelectric point of

~11, analytical grade imidazole ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ ), acetic acid, sodium hydroxide (NaOH), hydrochloric acid (HCl), calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) and glycerol were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). One unit of lysozyme activity corresponds to the quantity of lysozyme enhancing a 0.001 decrease in 450 nm absorbance in 1 min of a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* (as substrate) at pH 6.24 and 25 °C. Tryptone Salt broth (TS), Tryptone Soy broth (TSB) and Tryptone Soy Agar (TSA) were purchased from (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

### 2.2. Lysozyme and sodium alginate solutions preparation

Stock solutions of lysozyme (7.142 g/L =  $5 \times 10^8$  specific units/L) and sodium alginate (30 g/L) were prepared by dispersing powders in an imidazole-acetate buffer (5 mmol/L) at pH 7 and stirred for at least 2 h with a magnetic stirrer until a proper hydration was reached. The pH was adjusted by adding HCl (0.1 mol/L) or NaOH (0.1 mol/L). Sodium alginate solution was then centrifuged (10,000  $\times$ g; 30 min) (Sigma 3K18, Bioblock Scientific, Illkirch, France) to remove insoluble residues.

### 2.3. Lysozyme/sodium alginate complexes formation and turbidity measurement

Biopolymer mixtures containing lysozyme (0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) and sodium alginate (0–4 g/L) were prepared by mixing different ratios of the stock solutions with imidazole-acetate buffer at pH 7. The resulting suspensions were mixed for 1 min using a vortex mixer and their pH was adjusted again. Turbidity measurements were performed as a function of alginate concentration with a UV/Vis spectrophotometer (Jenway 3705, Villepinte, France). The absorbance was measured at 600 nm at room temperature (25 °C) against pure lysozyme solutions (without sodium alginate) in imidazole-acetate buffer (5 mmol/L; pH 7).

### 2.4. Zeta potential measurement

The zeta potential ( $\zeta$ -potential) of lysozyme/sodium alginate complexes was determined using a Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). The samples were diluted (0.5% (w/w)) with imidazole-acetate buffer adjusted to pH 7. The mean  $\zeta$ -potential (ZP) values ( $\pm$  SD (standard deviation)) were obtained from the instrument.

### 2.5. Particle size distribution

Particle size distributions of lysozyme-alginate complexes formed at various alginate concentrations were measured with a laser diffraction instrument (Malvern Mastersizer). To avoid multiple scattering effects, the complexes were diluted with imidazole/acetate buffer (5 mmol/L; pH 7) prior to the measurements. The complexes were stirred continuously throughout the measurement to ensure the samples were homogeneous. The volume particle diameter (D43) was calculated from three injections of three separate samples with three readings per sample.

### 2.6. Fluorescence microscopy

An optical microscope Axiovert 25 CFL (Prolabo, France) was used in the fluorescence mode to examine the microstructure of films. Suspensions of complexes were stained with Nile Blue (12.5  $\mu\text{L}$  of 1 wt% dye solution added to solutions to obtain approximately a dye-protein ratio of 1:100 (w:w)). Samples were poured between a slide and a coverslip and then observed by a 100 $\times$ -oil immersion objective lens. Samples were excited at 630 nm. Fluorescence intensity data were collected in a channel corresponding to 610–660 nm. Digital image files were acquired with a Nikon F90X camera connected to a digital image processing system (AxioVision, Zeiss, Germany).

### 2.7. Lysozyme activity evaluation

Lysozyme activity was assayed by monitoring the reduction of absorbance at 450 nm ( $OD_{450}$ ) due to the lysis of *M. lysodeikticus* cells at 25 °C. Briefly, in a 1 cm cuvette, 2.9 mL of the *M. lysodeikticus* suspension ( $OD_{450} = 1$ ) in 5 mmol/L imidazole-acetate buffer adjusted to pH 7 and 0.1 mL of the suspension of complexes (containing or not 1% (w/w)  $CaCl_2$ ) were mixed quickly, and the reduction in the absorbance was recorded using an UV/Vis spectrophotometer (Jenway 3705, Staffordshire, UK) until reaching a plateau. Lysozyme activity was calculated from the slope of the initial linear portion of absorbance vs. time curve. The hydrolytic activity of the lysozyme solution can be calculated using Eq. (1) below (one unit (U) was 0.001 change in absorbance in one minute):

$$\text{Activity (U/mL)} = \frac{S}{0.001 \times V} \quad (1)$$

where S is the slope of the initial linear portion of absorbance vs. time curve and V is the volume of lysozyme solution (0.1 mL).

### 2.8. Fluorescence spectra measurements

Changes of lysozyme's intrinsic fluorescence upon complexation with sodium alginate were monitored at pH 7 in a wavelength range of 300–500 nm following an excitation at 280 nm. The excitation and emission bandwidths were 6 nm and 3 nm, respectively. Intrinsic fluorescence intensity measurements were performed with a LS 55 spectrofluorometer (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). All measurements were performed at room temperature (25 °C) using a quartz cuvette (1 cm path length).

### 2.9. UV–Vis spectra measurements

UV absorption spectra were measured from 200 nm to 350 nm with an UV/Vis spectrophotometer (Lightwave II 109233, Biochrom, Cambridge, UK) in a 1 cm pathlength quartz cuvette at 25 °C against imidazole-acetate buffer (5 mmol/L; pH 7).

### 2.10. Preparation of lysozyme/sodium alginate antimicrobial films

Film-forming aqueous solution was prepared to contain 15 g/L sodium alginate, glycerol as plasticizer (0.2 g/g of sodium alginate), and lysozyme as antimicrobial agent (4.285 g/L). The films were made in order to contain 2.695 mg of lysozyme per  $cm^2$  ( $2 \times 10^5$  specific units/ $cm^2$ ). Sodium alginate was dissolved in imidazole-acetate buffer (5 mmol/L; pH 7) at 25 °C for 2 h with magnetic stirring. Afterwards glycerol and lysozyme solution were incorporated under the same conditions while stirring for 30 min more. Each film was prepared by weighing 40 g of film-forming solution and this mass was spread evenly over a plastic petri dish (90 mm). Films were formed by drying overnight at 25 °C under laminar hood and dry films were peeled intact from the casting surface.

### 2.11. Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy was used to study the structure of lysozyme/sodium alginate complexes as a function of alginate concentrations. In addition, surface and cross sections of sodium alginate films (blank) and sodium alginate films containing lysozyme were also observed. Complexes or films were attached to a sample stub with double-sided sticky tape and examined using scanning electron microscopy (Hitachi electron microscopy, TM 3030, Japan) at 4000× magnification and an accelerating voltage of 15 kV.

### 2.12. Evaluation of the antimicrobial activity of lysozyme/sodium alginate films

Stock cultures of two Gram positive bacteria, *Listeria innocua* (ATCC 33090) and *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) were maintained at –20 °C in Tryptone Soy Broth (TSB) supplemented with 15% (v/v) glycerol. Before each test, the two target strains were subcultured in TSB at 10% (v/v) for 8 h and then subcultured in TSB at 10% (v/v) for 16 h at 30 °C and then precultured in TSB for 5 h at 30 °C for the requested experiments. The cells were then diluted in Tryptone Salt (TS) broth to final concentrations of  $1 \times 10^6$  CFU/mL for *K. rhizophila* and  $2 \times 10^7$  CFU/mL for *L. innocua*, incorporated at 5% (v/v) in Tryptone Soy Agar (TSA) and cooled in Petri dishes. Discs (15 mm in diameter) were excised from sodium alginate films (control) and those containing lysozyme with a cork borer. The discs were placed onto the TSA Petri plates inoculated with *L. innocua* or *K. rhizophila*. To study the effect of  $CaCl_2$  or alginate lyase addition on the films antimicrobial activity, 30  $\mu$ L of  $CaCl_2$  solution (40 g/L) or alginate lyase solution (120 specific units/mL) were added under the film. Petri plates were then incubated for 3 h at 4 °C and then incubated for 24 h at 30 °C. The inhibition zones were then calculated by subtracting the diameter of the total inhibition zone from the diameter of the film. Buffer,  $CaCl_2$  and alginate lyase were used as negative controls for the bacterial strains, however, a solution containing the same amount of lysozyme as discs was used as a positive control.

### 2.13. Statistical analysis

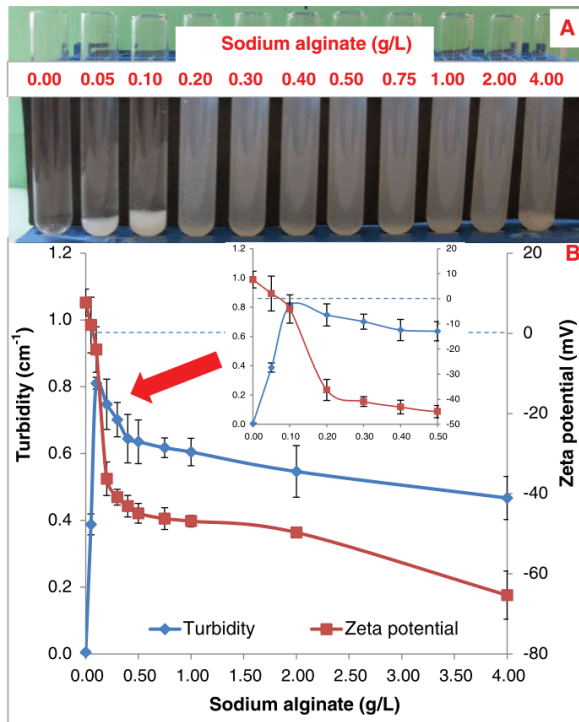
All experiments were performed using at least three freshly prepared samples. The results presented are the averages and standard deviations that were calculated from these replicate measurements. One-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan test were used to determine statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) among averages at confident level of 95%, using the Software SPSS V. 22.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physicochemical and morphological properties of lysozyme/sodium alginate complexes

The effect of increasing sodium alginate concentrations (0–4 g/L) on the formation of complexes with lysozyme at a constant concentration (0.714 g/L) was studied by turbidity and  $\zeta$ -potential measurements at pH 7 (Fig. 1). Free lysozyme solution was not turbid but addition of small amounts of alginate (0–0.1 g/L) to lysozyme resulted in increasing the turbidity value, indicating complexation between the two oppositely charged biopolymers. It is well known that formation of complexes between positively charged proteins and negatively charged polysaccharides is driven by electrostatic interactions (Ye, 2008). Turbidity increased up to a threshold sodium alginate concentration (0.1 g/L) indicating extensive biopolymer aggregation. The aggregation process could be related to some sodium alginate chains that acted as cross linkers between complexes containing free positively charged sites of lysozyme. From 0.1 g/L alginate concentration, turbidity decreased and reached a pseudo plateau from 0.5 g/L. The highest phase separation (at 0.1 g/L sodium alginate concentration) could be attributed to the saturation of all positive sites of lysozyme by alginate molecules. This is consistent with the reduction of the  $\zeta$ -potential value to 0 mV for a 0.1 g/L sodium alginate concentration (Fig. 1B). This substantiates the hypothesis that decantation of 0.1 g/L sodium alginate–0.714 g/L lysozyme complexes at pH 7 was due to charge neutralization and thus to the absence of electrostatic repulsions which stabilized their colloidal state at lower (repulsions between positively charged complexes) and higher polysaccharide concentrations (repulsions between negatively charged complexes). For higher alginate concentrations (above 0.1 g/L), the suspensions were still turbid but the excess amount of





**Fig. 1.** Dependence of the visual aspect (A), turbidity (at 600 nm) and  $\zeta$ -potential (B) of mixed biopolymer solutions on sodium alginate concentration when sodium alginate solution was titrated into lysozyme solution (final concentration: 0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mmol/L, pH 7).

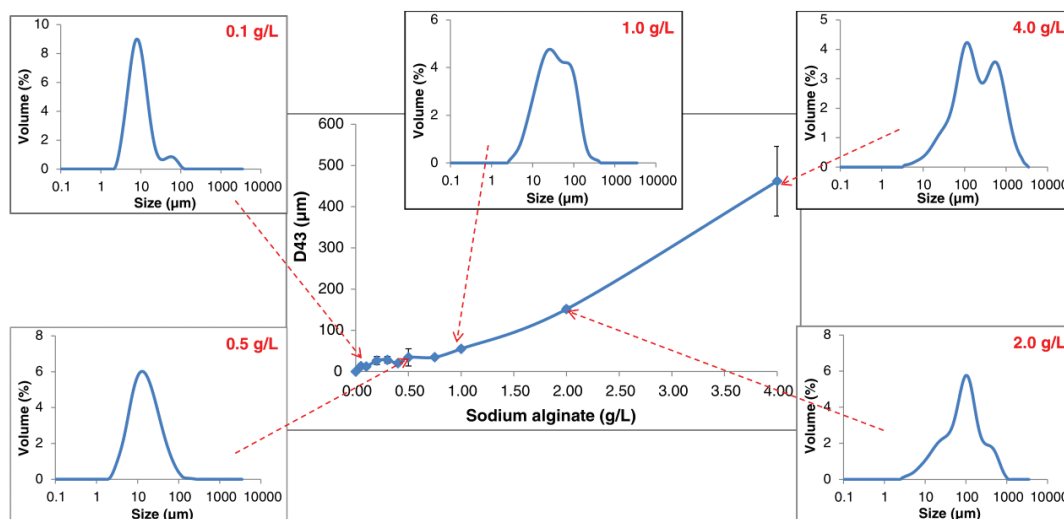
negatively charged sodium alginate chains (see  $\zeta$ -potential profile in Fig. 1B) likely increased repulsive forces between aggregates and thus reduced precipitation (Fig. 1A).

By increasing anionic sodium alginate concentration, the  $\zeta$ -potential value of complexes turned to negative confirming the existence of

electrostatic interactions between the two oppositely charged biopolymers until reaching a pseudo plateau at approximately 0.5 g/L sodium alginate concentration. This probably indicates the saturation of all positively charged sites of lysozyme molecules with sodium alginate chains which is consistent with turbidity measurement results. Insoluble formed complexes had an overall net negative charge (above 0.1 g/L polysaccharide concentration) due to the domination of negative charges of the polysaccharide over the positive charges of the protein. However, addition of higher amounts of sodium alginate decreased more the zeta potential value of the suspension probably due to the presence of free highly negatively charged alginate molecules.

On the other hand, based on particle size distribution analysis, by increasing alginate concentration, the mean diameter of aggregates increased (Fig. 2) (despite a turbidity decrease for sodium alginate concentrations exceeding 0.1 g/L (Fig. 1)) and reached its maximum value at 4.0 g/L sodium alginate concentration. According to Jones and McClements (2010), the optical property (turbidity) of suspensions containing biopolymer particles is low for small particles and increases to a maximum value at a given size (11.94  $\mu$ m at a 0.1 g/L sodium alginate concentration in the present work) and can decrease even if the particle size is still increasing. One can suppose that for sodium alginate concentrations higher than 0.1 g/L (turbidity peak), larger complexes were formed but their structure may be less dense allowing light transmission and consequently absorbance (turbidity) decrease.

To confirm this hypothesis, fluorescence microscopy was used to observe the network formed by lysozyme/sodium alginate individual complexes (Fig. 3). Fluorescence microscopy images showed that formed aggregates up to 0.1 g/L sodium alginate concentration, had a dense structure and thus resulted in an increasing turbidity. However, by increasing polysaccharide concentration, aggregates begin to have loose and sieve like structure which is consistent with obtained low turbidity values (above 0.1 g/L alginate concentration). SEM micrographs (Fig. 4) showed the aggregates internal structure and confirmed the sieve like structure at higher alginate concentrations. It seems that excess amount of sodium alginate above (1 g/L) formed film like structure between individual complexes (Fig. 4). However, lysozyme-alginate complexes were formed whatever the added alginate concentrations. The polysaccharide addition had an effect only on the degree of association between individual complexes while no effect on their aspect and size was observed (Figs. 1-4).



**Fig. 2.** Dependence of particle size distribution and the volume-weighted distribution mean diameter (D43) of mixed biopolymer solutions on sodium alginate concentration when sodium alginate solution was titrated into lysozyme solution (final concentration: 0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mmol/L, pH 7).

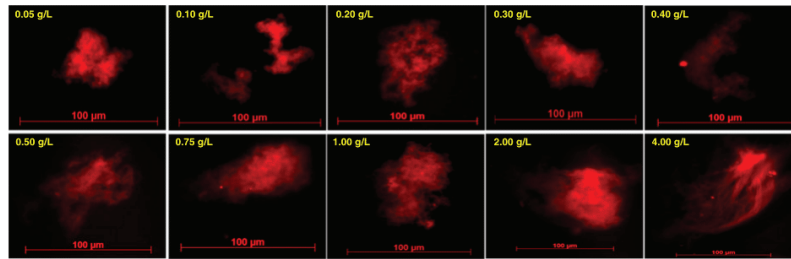


Fig. 3. Microscopic structure of lysozyme–alginate aggregates formed in mixed biopolymer solutions when sodium alginate concentration was increased (0–4 g/L) into a lysozyme solution (final concentration: 0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mmol/L, pH 7). Lysozyme was stained with Nile Blue (dye/protein ratio = 1/100 (w/w)).

### 3.2. Activity of lysozyme/sodium alginate complexes

Changes in lysozyme enzymatic activity (at 0.714 g/L concentration) as a function of complexation by sodium alginate concentrations varying from 0 to 4 g/L and the effect of CaCl<sub>2</sub> addition on the enzymatic activity of lysozyme/sodium alginate complexes are shown in Fig. 5. Initial degradation kinetics of *M. lysodeikticus* cell wall by free and complexed lysozyme were measured for the determination of its enzymatic activity. A sharp decrease in lysozyme enzymatic activity was noticed after sodium alginate addition up to 0.1 g/L concentration. From this concentration, the average enzymatic activity increased again until reaching a plateau (around 1500 U/mL) (20% of initial activity) at 1.0 g/L polysaccharide concentration. In addition, between 0.1 g/L and 4.0 g/L, the high error bars (Fig. 5) could be explained by the high increase in the size of the aggregates in this alginate concentration range (Fig. 2) which probably makes the access of the substrate to the enzyme active sites more random. It can be assumed that lysozyme is immobilized through complexation with sodium alginate. This immobilization can induce structure, conformation, and flexibility changes of enzymes (Hanušová, Vápenka, Dobiáš, & Mišková, 2013). Moreover, the decrease of substrate accessibility because of diffusion limitations, orientation and steric hindrance can be considered as a main reason for lysozyme activity loss through formation of complexes with alginate (Muriel-Galet, Talbert, Hernandez-Munoz, Gavara, & Goddard, 2013). Thus, under these conditions lysozyme could not be able to efficiently interact with anionic sites of the bacterial cell wall due to the electrostatic interactions with anionic functional groups of alginate. Aggregation of formed complexes at 0.1 g/L sodium alginate concentration caused reduction in lysozyme antimicrobial activity to its lowest level. A decrease of lysozyme activity has already been reported upon complexation with potassium poly(vinyl alcohol sulfate) (KPVS) with different degrees of esterification, dextran sulfate, and chondroitin sulfate C sodium salt (Takahashi et al., 2011), purified humic acid (Li et al., 2012) and LM pectin (Bayarri et al., 2014; Ben Amara et al., 2016). Since these polymers and sodium alginate are all negatively charged weak polyelectrolytes, their complexation with oppositely charged lysozyme is primarily

driven by electrostatic interactions up to a critical concentration which corresponds to the isoelectric point of the complexes. This critical lysozyme–polyelectrolyte ratio also corresponded to the maximal reduction of lysozyme activity in the case of purified humic acid (Li et al., 2012) and alginate in the present study. Purified humic acid contains carboxylic and phenolic groups which are negatively charged at neutral pH like carboxylic groups of LM pectin (Bayarri et al., 2014; Ben Amara et al., 2016) and sodium alginate (present study). Takahashi et al. (2011) studied the complexation of lysozyme with polymers which all have negatively charged sulfonate groups and hydroxyl groups in their molecular structure. Interestingly, by using KPVS with various degrees of esterification and thus with more or less sulfonate groups along KPVS chain, they came to the conclusion that lysozyme activity decrease was more important when KPVS degree of esterification and thus density of negatively charged sulfonate groups along KPVS chain were higher. It comes thus from these observations that lysozyme activity decrease upon complexation is enhanced by the density of negative charges along polymer chains. This is also consistent with observations of our group during the first phase of complexation (lysozyme activity decrease): under the same conditions, lysozyme activity was reduced to 4.6% upon complexation with LM pectin (with a 22 to 28% degree of esterification) at 0.3 g/L (turbidity peak) (Ben Amara et al., 2016) or 1.75% with sodium alginate at 0.1 g/L (present study), respectively.

According to Fig. 5 addition of CaCl<sub>2</sub> to lysozyme–alginate complexes solution resulted in the restoration of the enzymatic activity of free lysozyme. It can be concluded that the formed biopolymer complexes were dissociated in the presence of divalent calcium ions. In addition, the addition of calcium ions could favor alginate/alginate interactions instead of lysozyme–alginate ones. In a previous work (Bayarri et al., 2014), we already observed that the addition of CaCl<sub>2</sub> to suspensions of electrostatic lysozyme–LM pectin complexes resulted in a decrease of turbidity due to the dissociation of aggregates.

At this stage of the study, it could be hypothesized that lysozyme activity reduction upon complexation with anionic polymers such as alginate was caused by the steric hindrance between lysozyme active site and its substrate (*M. lysodeikticus* cell wall) as a result of aggregation

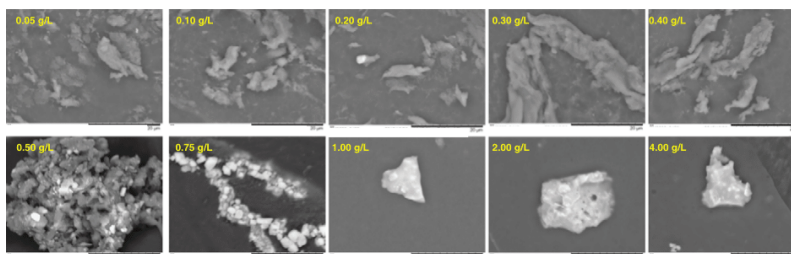
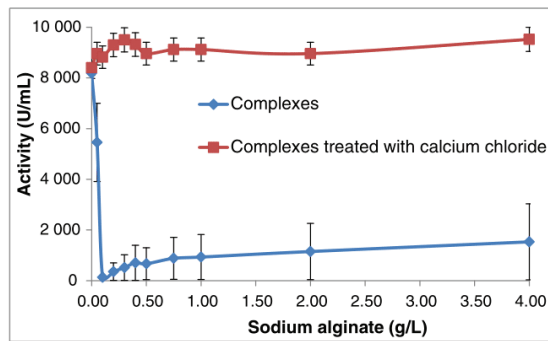


Fig. 4. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of lysozyme–alginate aggregates formed in mixed biopolymer solutions when sodium alginate concentration was increased (0–4 g/L) into a lysozyme solution (final concentration: 0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mmol/L, pH 7).



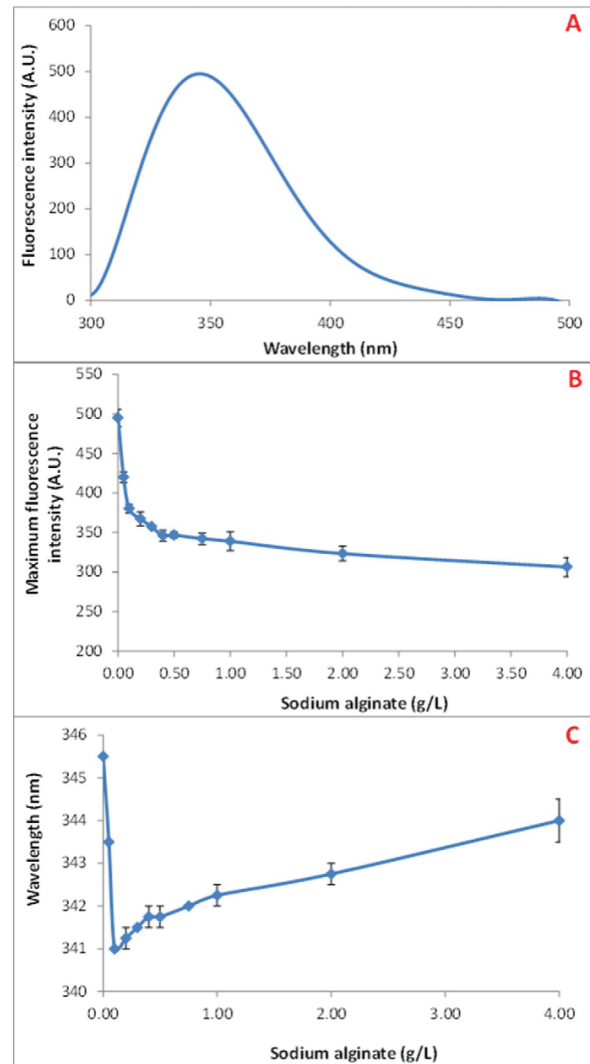
**Fig. 5.** Dependence of the lysozyme activity of mixed biopolymer solutions on sodium alginate concentration when sodium alginate solution was titrated into lysozyme solution (final concentration: 0.714 g/L =  $5 \times 10^7$  specific units/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mmol/L, pH 7) with and without calcium chloride (1% (w/w)  $\text{CaCl}_2$ ) addition.

of lysozyme-alginate complexes as concluded by [Takahashi et al. \(2011\)](#) upon complexation of lysozyme with polymers with sulfonate groups in their structure. However, it cannot be excluded that electrostatic interactions between negative charges of carboxylate groups along alginate chain and positive charges evenly distributed along lysozyme structure can alter lysozyme conformation and especially the lysozyme active site conformation. Therefore, intrinsic fluorescence and UV absorbance spectra of aromatic amino acids residues of lysozyme were monitored upon complexation in order to check whether the microenvironment around these amino acid residues is modified.

### 3.3. Fluorescence spectra of lysozyme/sodium alginate complexes

Free lysozyme fluorescence spectrum at pH 7 and 25 °C obtained by excitation at 280 nm exhibited a peak at 346 nm (Fig. 6A). Aromatic amino acids like tryptophan (Trp), phenylalanine (Phe) and tyrosine (Tyr) present in most globular proteins such as lysozyme are considered as intrinsic fluorophores, however tryptophan fluorescence dominates usually the fluorescence of the macromolecule ([Kurtin & Lee, 2002](#)). Hen egg white lysozyme intrinsic fluorescence will be dominated by tryptophan fluorescence since it contains 6 tryptophan residues against only 3 tyrosine and 2 phenylalanine residues in its primary sequence. Interestingly, Trp 62 and Trp 63 residues are located close to lysozyme substrate binding site. The intensity of this fluorescence is dependent on the environment conditions of lysozyme and especially on its interactions with biopolymers. Fig. 6B and C showed that lysozyme/sodium alginate interactions resulted in changes of lysozyme fluorescence parameters including maximal emission wavelength and maximal intensity, respectively.

The gradual addition of sodium alginate into lysozyme solution led to a sharp decrease in the maximum fluorescence intensity upon addition of sodium alginate up to a 0.5 g/L concentration (Fig. 6B). This reduction could be a consequence of the strong electrostatic interactions between the two biopolymers. In fact, this drop in fluorescence intensity could be attributed to an increase of the local mobility of lysozyme during the complexation probably due to the high intensity of electrostatic interactions with the alginate chains. These interactions may also be unstable at the molecular level (association/dissociation) generating a high mobility of lysozyme molecules. Above 0.5 g/L of sodium alginate concentration, fluorescence intensity remained constant and lower than that of free lysozyme indicating the presence of lysozyme/sodium alginate complexes. Presumably, this concentration leads to the total coverage of lysozyme molecules by alginate chains. This is consistent with the other results obtained in this work that have shown that this concentration of 0.5 g/L of alginate also corresponds to the beginning of a pseudo plateau of turbidity, zeta potential (Fig. 1), and enzymatic activity (Fig. 5).



**Fig. 6.** Fluorescence spectrum of lysozyme (A), maximum fluorescence intensity (B), and emission wavelengths corresponding to the maximum fluorescence intensities (C) of lysozyme (0.714 g/L)/sodium alginate (0–4 g/L) complexes (wavelength of excitation: 280 nm) (imidazole-acetate buffer, 5 mmol/L, pH 7).

Changes in the maximum fluorescence emission wavelength as a function of gradual sodium alginate addition (0–4 g/L) to fixed lysozyme concentration (0.714 g/L) are shown in Fig. 6C. Addition of small amounts of sodium alginate (until 0.1 g/L) to lysozyme solution resulted in decreasing fluorescence wavelength (blue shift). This blue shift indicates that the aromatic amino acids residues are exposed to a more hydrophobic environment ([Li & Li, 2011](#)). In fact, this local hydrophobicity increase could be related to a more compact protein structure and lower water availability due to lysozyme caging in alginate network, which is consistent with the dense structure of complexes observed by microscopy (Fig. 3). A blue shift of emission fluorescence after excitation at 280 nm of lysozyme following complexation of lysozyme with sulfonated polymers at neutral pH was also reported by [Takahashi et al. \(2011\)](#). However, they reported a blue shift from 340 to 338 nm whatever the KPVS used for lysozyme complexation while a more important blue shift (from 345.5 nm to 341 nm) was observed upon complexation with sodium alginate at 0.1 g/L in the present study. Interestingly, this

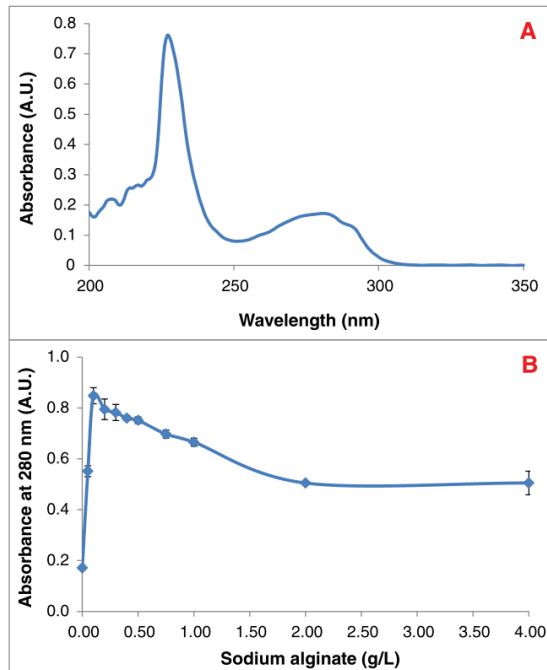


Fig. 7. UV-Vis absorption spectrum of lysozyme (A) and absorbance at 280 nm of lysozyme (0.714 g/L)/sodium alginate (0–4 g/L) complexes (imidazole-acetate buffer, 5 mmol/L, pH 7). Samples were diluted 10 times in buffer before assays.

blue shift was partially reversed when sodium alginate concentration was further increased above 0.1 g/L. This red shift was observed presumably because of the exposure of tryptophan residues to the polar environment caused by the high alginate concentrations resulting in the formation of aggregates having a less compact structure. The change from a blue shift to a red shift occurred at values of alginate concentration exactly corresponding to those of turbidity peak (Figs. 1B and 6C). This change of the intrinsic fluorescence maximal emission wavelength shift direction could thus be used as a means for accurately identifying

the end of the first aggregation phase (formation of dense and compact aggregates) and the beginning of the second phase (formation of scattered and loose aggregates).

Thus, these results suggest that the blue shift initially observed likely resulted from an intimate contact between flexible alginate chains and the more rigid structure of lysozyme driven by electrostatic interactions between opposite charges on these two biopolymers. The increase of hydrophobicity of the micro-environment of aromatic amino acid residues of lysozyme would thus result from the presence of alginate instead of water molecules: this hypothesis is also consistent with a reduced enzymatic activity due to a hindering by alginate chains of substrate interaction with lysozyme active site and thus does not prove that lysozyme activity decrease was due to a modification of lysozyme active site conformation in it but rather to a modification of its micro-environment.

### 3.4. UV-Vis spectra of lysozyme/sodium alginate complexes

The absorption spectra of free lysozyme exhibited two main peaks (Fig. 7A). The first peak was located in the far UV region (226 nm) and reflected the protein secondary structure. The second absorption peak at 280 nm is generally attributed to the aromatic amino acids residues (mainly Trp and Tyr). Ultraviolet measurement is a simple method for determining formation of complexes between a protein and other macromolecules as well as its structural changes (Bi et al., 2005). Thus, UV-vis absorption spectra of lysozyme for an increasing sodium alginate concentration (0–4 g/L) were recorded in order to explore lysozyme conformational changes induced by complexation. The absorbance intensity maxima at 226 nm and 280 nm of lysozyme-alginate complexes changed without any shift of the wavelength of these peaks with increasing alginate concentration (data not shown). In order to study the effect of alginate complexation on the molecular properties of lysozyme, the variation of the intensity at 280 nm was determined from the recorded UV-Vis absorption spectra (Fig. 7B).

The absorbance at 280 nm increased when increasing anionic alginate concentration illustrating that strong electrostatic interactions occurred between the two oppositely charged biopolymers. Again, maximum absorbance was obtained for a 0.1 g/L sodium alginate concentration at which a highest amount of compact complexes and aggregates was formed (Figs. 1 and 3). Above 0.1 g/L sodium alginate concentration, absorbance decreased and reached a plateau at 2.0 g/L

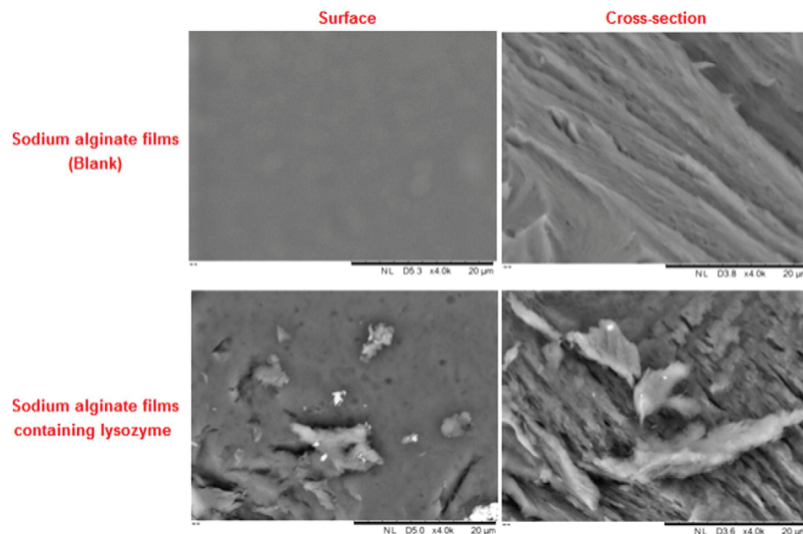


Fig. 8. Scanning electron micrographs of the surface (left) and cross-section (right) of sodium alginate film (blank) and sodium alginate film containing lysozyme viewed at a magnification of 4000 $\times$ .

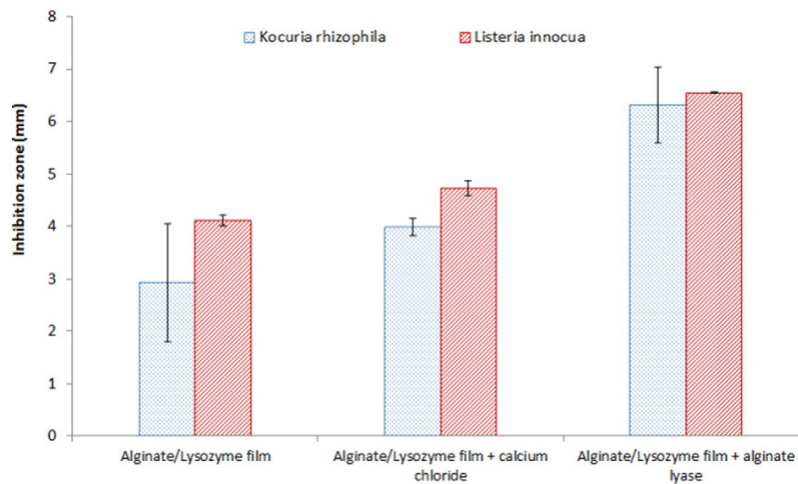


Fig. 9. Effect of calcium and alginate lyase addition on the antibacterial activity (growth inhibition zone) of sodium alginate films containing lysozyme against two Gram positive bacteria, *Kocuria rhizophila* and *Listeria innocua*.

alginate concentration. The lowest absorbance values for lysozyme-alginate complexes were above the absorbance value of free lysozyme which confirms that despite the loss of the dense structure in the second phase (0.1 to 4 g/L), electrostatic biopolymer complexes remained in the solution. Similar results were obtained by Zhang, Tang, and Wang (2009) who used this method to study the interactions between lysozyme and three molecules (caffeine, theophylline and theobromine) with the aim to evaluate the compatibility between lysozyme and each of these three molecules.

### 3.5. Morphology and antimicrobial activity of lysozyme/sodium alginate films

Visually, the obtained films were uniform with continuous structures, homogenous appearances, and without any pores or cracks in the matrix. The surface and cross-sectional morphologies of sodium alginate films or those containing lysozyme were observed by scanning electron microscopy at 4000× magnification (Fig. 8). The sodium alginate film was compact with smooth surface. Nevertheless, lysozyme/sodium alginate film was characterized by an irregular, filamentous and rough surface and showed distinctive images as evidenced by the appearance of lysozyme/sodium alginate complexes that were homogeneously dispersed. Some partially aggregated particles were also visible. The presence of complexes seems to reduce the regularity and compactness of lysozyme/sodium alginate films and this could probably affect its swelling capacity as well as the release behavior of coacervates containing lysozyme. As shown from the cross-sections micrographs, no vertical cracks or phase separation between alginate and lysozyme were observed. The cross-section structures were continuous except some cracks, which were possibly formed during the cutting step.

Alginate films, imidazole-acetate buffer, calcium chloride, and alginate lyase (controls) didn't show any antimicrobial activity against the two tested Gram positive bacteria *Kocuria rhizophila* and *Listeria innocua* (data not shown). However, lysozyme-alginate films were effective against the two tested microorganisms as evidenced by the measured inhibition zones (Fig. 9). Lysozyme/sodium alginate film treated with calcium chloride exhibited slightly larger inhibitory zones (Fig. 9). This could be attributed to the destabilizing effect of calcium chloride leading to complexes dissociation as shown in Fig. 5. The highest inhibitory zones are shown for lysozyme/sodium alginate films treated by alginate lyase (Fig. 9) and this could be attributed to the dissociation of lysozyme/sodium alginate complexes and/or an increase in the release

rate of lysozyme throughout the matrix after alginate enzymatic hydrolysis. In a recent work, we have demonstrated that pectinase addition dramatically increased the release rate of lysozyme when incorporated in LM pectin based films (Bayarri et al., 2014).

## 4. Conclusion

This study provided information about the formation of aggregates of lysozyme and alginate at pH 7 obtained by using different techniques. This information is important because these aggregates may be used to design edible particles or films containing lysozyme/alginate complexes which would particularly target lysozyme sensitive microorganisms. We have shown that while the complexation resulted in a decrease of the enzymatic activity of lysozyme, the addition of CaCl<sub>2</sub> resulted in the restoration of this activity showing the predominance of electrostatic interactions. However, other techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), circular dichroism or isothermal titration calorimetry (ITC) should be used for a better understanding of the exact molecular interactions implied in complexes formation.

## References

- Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, 131, 18–25.
- Ben Amara, C., Eghbal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2016). Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 183, 50–57.
- Bi, S., Song, D., Tian, Y., Zhou, X., Liu, Z., & Zhang, H. (2005). Molecular spectroscopic study on the interaction of tetracyclines with serum albumins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61, 629–636.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122, 416–423.
- Clare, K. (1993). Chapter 6 – Algin. In J. N. BeMiller, & R. L. Whistler (Eds.), *Industrial gums* (pp. 105–143) (Third edition). London: Academic Press.
- Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from algae. *Biopolymers online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Fioramonti, S. A., Perez, A. A., Aringoli, E. E., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2014). Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, 35, 129–136.
- Fuenzalida, J. P., & Goycoolea, F. M. (2015). Polysaccharide-protein nanoassemblies: Novel soft materials for biomedical and biotechnological applications. *Current Protein and Peptide Science*, 16, 89–99.
- Fuenzalida, J. P., Nareddy, P. K., Moreno-Villoslada, I., Moerschbacher, B. M., Swamy, M. J., Pan, S., & Goycoolea, F. M. (2016). On the role of alginate structure in complexing with lysozyme and application for enzyme delivery. *Food Hydrocolloids*, 53, 239–248.

- Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1–12.
- Hanušová, K., Vápenka, L., Dobiáš, J., & Mišková, L. (2013). Development of antimicrobial packaging materials with immobilized glucose oxidase and lysozyme. *Central European Journal of Chemistry*, 11, 1066–1078.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577–585.
- Jones, O. G., & McClements, D. J. (2010). Functional biopolymer particles: Design, fabrication, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 374–397.
- Kurtin, W. E., & Lee, J. M. (2002). The free energy of denaturation of lysozyme: An undergraduate experiment in biophysical chemistry. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30, 244–247.
- Li, S., & Li, D. (2011). Investigation on the pH-dependent binding of benzocaine and lysozyme by fluorescence and absorbance. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 82, 396–405.
- Li, Y., Tan, W. F., Wang, M. X., Liu, F., Weng, L. P., Norde, W., & Koopal, L. K. (2012). Influence of lysozyme complexation with purified Aldrich humic acid on lysozyme activity. *European Journal of Soil Science*, 63, 550–557.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3, 287.
- Makki, F., & Durance, T. D. (1996). Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. *Food Research International*, 29, 635–645.
- Muriel-Galet, V., Talbert, J. N., Hernandez-Munoz, P., Gavara, R., & Goddard, J. M. (2013). Covalent immobilization of lysozyme on ethylene vinyl alcohol films for nonmigrating antimicrobial packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6720–6727.
- Ormus, S., Oulahal, N., Noël, C., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2015). Effect of low methoxyl (LM) pectin complexation on the thermal and proteolytic inactivation of lysozyme: A kinetic study. *Food Hydrocolloids*, 43, 812–818.
- Takahashi, D., Uchida, K., & Izumi, T. (2011). Activities of lysozyme complexed with polysaccharides and potassium poly(vinyl alcohol sulfate) with various degrees of esterification. *Polymers Bulletin*, 67, 741–751.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1–23.
- Wei, L., Cai, C., Lin, J., Wang, L., & Zhang, X. (2011). Degradation controllable biomaterials constructed from lysozyme-loaded Ca-alginate microparticle/chitosan composites. *Polymer*, 52, 5139–5148.
- Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: Principles and applications – A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 406–415.
- Zhang, H. M., Tang, B. P., & Wang, Y. Q. (2009). The interaction of lysozyme with caffeine, theophylline and theobromine in solution. *Molecular Biology Reports*, 37, 3127–3136.

### **III.3.3. Conclusion**

Les résultats de cette partie ont montré que la complexation du lysozyme avec l'alginate a entraîné une suppression de l'activité enzymatique de la protéine et que l'ajout des ions calcium a permis de restaurer cette activité ce qui indique que les interactions entre les deux biopolymères sont majoritairement électrostatiques. Cette étude a également montré que lorsque la neutralisation des charges a lieu, l'agrégation est maximale. Les agrégats lysozyme/alginate peuvent ainsi être utilisés pour développer des films d'emballage ou des microparticules qui ciblent des micro-organismes sensibles au lysozyme et/ou producteurs d'enzymes alginolytiques.

### **III.4. Effet du pH sur la complexation de la nisine par des polysaccharides**

#### **III.4.1. Introduction**

L'objectif du présent travail est l'étude de l'effet du pH sur la complexation de la nisine, un peptide antimicrobien de nature cationique, par un polysaccharide anionique estérifié, la pectine, ou un polysaccharide anionique linéaire non estérifié, l'alginate de sodium. En effet, peu d'études ont été réalisées sur la nature et l'intensité des interactions entre la nisine et ces deux polysaccharides. De plus, il est important de comprendre l'effet du pH sur les propriétés des complexes qui en découlent. Intentionnellement, le présent travail a été réalisé aux pHs 3, 5 et 7, des valeurs de pH au niveau desquelles la nisine, en présentant une charge nette positive, est capable d'interagir *via* des interactions électrostatiques avec les deux polysaccharides anioniques dans l'objectif de déceler d'une manière assez claire l'effet du pH sur les interactions nisine/pectine ou nisine/alginate mais aussi d'évaluer l'éventuel impact de ces interactions sur la structure de ce peptide.

Les résultats présentés dans cette partie sous forme d'un article soumis au journal « *Carbohydrate Polymers* » visent à caractériser les propriétés et la structure des complexes formés entre la nisine et la pectine ou l'alginate à trois pH distincts. Le suivi des caractéristiques spectrales dans l'ultra-violet de la nisine en présence de différentes concentrations en alginate ou en pectine a permis de formuler des hypothèses sur les modifications du micro-environnement de la nisine induites par la complexation avec ces biopolymères anioniques à différents pH.

#### **III.4.2. Effect of pH on nisin/pectin and nisin/alginate complex coacervation: *Formation and properties of complexes in solution***





27 **Abstract.**

28           The objective of this study was to evaluate the effect of pH on the properties of nisin/low  
29 methoxyl (LM) pectin or nisin/alginate coacervates as well as the effect of complexation on the  
30 preservation of nisin structure. The gradual addition of pectin or alginate (0-4 g/L) to a fixed  
31 nisin concentration (5 g/L) induced an increase in turbidity up to a threshold above which  
32 turbidity was kept stable (pH 3) or decreased somewhat (pH 5). The results were interpreted in  
33 terms of aggregation of nisin/pectin or nisin/alginate complexes followed by a change in their  
34 structure as well as their apparent size and  $\zeta$ -potential. UV-Vis absorption measurements  
35 revealed that increasing pectin or alginate amounts affected nisin structure and conformational  
36 changes that were dependent on pH and polysaccharide type as well as nisin/polysaccharide  
37 ratio. At pH 7, complexation with pectin or alginate was inhibited probably because of the low  
38 positive charge and the poor solubility of nisin.

39

40 **Keywords:** Complexation, Pectin, Alginate, Nisin, pH, Electrostatic interactions, Molecular  
41 structure.

42        **Introduction**

43            Associative phase separation (or coacervation) occurs between protein isoelectric point  
44 (pI) and pKa of polysaccharide anionic groups and involves attractive electrostatic interactions  
45 (Jones & McClements, 2010). Coacervation occurs in two steps: the formation of charge  
46 neutralized insoluble complexes and the subsequent spontaneous macroscopic phase separation  
47 to complex-rich and solvent-rich phases (Yang, Anvari, Pan, & Chung, 2012). When mixing  
48 the two biopolymers, one-phase system formed of individual molecules or soluble complexes  
49 of the two biopolymers or two-phase system formed after solution separation could be observed.  
50 This depends on many factors such as biopolymers nature (molar mass, flexibility and charge  
51 distribution), the composition of the solution (biopolymers concentration and ratio) and the  
52 environmental conditions (pH and ionic strength). These factors affect the strength of the  
53 interactions between the biopolymers and the nature of the formed complexes (size, solubility  
54 and surface properties) (Dickinson, 2003). When two biopolymers form complex coacervates,  
55 their functional properties could be improved compared to the original molecules. Thus, the  
56 obtained complex coacervates have been applied in food industry to stabilize emulsions  
57 (Dickinson, 2003), to encapsulate antimicrobial agents (Ben Amara, Eghbal, Degraeve, &  
58 Gharsallaoui, 2016) and to elaborate edible antimicrobial films in order to preserve foods  
59 (Bayarri, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2014).

60            Nisin (E234) is characterized by its non-toxicity and has been approved by the Food and  
61 Drug Administration (FDA) as a food additive (Hagiwara, Imai, Nakashima, Toda, & Kawabe,  
62 2010). Nisin exhibits the highest solubility and stability at low pH values. This solubility is  
63 significantly reduced when the pH reaches and exceeds neutrality (Hurst, 1981). Nisin is  
64 positively charged across a large range of pH because of its high isoelectric point pI (~8-9) and  
65 the absence of residues with negatively charged side chains (Rollema, Kuipers, Both, de Vos,

66 & Siezen, 1995). These properties make this peptide able to form electrostatic complexes with  
67 anionic polysaccharides.

68 Pectin is a water soluble polysaccharide widely used in food manufacturing for its  
69 thickening and gelling properties. This hydrocolloid, mainly composed of D-galacturonic acid  
70 residues, is negatively charged because it contains ionized carboxylic acid groups (Ridley,  
71 O'Neill, & Mohnen, 2001). Pectin was shown to strongly bind to peptides like  $\epsilon$ -polylysine  
72 (Chang, McLandsborough, & McClements, 2012) or proteins like lysozyme (Bayarri et al.,  
73 2014; Ben Amara et al., 2016) under different physico-chemical conditions *via* intermolecular  
74 interactions. It has been shown that a food-grade cationic antimicrobial ( $\epsilon$ -polylysine) (pI ~9.0)  
75 and pectins with various degrees of esterification (DE) formed electrostatic complexes at pH  
76 3.5 (Chang et al., 2012). The properties of the formed complexes (e.g., solubility, electrostatic  
77 charge) depended on the mass ratio of pectin to  $\epsilon$ -polylysine and on the DE of the used pectin.  
78 In this study, low-methoxylated (LM) pectin having a high proportion of free ionized carboxylic  
79 acid groups was used in order to favor electrostatic interactions with cationic nisin at different  
80 pH conditions.

81 Alginates, natural, hydrophilic and biocompatible polysaccharides, are salts of alginic  
82 acids. Algae and bacteria (*Azotobacter* and *Pseudomonas*) are two important sources for the  
83 production of alginates. However, commercial alginates are mainly derived from the cell wall  
84 of brown marine algae (*Phaeophyceae*) mainly by alkaline extraction processes (Goh, Heng, &  
85 Chan, 2012). Alginates are binary copolymers made up of  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) and  $\beta$ -D-  
86 mannuronic acid (M) residues, linearly linked *via* 1-4 linkages. So an alginate molecule is  
87 considered as a block copolymer consisting of three types of G, M, and GM blocks with  
88 different relative proportions that determine physico-chemical and functional properties of  
89 alginates (Draget, Smidsrød, & Skjåk-Bræk, 2005). The negative charge of alginates over a  
90 wide range of pH values is attributed to the dissociation constants of mannuronic units (M)

91 (3.38) and guluronic monomers (G) (3.65) (Harnsilawat, Pongsawatmanit, & McClements,  
92 2006). Being a stabilizer and a thickener, sodium alginate, the main used form, is applied in  
93 various food products (Goh et al., 2012). The interactions of alginate with proteins e.g., whey  
94 protein isolate or peptides have been studied in order to design new biomaterials (Fioramonti,  
95 Perez, Aringoli, Rubiolo, & Santiago, 2014; Toppazzini, Coslovi, Boschelle, Marsich,  
96 Benincasa, Gennaro, & Paoletti, 2011).

97 To the best of our knowledge, the mechanism of interactions between nisin and pectin or  
98 alginate and how these interactions may affect the peptide structure were not yet investigated.  
99 Besides, there is still a lack of fundamental understanding of the factors that affect the size, the  
100 physicochemical properties and the molecular interactions of the formed complexes between  
101 nisin and pectin or alginate like pH, temperature and ionic strength. The aim of this paper was  
102 (i) to study the effect of pH on the complexation of nisin with different added pectin or alginate  
103 concentrations, (ii) to evaluate the effect of this complexation on the physico-chemical  
104 properties of the formed complexes (turbidity, morphology, particle size distribution and  $\zeta$ -  
105 potential), and (iii) to study nisin structural modifications throughout its complexation with  
106 pectin or alginate by using UV-Vis absorption spectroscopy.

107 **2. Materials and Methods**

108 **2.1. Materials**

109 Dried powder of nisin A (95% w/w of nisin A and 5% w/w moisture as indicated in the  
110 product data sheet), produced using the bacterium *Lactococcus lactis* by fermentation, was  
111 purchased from Handary (Lendeledé, Belgium). Sodium alginate (Algogel 6020) and low  
112 methoxyl amidated pectin (Unipectine™ OF 305 C SB, degree of esterification from 22% to  
113 28% and degree of acetylation from 20% to 23%) were purchased from Cargill (Baupte,  
114 France). Nile Blue A, acetic acid, analytical grade imidazole (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), hydrochloric acid (HCl)  
115 and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin  
116 Fallavier, France). Deionized water was used for the preparation of all solutions.

117 **2.2. Preparation of nisin, pectin and alginate solutions**

118 Stock solutions of nisin (10 g/L) and pectin or alginate (30 g/L) were prepared by  
119 dispersing powders in an imidazole-acetate buffer (5 mM) at pH 3, pH 5 and pH 7 and stirred  
120 for 2 h with a magnetic stirrer until the proper hydration was reached. The pH was adjusted by  
121 adding HCl (1 mol.L<sup>-1</sup>) or NaOH (1 mol.L<sup>-1</sup>). Nisin, pectin and alginate solutions were then  
122 centrifuged (10000 × g; 30 min) (Sigma 3K18, Bioblock Scientific, Illkirch, France) to remove  
123 insoluble residues.

124 **2.3. Formation of nisin/pectin and nisin/alginate complexes and turbidity measurements**

125 Biopolymer mixtures of nisin (5 g/L) and pectin or alginate (0–4 g/L) were prepared by  
126 mixing different ratios of the stock solutions with imidazole-acetate buffer (5 mM) at pH 3, pH  
127 5 and pH 7 respectively. Turbidity measurements were done with a UV/Vis spectrophotometer  
128 (Jenway 3705, Villepinte, France). The absorbance was measured at 600 nm at room  
129 temperature (25 °C) against pure nisin solutions (without pectin or alginate) in imidazole-  
130 acetate buffer (5 mM; pH 3, pH 5 and pH 7).

**131 2.4.  $\zeta$ -potential**

132 The zeta potential ( $\zeta$ -potential) of nisin, pectin and alginate solutions as a function of pH  
133 as well as the  $\zeta$ -potential of nisin/pectin or nisin/alginate complexes formed at various pectin  
134 or alginate concentrations and at pH 3, pH 5 and pH 7, was determined using a Zetasizer  
135 NanoZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). The samples were diluted (0.5% (w/w)) with  
136 imidazole-acetate buffer adjusted to pH 3, pH 5 and pH 7, respectively. The mean values of  $\zeta$ -  
137 potential and the standard deviations ( $\pm$ SD) were recorded from the instrument.

**138 2.5. Particle size analysis**

139 Particle size distributions of nisin/pectin complexes and nisin/alginate complexes formed  
140 with increasing pectin or alginate concentrations at the appropriate pH (3, 5 and 7) were  
141 analyzed with a laser diffraction instrument (Malvern Mastersizer). This analysis wasn't done  
142 for nisin/alginate complexes formed at pH 7, because of their very small size making difficult  
143 their detection with our measuring instrument. Before the measurements, imidazole-acetate  
144 buffer (5 mM; pH 3, pH 5 or pH 7) was used to dilute the complexes in order to avoid multiple  
145 scattering effects. A continuous stir was performed throughout the analysis in order to ensure  
146 that the complexes were homogeneously dispersed. The volume particle diameter ( $D_{43}$ ) was  
147 measured from three samples with three reads per sample.

**148 2.6. Epifluorescence microscopy**

149 An optical microscope Axiovert 25 CFL (Prolabo, France) was used in the fluorescence  
150 mode to examine the microstructure of nisin/pectin and nisin/alginate complexes prepared at  
151 various pectin or alginate concentrations and the three tested pH (pH 3, pH 5 and pH 7). Nisin  
152 was stained with Nile Blue (5  $\mu$ L of 1 wt% dye solution added to nisin/pectin or nisin/alginate  
153 solutions to obtain approximately a dye-peptide ratio of 1:100 (w:w)). Observations were  
154 performed at least 30 min after mixing the dye with the solutions. Nisin/pectin or nisin/alginate  
155 solutions were poured between a slide and a coverslip and then observed by a 100X-oil

156 immersion objective lens. Samples were excited at 630 nm. Fluorescence intensity data were  
157 collected in a channel corresponding to 610–660 nm. Digital image files were acquired with a  
158 Nikon F90X camera connected to a digital image processing system (AxioVision, Zeiss,  
159 Germany).

## 160 **2.7. UV-Visible spectra**

161 UV-Vis absorption spectra were measured from 200 nm to 350 nm on a UV/Vis  
162 spectrophotometer (Lightwave II 109233, Biochrom, Cambridge, UK) in a 1 cm quartz cuvette  
163 at 25 °C against imidazole-acetate buffer (5 mM ; pH 3, pH 5 and pH 7). Before measurements,  
164 samples were diluted 15 times with imidazole-acetate buffer adjusted to the appropriate pH.

## 165 **2.8. Statistical analysis**

166 All experiments were carried out in triplicate using three freshly prepared suspensions.  
167 The provided results are the averages with their standard deviations that were calculated from  
168 these triplicate measurements.



**169 3. Results and discussion****170 3.1. Turbidity of nisin/pectin and nisin/alginate complexes**

171 The influence of complex coacervation on the turbidity of suspensions formed by nisin at  
172 a fixed concentration (5 g/L) and different added pectin or alginate concentrations (0-4g/L)  
173 prepared at pH 3, pH 5 and pH 7 was examined (Fig. 1A and Fig. 1B). The obtained results  
174 showed that turbidity increased progressively with pectin or alginate addition for suspensions  
175 prepared at pH 3 and pH 5. This turbidity increase could be attributed to the increase of the  
176 number and/or the size of nisin/pectin or nisin/alginate complexes and/or aggregates.  
177 Aggregation could be caused by the establishment of electrostatic pectic or alginate bridges  
178 between nisin cationic sites that remained available at the surface of individual complexes  
179 (Bayarri et al., 2014; Ben Amara et al., 2016). At pH 3 and pH 5, the turbidity of nisin/alginate  
180 suspensions was higher than that of nisin/pectin solutions for the tested polysaccharide  
181 concentrations. From this result, it can be suggested that the number and/or the size of the  
182 formed coacervates was higher when nisin was complexed with alginate. In fact, alginate is a  
183 linear unbranched polysaccharide and the density of charges carried by this anionic polymer is  
184 higher than the density of charges carried by pectin chains also because some carboxylic acid  
185 functions along pectin chain are methoxylated. Thus, one could assume that in the case of  
186 nisin/alginate complexes, alginate chains were more extended because of the strong  
187 electrostatic repulsions leading to bigger complexes and/or aggregates as compared to  
188 nisin/pectin coacervates. Besides, turbidity was the highest for nisin/pectin and nisin/alginate  
189 suspensions prepared at pH 3 showing that the formation of complexes and/or aggregates  
190 between nisin and an anionic polysaccharide was promoted at this pH value. Besides, at high  
191 pectin and alginate concentrations, turbidity remained relatively high indicating that the amount  
192 of large aggregates did not change significantly in this region and/or that aggregates did not  
193 dissociate to re-form individual complexes, probably because the electrostatic repulsions were

194 not strong enough. At pH 5, turbidity increased up to a threshold pectin (2 g/L) or alginate  
195 concentration (1 g/L) and then decreased somewhat demonstrating that the high negatively  
196 charged free pectin or alginate molecules inhibited further aggregation of complexes due to  
197 high repulsive interactions.

198 For suspensions prepared at pH 7, turbidity increased steeply until 0.2 g/L pectin  
199 concentration and 0.05 g/L alginate concentration indicating the lower formation of insoluble  
200 complexes (Fig. 1A and Fig. 1B). The turbidity increase reflecting the increase of the number  
201 and/or the size of nisin/polysaccharide complexes and/or aggregates was more significant under  
202 acidic conditions (low pH values) and this could be explained by the reduction of the cationic  
203 charges on the nisin molecules at neutral pH but also to the peptide solubility which is reduced  
204 when the pH increases. Indeed, nisin is more soluble and more stable under acidic conditions  
205 and has a solubility of 12 wt% at pH 2.5 and 4 wt% at pH 5.0. This solubility is close to zero  
206 when the pH reaches and exceeds neutrality (Hurst, 1981).

### 207 **3.2. Influence of pH on nisin/pectin and nisin/alginate interactions**

#### 208 **3.2.1. Influence of pH on the $\zeta$ -potential of the studied biopolymers**

209 A useful tool to quantify the electrostatic interactions between cationic nisin and the  
210 anionic pectin or alginate molecules is to measure the changes in the surface density of charge  
211 around the formed complexes. The influence of pH on the  $\zeta$ -potential of free nisin, pectin and  
212 alginate was analyzed (Fig. 2A). The net charge of free nisin changed from positive to negative  
213 when the pH increased from pH 3.0 to pH 11.0 and became close to zero at pH 9.0. From this  
214 result, we could confirm that nisin carries a positive charge in our experimental conditions (pH  
215 3, pH 5 and pH 7). Nisin is a peptide with a basic character due to its four cationic sites  
216 supported by the lysine residues and by the NH<sub>2</sub> of the N-terminal extremity (Rollema et al.,  
217 1995). Pectin and alginate carried negative charges from pH 3.0 to 11.0, but had less anionic

218 charges below pH 5.0 (Fig. 2A). In fact, the deprotonation of —COOH groups carried by these  
219 two polyanionic polymers increases when the pH increases. On the other hand, it seems that the  
220 negative charge of alginate chains was reduced above pH 7. A possible explanation for this  
221 result is the increase of the hydrodynamic volume as a consequence of the high electrostatic  
222 repulsions between the anionic alginate chains with increasing pH, thus affecting their  
223 electrophoretic mobility in the applied electrical field during the analysis. Thus, at the three  
224 tested pH values, the net charge of nisin was positive due to the cationic amino groups while  
225 that of pectin or alginate was negative due to the anionic carboxyl groups. This situation can  
226 lead to the formation by electrostatic interactions of nisin/pectin or nisin/alginate complexes.  
227 In a recent study, we already have observed that nisin was able to form electrostatic complexes  
228 with sodium alginate and pectin at pH 5 (Ben Amara, Kim, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui,  
229 2017).

### 230 **3.2.2. Influence of pH on the $\zeta$ -potential of nisin/pectin and nisin/alginate complexes**

231 To monitor how the net charge of formed complexes changes upon titration with pectin  
232 or alginate, the  $\zeta$ -potential of the obtained complexes was measured as a function of pectin or  
233 alginate concentration at pH 3, pH 5 and pH 7 (Fig. 2B and Fig. 2C). The electrical charge of  
234 nisin/pectin or nisin/alginate complexes after the addition of small amounts of pectin or alginate  
235 at pH 3 and pH 5 was highly positive. Besides, turbidity remained relatively low (Fig. 1). In  
236 fact, there may have been sufficiently strong electrostatic repulsions between the nisin/pectin  
237 or nisin/alginate complexes to prevent extensive aggregation. However, at intermediate pectin  
238 or alginate concentrations, the charge on the complexes became gradually less positive until  
239 charge neutralization and then complexes became slightly negatively charged and the turbidity  
240 was relatively high. Thus, nisin/pectin or nisin/alginate complexes may have aggregated  
241 through either bridging effects or charge neutralization. It can be suggested that large  
242 nisin/pectin or nisin/alginate aggregates could form because the charge on the primary

243 nisin/pectin or nisin/alginate complexes was relatively low, which meant that electrostatic  
244 repulsions between them were weak. The resulting aggregates were large enough to induce a  
245 significant increase in turbidity. When pectin or alginate concentration was further increased,  
246 the electrostatic charge became highly negative indicating the increasing number of anionic  
247 polysaccharide molecules adsorbed to the cationic polypeptide binding sites through  
248 electrostatic interactions. Thus, the contribution of nisin cationic binding sites to the total  $\zeta$ -  
249 potential diminished and the  $\zeta$ -potential became highly negative.

250 At pH 3, charge neutralization occurred between 0.4 and 0.5 g/L pectin concentration and  
251 the negative charge of nisin/pectin aggregates increased at high pectin levels until reaching a  
252 pseudo-plateau at approximately 1 g/L pectin concentration (Fig. 2B). This could be attributed  
253 to the saturation of the peptide molecules by pectin chains around this concentration. Besides,  
254 it is clear that many of the pectin carboxyl groups were bonded with cationic nisin as shown  
255 from the pseudo-plateau that was reached at a  $\zeta$ -potential of about  $\sim -4$  mV (mixture of  
256 complexes and free pectin chains) which is significantly different from that of pectin molecules  
257 alone at this pH ( $\sim -19.9$  mV) (Fig. 2A). At the same pH value, charge neutralization occurred  
258 between 2 and 3 g/L alginate concentration and promoted the formation of large aggregates.  
259 Then, the negative charge of nisin/alginate aggregates increased continuously at higher alginate  
260 levels (Fig. 2C). In addition, for the two tested polysaccharides, turbidity remained at high  
261 levels and aggregates did not dissociate probably because the electrostatic repulsions were weak  
262 at pH 3 (Fig. 1A and Fig. 1B). At pH 5, charge neutralization occurred between 0.1 and 0.2 g/L  
263 pectin concentration and between 0.75 and 1 g/L alginate concentration indicating that pectin  
264 or alginate interacted much more strongly with nisin molecules with increasing pH (Fig. 2B  
265 and Fig. 2C). At this pH value, the negative charge increased until reaching a pseudo-plateau  
266 at a  $\zeta$ -potential of  $\sim -46$  mV and at approximately 2 g/L alginate concentration (Fig. 2C). One  
267 could assume that, at pH 5, nisin molecules were saturated by alginate chains around this

268 concentration. The carboxyl groups along pectin or alginate chains are more charged with  
269 increasing pH, thus, at pH 5, we postulate that large nisin/pectin or nisin/alginate aggregates  
270 dissociated partially at high polysaccharide concentrations because their negative charge  
271 became increasingly large, which would have generated strong electrostatic repulsions between  
272 them. This is in correlation with the slight decrease in turbidity from 2 g/L pectin concentration  
273 and 1 g/L alginate concentration (Fig. 1A and Fig. 1B). From the obtained results, it can be  
274 concluded that electrostatic repulsions play an important role in maintaining the stability of  
275 nisin/pectin or nisin/alginate complexes. Besides, it seems that charge neutralization  
276 phenomenon is strongly affected by pH, the peptide to polysaccharide ratio and the  
277 polysaccharide type. The overall negative charge of nisin/pectin or nisin/alginate aggregates at  
278 pH 3 and pH 5 and at high polysaccharide concentrations, similar to that of pectin or alginate  
279 alone, could indicate that the outer layer of these aggregates is dominated by the polysaccharide.

280 At pH 7, nisin alone exhibited lower positive charge (~ 9 mV) by the deprotonation of  
281 histidine residues (Rollema et al., 1995) as compared to pH 5 (~ 11.4 mV) and pH 3 (~ 16.9  
282 mV) (Fig. 2A). After the addition of small amounts of pectin or alginate, the electrical charge  
283 of nisin/pectin or nisin/alginate complexes at pH 7 decreased sharply. For higher pectin or  
284 alginate concentrations,  $\zeta$ -potential reached a pseudo-plateau (mixture of nisin and free  
285 polysaccharide chains) and the values of  $\zeta$ -potential were significantly close to those  
286 corresponding to pectin or alginate alone at this pH indicating that the interaction between  
287 cationic nisin and the two polysaccharides were significantly reduced at pH 7 (Fig. 2A, Fig. 2B  
288 and Fig. 2C). However, at pH 3 and pH 5, the  $\zeta$ -potential value of the mixtures was significantly  
289 different to that of the pure pectin or alginate solutions. Besides, charge neutralization occurred  
290 for smaller polysaccharide concentrations when increasing pH. This could be attributed to the  
291 higher number of negatively charged carboxyl groups along the pectin and alginate backbones  
292 and to the reduction of the number of positively charged binding sites of nisin to interact with.

293 The highest the amount of pectin or alginate in the mixture, the larger was the numerical  
294 decrease in the  $\zeta$ -potential value for all tested pHs. It could be concluded that cationic nisin  
295 interacted with anionic pectin or alginate through electrostatic interactions for the three tested  
296 pH values. Krivorotova, Cirkovas, Maciulyte, Staneviciene, & Budriene (2016) prepared  
297 nanoparticles containing nisin for food shelf-life extension by using three types of pectin with  
298 different methoxylation degrees and by studying the interactions at different pH values between  
299 4 and 7. They demonstrated the existence of electrostatic interactions between the peptide and  
300 pectin by  $\zeta$ -potential measurements. The authors showed by Fourier-transform infrared (FTIR)  
301 spectroscopy measurements that electrostatic interactions between charged amino groups of  
302 lysine residues in nisin chain and  $-\text{COO}^-$  groups of pectin exist and decrease with pH  
303 increasing. The strong electrostatic interactions between nisin and alginate were also evidenced  
304 by Hosseini, Hosseini, Mohammadifar, German, & Mortazavian (2014) by FTIR spectroscopy  
305 analysis. This was also observed by Maresca, De Prisco, La Storia, Cirillo, Esposito, &  
306 Mauriello (2016) who indicated the presence of electrostatic interactions between nisin and  
307 alginate at pH 5.

### 308 **3.3. Particle size distribution of nisin/pectin and nisin/alginate complexes**

309 The addition of small amounts of pectin (0.05 g/L) resulted in the formation of nisin/  
310 pectin aggregates that had an average size ( $D_{43}$ ) of 157  $\mu\text{m}$  at pH 3 and of 57  $\mu\text{m}$  at pH 5 (Fig.  
311 3A). At 0.05 g/L alginate concentration, nisin/alginate complexes and/or aggregates had an  
312 average size ( $D_{43}$ ) of 82  $\mu\text{m}$  and 92  $\mu\text{m}$  at pH 3 and pH 5, respectively (Fig. 3B). Besides, it  
313 seems that small aggregates were combined with each other to form larger ones at higher pectin  
314 or alginate concentrations. Thus, for nisin/pectin complexes and/or aggregates, the apparent  
315 mean size reached a  $D_{43}$  value of 242  $\mu\text{m}$  and 165  $\mu\text{m}$  at 1 g/L pectin at pH 3 and pH 5,  
316 respectively (Fig. 3A). In the case of nisin/alginate complexes and/or aggregates, the apparent  
317 mean size had a  $D_{43}$  value of 628  $\mu\text{m}$  and 544  $\mu\text{m}$  at 2 g/L and 1 g/L alginate concentration at

318 pH 3 and pH 5, respectively (Fig. 3B). For the two tested polysaccharides, it is clear that, at pH  
319 3, the increase of the apparent mean size occurred for smaller polysaccharide concentrations  
320 and was more significant indicating that aggregation was promoted at this pH value and this  
321 could be explained by the low electrostatic repulsions between the polysaccharide chains (Figs.  
322 3A and 3B). Besides, nisin/alginate complexes formed at pH 3 and pH 5 at various  
323 polysaccharide concentrations were characterized by a higher apparent mean size than that of  
324 nisin/pectin complexes. A possible explanation of this finding is that alginate linear chains were  
325 more extended because of the strong electrostatic repulsions between them leading to the  
326 formation of larger complexes and/or aggregates. In a recent work, we have observed that when  
327 cationic nisin (5 g/L) was mixed with negatively charged pectin or alginate (2 g/L) at pH 5, a  
328 small particle size was obtained for the suspension containing nisin and pectin while a large  
329 particle size was obtained for the nisin/alginate mixture. The two polysaccharides have different  
330 charge densities and thus, we could assume that large aggregates were obtained because of the  
331 high electrostatic repulsions between the linear and anionic alginate chains (Ben Amara et al.,  
332 2017).

333 At pH 7, increasing pectin concentration up to 0.2 g/L (turbidity peak) resulted in the  
334 formation of nisin/pectin aggregates and consequently an increase of the apparent mean size  
335 that reached a  $D_{43}$  value of 88  $\mu\text{m}$  at 0.2 g/L pectin (Fig. 3). Above 0.2 g/L pectin, turbidity  
336 decreased (Fig. 1A) and aggregates dissociated gradually to re-form individual complexes and  
337 therefore the apparent size decreased (Fig. 3A). Particle size measurement was not performed  
338 for nisin/alginate complexes formed at pH 7, because of their too small size, to be analyzed  
339 with our measuring instrument. This could be explained by the strong electrostatic repulsions  
340 between alginate chains at pH 7 and at the tested alginate concentrations leading to the  
341 formation of complexes characterized by a small size.

#### 342 **3.4. Epifluorescence microscopy observations of complexes**

343 Based on microscopic observations in the fluorescence mode of the morphology of the  
344 formed complexes following the staining of nisin/pectin and nisin/alginate complexes with Nile  
345 Blue as shown in Fig. 4A and Fig. 4B, the addition of different concentrations of polysaccharide  
346 resulted in the formation of complexes or aggregates depending on pH and polysaccharide  
347 concentration. The size of the formed aggregates was rising with increasing pectin or alginate  
348 concentration at pH 3 and pH 5 (Figs. 4A and 4B) which is consistent with particle size  
349 distribution results (Figs. 3A and 3B). However, the size of aggregates that may be inferred  
350 from the microscopic observations cannot be compared with that obtained by measuring the  
351  $D_{43}$  (Figs. 3A and 3B) due to the difference between the two techniques. Indeed, if during  
352 microscopic observations, aggregates were folded between slide and cover slip, during  
353 measurement by laser diffraction, aggregates were diluted in a circulating liquid, thus  
354 completely unfolded and assimilated to spheres (Eghbal, Yarmand, Mousavi, Degraeve,  
355 Oulahal, & Gharsallaoui, 2016). Besides, the formed aggregates at pH 3 were characterized by  
356 a compact structure and thus induced an increasing turbidity. However, aggregates formed at  
357 pH 5 began to have loose and less dense structure at high pectin or alginate concentrations (Figs.  
358 4A and 4B) allowing light transmission and consequently turbidity decrease (Figs. 1A and 1B).  
359 At pH 7, increasing polysaccharide concentration up to 0.2 g/L pectin or 0.05 g/L alginate  
360 (turbidity peaks) (Figs. 1A and 1B) resulted in the formation of small nisin pectin or  
361 nisin/alginate complexes (Fig. 4). Above 0.2 g/L pectin or 0.05 g/L alginate, aggregates  
362 dissociated gradually to re-form individual complexes as evidenced by the microscopic  
363 observations (Figs. 4A and 4B).

364 The obtained results showed that nisin/pectin or nisin/alginate complexes and/or  
365 aggregates formation is dependent on polysaccharide concentration as well as on pH. These  
366 two factors had an effect on the association of complexes with each other through neutralization  
367 or bridging mechanisms which caused a change in their aspect as well as their size. It can be



368 concluded from Figs. 1–4 that the increase of turbidity upon addition of pectin or alginate to  
369 nisin for the three tested pH together with a reduction of the positive net charge and the increase  
370 in the apparent mean size indicates that nisin molecules effectively bind pectin or alginate  
371 through mainly electrostatic interactions. The formation rate of nisin/pectin or nisin/alginate  
372 complexes and/or aggregates and their size will depend on the difference between the charge  
373 densities of the two oppositely charged biopolymers (i. e. cationic nisin and anionic  
374 polysaccharide) at each pH. Therefore, the effect of biopolymer mixing ratio is critical for  
375 controlling the charge balance within the mixed systems (Bayarri et al., 2014). The formed  
376 aggregates showed different shapes and an overall negative electrostatic charge especially at  
377 low pH values and high polysaccharide concentrations. Thus, it seems that nisin molecules are  
378 entrapped within a polysaccharide network. Krivorotova et al. (2016) used three types of pectin  
379 with different methoxylation degrees to prepare nanoparticles incorporating nisin for food  
380 preservation, in the pH range of 4.0-7.0 and proposed that nisin plays a role of bridging anionic  
381 polysaccharides like  $\text{Ca}^{2+}$  in the polysaccharide network. It seems that the nature of the obtained  
382 complexes and/or aggregates was largely dependent on the polysaccharide structure (Chang,  
383 McLandsborough, & McClements, 2014). Pectin molecules are composed from linear anionic  
384 carbohydrate chains that may be involved in electrostatic interactions, as well as neutral  
385 carbohydrate side chains ('hairy' regions) that might provide steric effects. However, alginate  
386 is a linear anionic polysaccharide without neutral side chains. Besides, the possible localization  
387 of nisin molecules within the network formed by pectin or alginate chains could be explained  
388 by the low molecular mass of this peptide (~3,510 kDa) compared to that of pectin or alginate  
389 (Morris, Foster, & Harding, 2000). From the obtained results and observations, one could  
390 assume that nisin is "encapsulated" within a network based on pectin or alginate especially at  
391 high polysaccharide concentrations.

### 392 **3.5. UV-Vis spectra analysis**

### 393 **3.5.1. UV-Vis absorption spectra of nisin as a function of pH**

394 UV-Vis absorption spectra were chosen to study the changes of peptide secondary and  
395 tertiary structure under different pH conditions (Fig. 5A). The absorption nisin spectra exhibited  
396 one main peak. This peak was located in the far UV region (226 nm) and reflects the peptide  
397 backbone structure. Generally speaking, the  $\pi$ - $\pi^*$  transition of the peptide backbone structure  
398 C=O can be characterized by the UV-vis absorption peak at the low wavelength region (Zhao,  
399 Liu, Chi, Teng, & Qin, 2010). Nisin does not absorb at 280 nm because this peptide structure  
400 does not include aromatic amino acids. The intensity at 226 nm decreased slightly when  
401 increasing the pH from pH 3 to pH 5 and remarkably at pH 7. At the same time, the maximum  
402 absorption peak moved to shorter wavelengths (blue shift) when the pH increased implying that  
403 the peptide moieties were shielded from the aqueous environment to a less polar one when the  
404 pH increased from 3 to 7 which is consistent with the decreased water solubility of nisin A at  
405 pH 7.

### 406 **3.5.2. UV-Vis spectra of nisin/pectin and nisin/alginate complexes**

407 UV-Vis absorption spectra of nisin for increasing pectin or alginate concentrations (0-4  
408 g/L) at different pH conditions were recorded in order to explore nisin conformational changes  
409 induced by complexation with pectin or alginate as well as the effect of pH on nisin/ pectin or  
410 nisin/alginate interactions. As previously stated, the UV-Vis absorption spectrum of nisin  
411 showed a strong band having a maximum intensity at 226 nm under different pH values. The  
412 absorbance intensity at 226 nm of nisin/pectin and nisin/alginate complexes changed without  
413 any shift of the peaks with increasing polysaccharide concentration regardless of the pH value  
414 (data not shown). This shift absence may indicate that there is a strong binding and a large  
415 affinity between pectin or alginate and nisin. Meanwhile, the variation in the 226 nm peak  
416 intensities values imply that the interactions between pectin or alginate and nisin at various pH  
417 values may cause some changes in the polypeptide backbone structure of nisin. These spectral

418 changes might arise from the disturbance of the microenvironment around the peptide caused  
419 by pectin or alginate binding. Moreover, the two studied polysaccharides seemed to bind to  
420 nisin in a concentration dependent manner. Majee, Ray, Ghosh, Micard, & Ray (2015) found  
421 that the intensity of the peak at 224 nm of serum albumin bovine (BSA) (attributed to the  
422 polypeptide backbone conformation) decreased with gradual addition of an antiradical  
423 polysaccharide extracted from *Capsicum annuum* to BSA and the maximum wavelength ( $\lambda$   
424 max) shifted towards longer wavelength (8 nm). The authors attributed these spectral changes  
425 to the disturbance of the microenvironment around the protein caused by the interactions with  
426 the polysaccharide.

427         In order to study the effect of pH and pectin complexation on the molecular properties of  
428 nisin, the variation of the intensity at 226 nm was determined from the UV-Vis absorption  
429 spectra recorded (Fig. 5B). With gradual addition of pectin to nisin solution, the intensity of the  
430 peak at 226 nm increased slightly at pH 3 and pH 5. The gradual and slow increase in the  
431 absorption peak at 226 nm during the complexation and aggregation phases could be related to  
432 the formation of a ground state complex between pectin and nisin and/or to the fact that the  
433 peptide strand structure of nisin was slightly changed. This may imply that the binding of pectin  
434 to nisin caused changes in the nisin backbone structure leading to a more compact structure of  
435 the peptide skeleton. At pH 3 and pH 5, the absorbance at 226 nm increased similarly and  
436 remained high at its maximum value even if the pectin content continued to increase which may  
437 indicate a weak dissociation of aggregates especially at pH 3. This observation is in agreement  
438 with the measured values of turbidity which were still high when the pectin concentration  
439 increased (Fig. 1A). It can be assumed that nisin is completely immobilized in the pectin  
440 network with a slightly modified structure under acidic conditions. At pH 3, aggregation  
441 continued for high pectin concentrations probably because the electrostatic repulsions were  
442 weak. This could be related to the low charge density of pectin molecules at this pH. Besides,

443 at pH 5, dissociation started at high pectin concentrations probably because of the electrostatic  
444 repulsions between the anionic pectin chains. At pH 7, the intensity at 226 nm increased less  
445 reflecting the lower complexes formation when pectin was added to nisin (Fig. 5B). This may  
446 be attributed to the weak interactions between nisin and pectin at this pH value. Complexation  
447 was inhibited because of the poor nisin solubility and positive charge at this pH.

448 To evaluate the effect of pH on nisin/alginate interactions after the addition of increasing  
449 amounts of alginate to a fixed concentration of nisin, the variation of the intensity at 226 nm  
450 was determined from the UV-Vis absorption spectra recorded (Fig. 5C). With gradual addition  
451 of alginate until 1 g/L to nisin, the intensity of the peak at 226 nm increased slightly at pH 3  
452 and significantly at pH 7. This gradual increase could be related to the formation of  
453 nisin/alginate complexes that caused changes in the nisin backbone structure. Above 1 g/L  
454 alginate concentration, the intensity of the peak at 226 nm reached a pseudo-plateau for  
455 complex coacervates formed at pH 3 or pH 7 and this could be related to a complete  
456 immobilization/stabilization of nisin structure within self-assembled biopolymer complexes  
457 (pH 7) or aggregates (pH 3). At pH 3, one could assume that, like nisin/pectin aggregates formed  
458 at this pH value, the dissociation of nisin/alginate aggregates was weak as the intensity  
459 remained high at its maximum value even when the alginate content continued to increase (Figs.  
460 5B and 5C) which is in agreement with the turbidity results (Fig. 1B). For nisin/alginate  
461 coacervates formed at pH 5, a different profile was observed as the intensity of the peak at 226  
462 nm decreased slightly until reaching a minimum at 0.3 g/L alginate concentration (Fig. 5C). A  
463 possible explanation of this result is that the binding of alginate to nisin caused a partial  
464 unfolding of the polypeptide backbone structure. This structure disordering could be explained  
465 by a rearrangement of the polypeptide carbonyl hydrogen bonding network. Krivorotova et al.  
466 (2016), studied the interactions between nisin and pectin by Fourier Transform Infrared (FTIR)  
467 spectroscopy and indicated the presence of intermolecular interactions between nisin and pectin

468 that promoted the formation of hydrogen bonding. We expected that this partial unfolding of  
469 polypeptide skeleton will be accompanied with a red shift in UV-Vis absorption spectra.  
470 However, in this work, we could suppose that the structural changes caused by alginate  
471 complexation were not noteworthy to induce a shift. After reaching a minimum intensity value,  
472 a leaping was observed generating a positive peak with a maximum at 1 g/L alginate  
473 concentration. Then, the intensity of the peak at 226 nm decreased somewhat for higher alginate  
474 concentrations. The significant increase in the intensity of the peak at 226 nm may denote the  
475 end of nisin structural rearrangement due to complexation which could be an indicator of the  
476 beginning of the partial dissociation of nisin/alginate aggregates. Taken together these  
477 observations suggest that the interaction of pectin or alginate with nisin induced conformational  
478 changes in nisin molecule. These conformational changes seemed to be dependent on pH as  
479 well as on the polysaccharide type and on the tested nisin/polysaccharide ratio. Besides, it seems  
480 that major conformational changes were noticed when nisin was complexed with increasing  
481 amounts of alginate, especially, at pH 5 and pH 7.

#### 482 **4. Conclusion**

483 In summary, the interactions between cationic nisin and anionic pectin or alginate  
484 molecules were investigated under different pH conditions (pH 3, pH 5 and pH 7) using several  
485 analytical techniques. The nature of the formed complexes (e.g., solubility, electrical charge,  
486 size, morphology) depended on the mass ratio of pectin or alginate to nisin and on pH. It could  
487 be concluded that pH is an important parameter for controlling the linear charge density of the  
488 interacting components and thus for modulating the electrostatic interactions between them.  
489 UV-Vis spectroscopy measurements showed that complexation of nisin with pectin or alginate  
490 is accompanied by changes in the polypeptide backbone structure and that conformational  
491 changes of nisin were dependent on pH as well as on polysaccharide type and concentration.  
492 Other techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), circular dichroism or

493 isothermal titration calorimetry (ITC) should be used for a better understanding of the exact  
494 molecular interactions implied in the formation of nisin/pectin or nisin/alginate complexes.  
495

496 **References**

- 497 Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme/low  
 498 methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food*  
 499 *Engineering*, *131*, 18–25.
- 500 Ben Amara, C., Eghbal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2016). Using complex  
 501 coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *Journal of Food Engineering*,  
 502 *183*, 50–57.
- 503 Ben Amara, C., Kim, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2017). Using  
 504 complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying.  
 505 *Food Chemistry*, *236*, 32–40.
- 506 Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D.J. (2012). Cationic antimicrobial ( $\epsilon$ -  
 507 polylysine)–anionic polysaccharide (pectin) interactions: Influence of polymer charge on  
 508 physical stability and antimicrobial efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,  
 509 *60*, 1837–1844.
- 510 Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D.J. (2014). Interaction of cationic  
 511 antimicrobial ( $\epsilon$ -polylysine) with food-grade biopolymers: Dextran, chitosan, carrageenan,  
 512 alginate, and pectin. *Food Research International*, *64*, 396–401.
- 513 Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of  
 514 dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, *17*, 25–39.
- 515 Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from algae. In *Biopolymers*  
 516 *Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- 517 Eghbal, N., Yarmand, M.S., Mousavi, M., Degraeve, P., Oulahal, N., & Gharsallaoui, A.  
 518 (2016). Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM  
 519 pectin and sodium caseinate. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 947–956.
- 520 Fioramonti, S. A., Perez, A. A., Aringoli, E. E., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2014).  
 521 Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-  
 522 assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, *35*, 129–136.
- 523 Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for  
 524 microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, *88*, 1–12.

- 525 Hagiwara, A., Imai, N., Nakashima, H., Toda, Y., Kawabe, M., Furukawa, F., Delves-  
526 Broughton, J., Yasuhara, K., & Hayashi, S. (2010). A 90-day oral toxicity study of nisin A,  
527 an anti-microbial peptide derived from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, in F344 rats. *Food*  
528 *and Chemical Toxicology*, *48*, 2421–2428.
- 529 Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of  $\beta$ -  
530 lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light  
531 scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, *20*, 577–585.
- 532 Hosseini, S.M., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A., German, J.B., Mortazavian, A.M.,  
533 Mohammadi, A., khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S., & Khaksar, R. (2014).  
534 Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles  
535 containing nisin. *Carbohydrate Polymers*, *103*, 573–580.
- 536 Hurst, A. (1981). Nisin. In *Advances in Applied Microbiology*, D. Perlman and Allen I. Laskin,  
537 ed. (Academic Press), *27*, 85–123.
- 538 Jones, O.G., & McClements, D.J. (2010). Functional biopolymer particles: Design, fabrication,  
539 and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*, 374–397.
- 540 Krivorotova, T., Cirkovas, A., Maciulyte, S., Staneviciene, R., Budriene, S., Serviene, E., &  
541 Sereikaite, J. (2016). Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food*  
542 *Hydrocolloids*, *54, Part A*, 49–56.
- 543 Majee, S.K., Ray, S., Ghosh, K., Micard, V., & Ray, B. (2015). Isolation and structural features  
544 of an antiradical polysaccharide of *Capsicum annum* that interacts with BSA. *International*  
545 *Journal of Biological Macromolecules*, *75*, 144–151.
- 546 Maresca, D., De Prisco, A., La Stora, A., Cirillo, T., Esposito, F., & Mauriello, G. (2016).  
547 Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary  
548 investigation. *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 436–443.
- 549 Morris, G.A., Foster, T.J., & Harding, S.E. (2000). The effect of the degree of esterification on  
550 the hydrodynamic properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, *14*, 227–235.
- 551 Ridley, B.L., O'Neill, M.A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and  
552 oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, *57*, 929–967.
- 553 Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M., & Siezen, R.J. (1995). Improvement of  
554 solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and*  
555 *Environmental Microbiology*, *61*, 2873–2878.



- 556 Toppazzini, M., Coslovi, A., Boschelle, M., Marsich, E., Benincasa, M., Gennaro, R., and  
557 Paoletti, S. (2011). Can the interaction between the antimicrobial peptide LL-37 and alginate  
558 be exploited for the formulation of new biomaterials with antimicrobial properties?  
559 *Carbohydrate Polymers*, 83, 578–585.
- 560 Yang, Y., Anvari, M., Pan, C.-H., & Chung, D. (2012). Characterisation of interactions between  
561 fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 135, 555–561.
- 562 Zhao, X., Liu, R., Chi, Z., Teng, Y., & Qin, P. (2010). New insights into the behavior of bovine  
563 serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: comprehensive spectroscopic studies.  
564 *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 5625–5631.

565 **Figures captions**

566 **Fig. 1.** Dependence of the turbidity (at 600 nm) of mixed biopolymer solutions on pH and pectin  
567 concentration **(A)** or alginate concentration **(B)** when pectin or alginate solutions were titrated  
568 into nisin solution (5 g/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7).

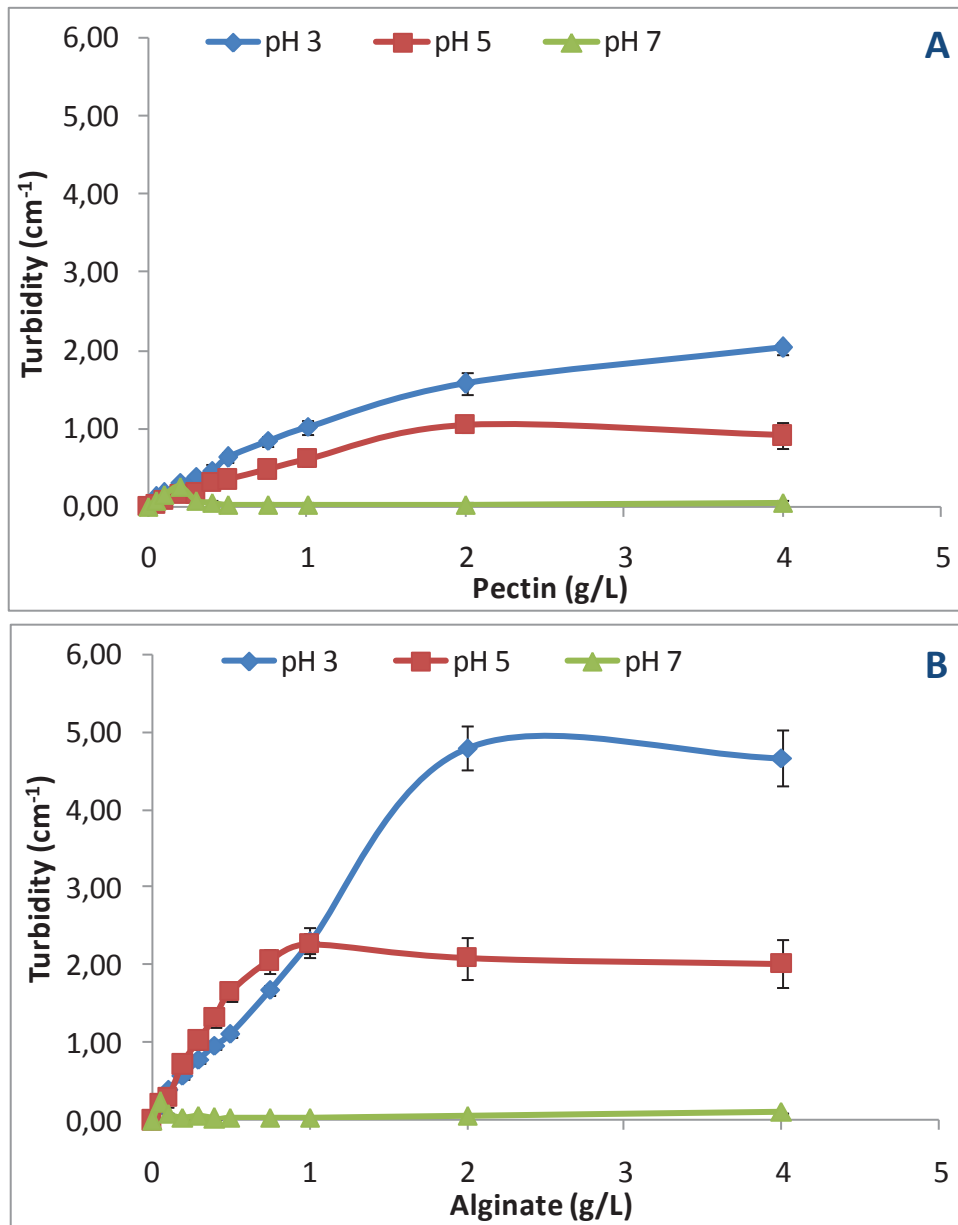
569 **Fig. 2.** Dependence of the  $\zeta$ -potential of stock solutions of pectin or alginate and nisin on pH  
570 (pH 3-11) **(A)** and dependence of the  $\zeta$ -potential of mixed biopolymer solutions on pH and  
571 pectin concentration **(B)** or alginate concentration **(C)** when pectin or alginate solutions were  
572 titrated into nisin solution (imidazole-acetate buffer, 5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7).

573 **Fig. 3.** Dependence of the particle size distribution of mixed biopolymer solutions on pH and  
574 **(A)** pectin concentration or **(B)** alginate concentration when pectin or alginate solutions were  
575 titrated into nisin solution (5 g/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7).

576 **Fig. 4.** Microscopic structure of nisin/pectin **(A)** and nisin/alginate complexes **(B)** observed by  
577 epifluorescence microscopy when pectin or alginate solutions were titrated into nisin solution  
578 (5 g/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7). Nisin was stained by Nile Blue  
579 (dye/polypeptide ratio = 1/100 (w/w)).

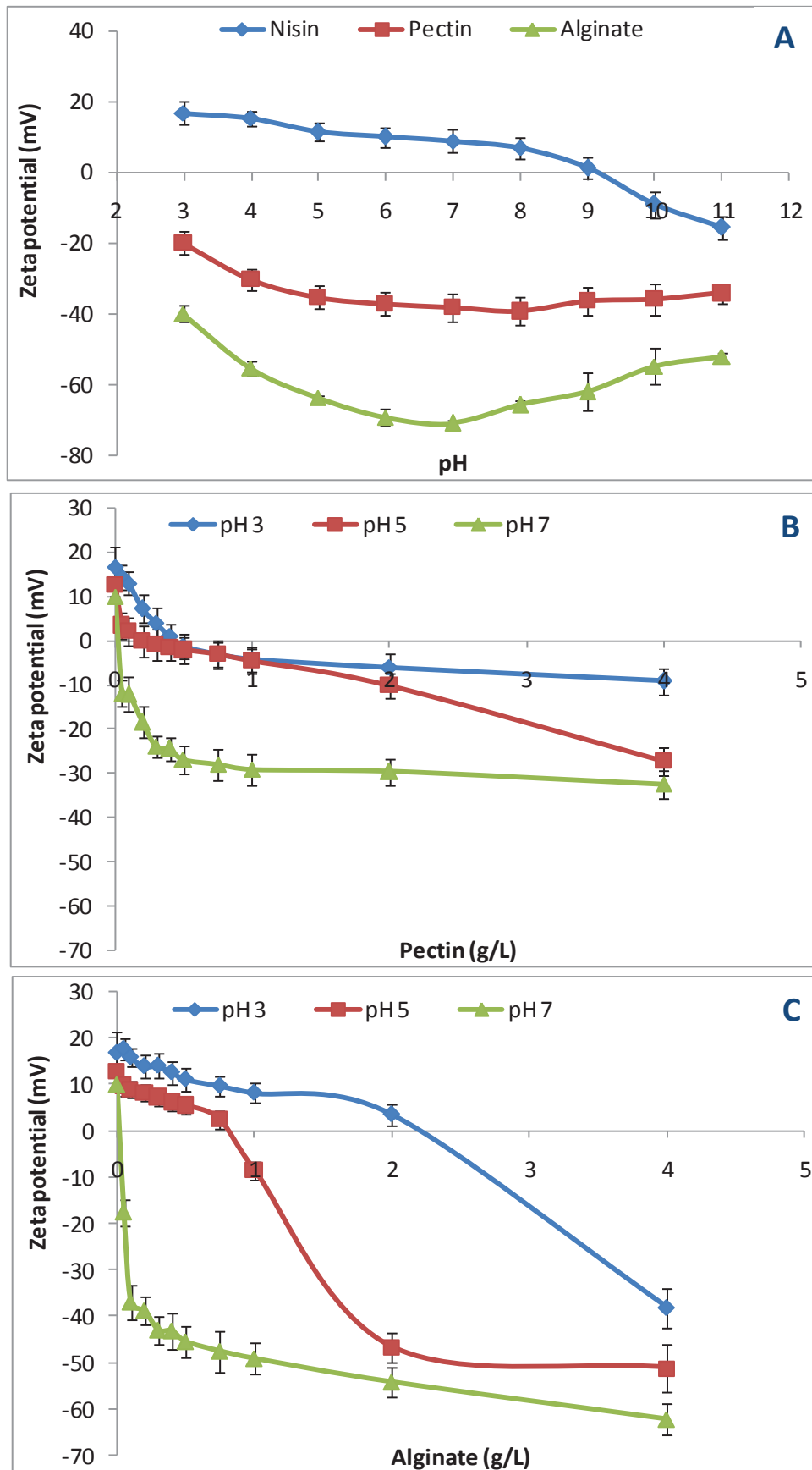
580 **Fig. 5.** Dependence of nisin UV-Vis absorption spectra (which allowed to determine the  
581 maximum intensity for each pectin or alginate concentration) on pH **(A)** and dependence of the  
582 maximum absorption intensity (at 226 nm) of mixed biopolymer solutions on pH and pectin  
583 concentration **(B)** or alginate concentration **(C)** when pectin or alginate solutions were titrated  
584 into nisin solution (5 g/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7). Suspensions  
585 of complexes were diluted 15 times before measurements.

586 Figure 1



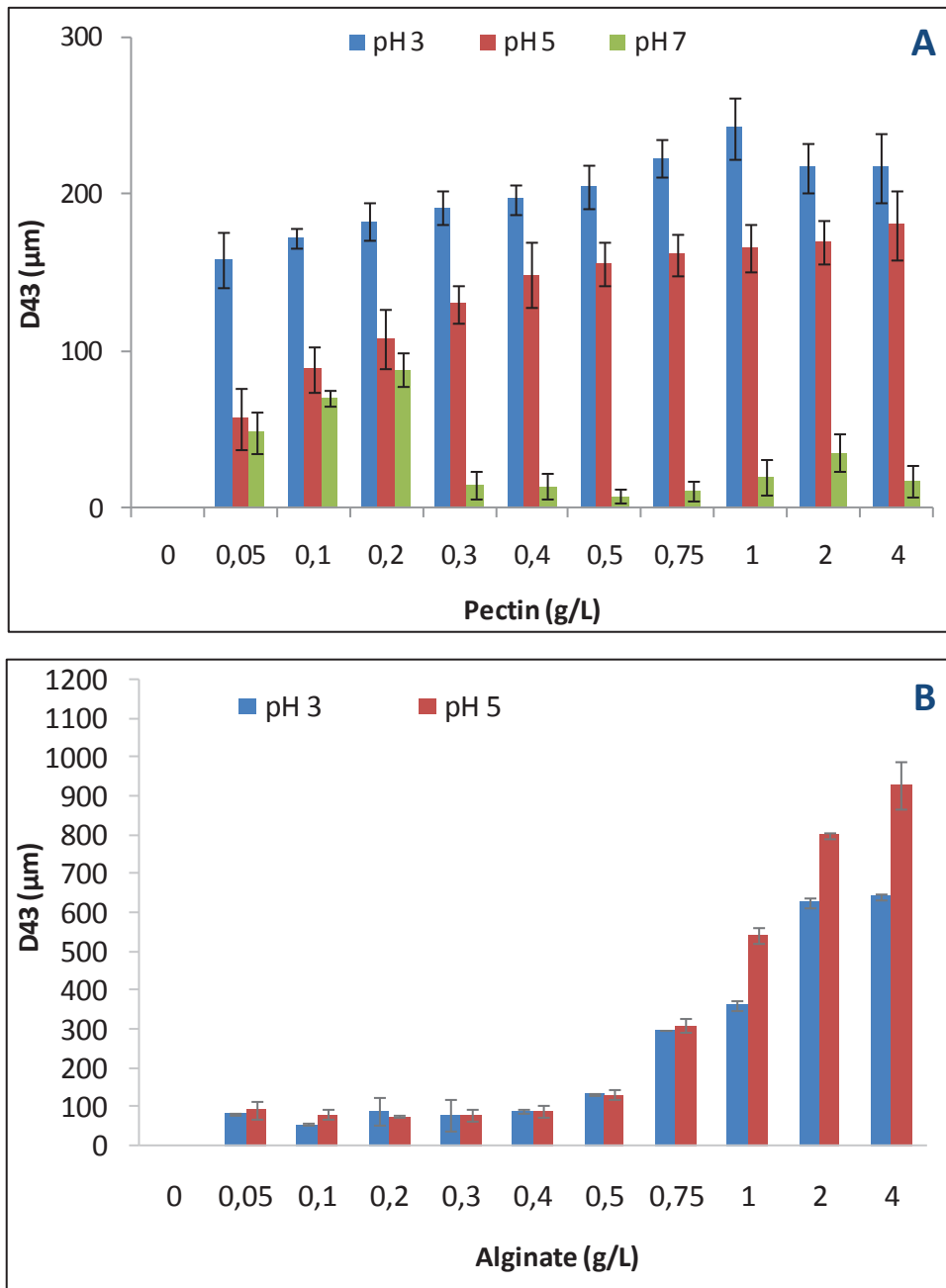
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601

602 Figure 2



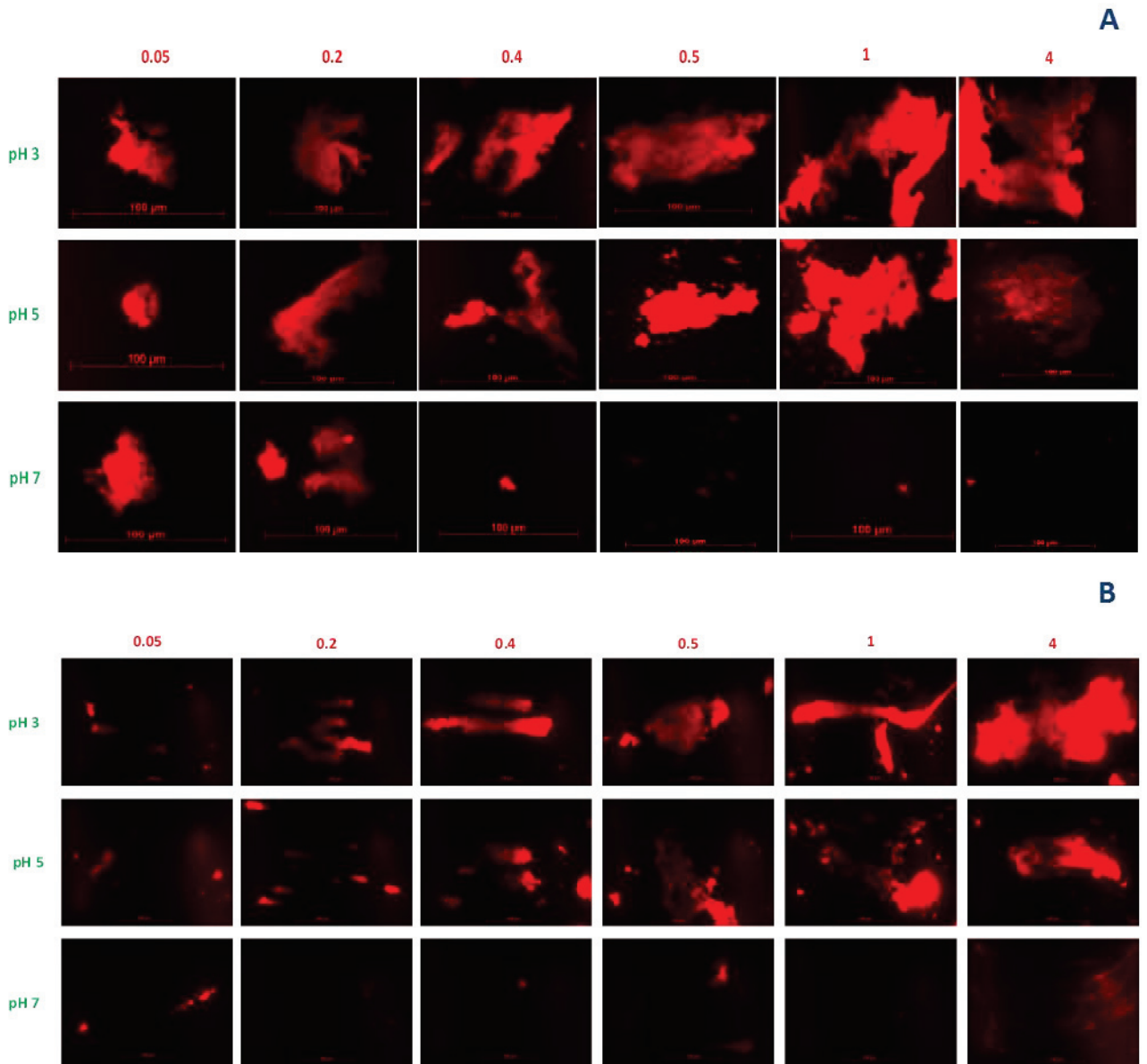
603

604 **Figure 3**



605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617

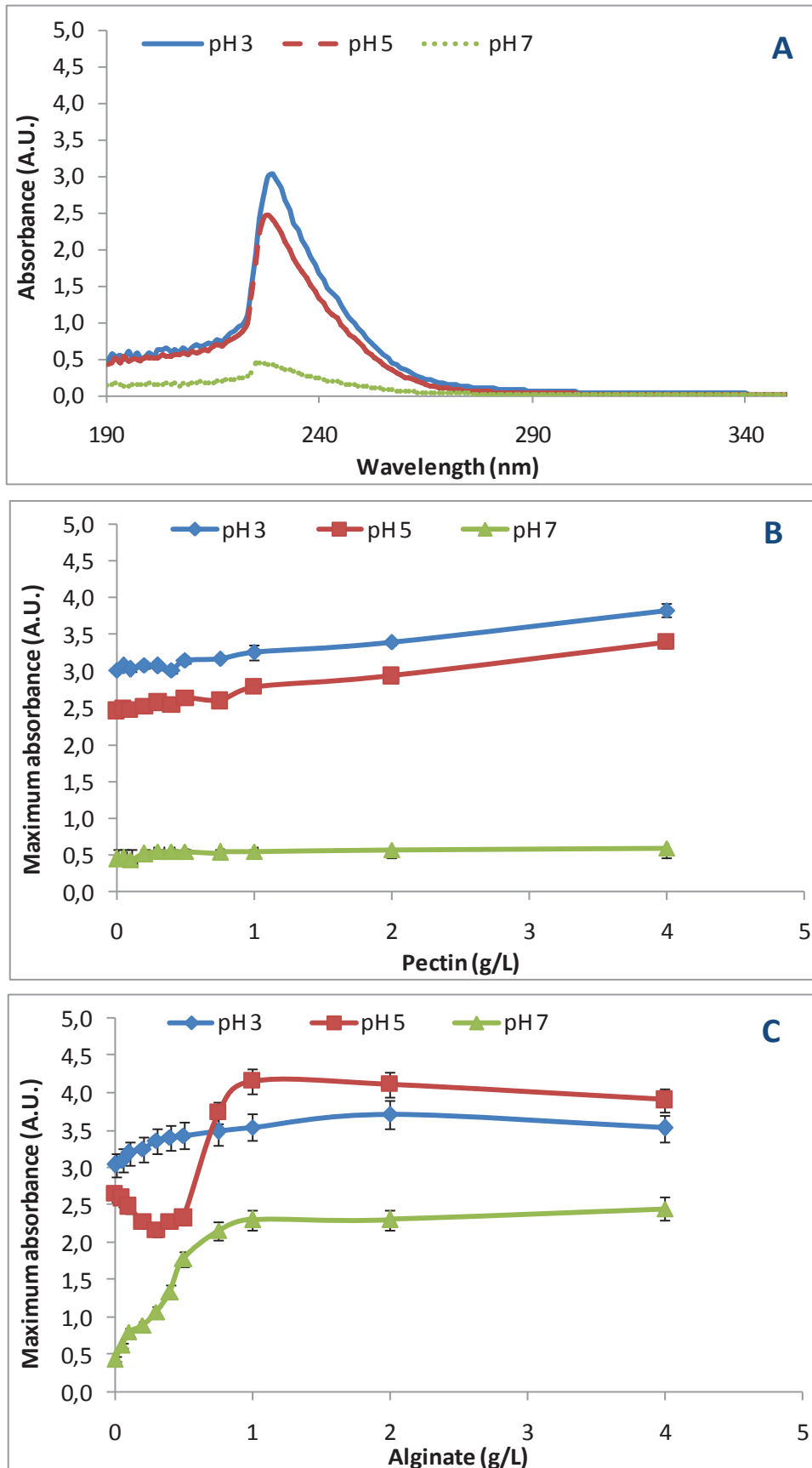
618 Figure 4



619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634

635

636 Figure 5



637

### **III.4.3. Conclusion**

Cette étude a montré qu'il est possible d'établir des interactions nisine/pectine ou nisine/alginate dans une large gamme de pH allant de 3 à 7. Il a été montré que le pH est un paramètre important qui influence la densité des charges de la nisine et de la pectine ou de l'alginate et par conséquent les interactions qui s'établissent entre ces molécules mais aussi la nature des complexes formés. De plus, il a été montré que la formation et l'agrégation des complexes nisine/pectine ou nisine/alginate a été promue dans des conditions acides (pH 3 et pH 5). Cette agrégation s'est traduite par un changement au niveau de la morphologie, de la taille apparente et du potentiel zêta des complexes. Toutefois, la formation des complexes nisine/pectine ou nisine/alginate a été faible à pH 7. D'un autre côté, l'analyse spectroscopique dans l'UV a révélé que l'addition de quantités croissantes de polysaccharide a affecté la structure ou le micro-environnement du squelette peptidique de la nisine. Les changements structuraux de la nisine ont été à la fois dépendants du pH, du polysaccharide utilisé et du ratio peptide/polysaccharide.



### **III.5. Films antimicrobiens contenant la nisine complexée**

#### **III.5.1. Introduction**

La section précédente a concerné l'étude de l'effet du pH sur les interactions entre la nisine, un peptide cationique, et la pectine ou l'alginate, deux polysaccharides anioniques. Les propriétés physico-chimiques des complexes nisine/pectine et nisine/alginate formés à trois pH distincts ont également été caractérisées. Dans cette section, nous avons essayé de démontrer le potentiel de ces complexes pour le développement de films d'emballage antimicrobiens comestibles destinés à la préservation des aliments. Pour cela, nous nous sommes basés sur le mode d'action de la nisine au niveau de la membrane bactérienne. En effet, l'extrémité C-terminale de la nisine permet l'établissement d'interactions électrostatiques entre le peptide, chargé positivement, et les phospholipides membranaires, chargés négativement. L'hydrophobicité de l'extrémité N-terminale de la nisine assure son insertion dans la membrane lipidique cellulaire entraînant sa perméabilisation. C'est pourquoi, nous avons jugé important d'étudier les interactions nisine/polysaccharide en fonction du pH et l'influence de la complexation sur l'hydrophobicité de surface du peptide. Ensuite, la structure des films à base de complexes nisine/pectine ou nisine/alginate obtenus aux trois pH a été étudiée et l'activité antimicrobienne des films obtenus a également été évaluée vis-à-vis de deux souches de bactéries à Gram positif : *Listeria innocua* (choisie car non pathogène mais apparentée à la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes*) et *Kocuria rhizophila* (choisie pour sa très grande sensibilité à la nisine). Les résultats de cette partie sont présentés sous forme d'un article soumis au journal « *LWT-Food Science and Technology* ».

#### **III.5.2. Effect of pH on nisin/pectin and nisin/alginate complex coacervation: Formation and properties of antimicrobial films**

1  
2 **Effect of pH on nisin/pectin and nisin/alginate complex**  
3 **coacervation: *Formation and properties of antimicrobial films***  
4  
5  
6  
7  
8

9 Chedia Ben Amara, Pascal Degraeve, Adem Gharsallaoui\*

10 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, Laboratoire  
11 BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe  
12 Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000,  
13 Bourg en Bresse, France

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22 \*Corresponding author:

23 Dr. Adem GHARSALLAOUI

24 [adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr](mailto:adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr)

25 Phone (+33) 4 74 47 21 44

26 Fax. (+33) 4 74 45 52 53

27

28 **Abstract**

29       The aim of this work was to study the influence of pH on the properties of nisin/pectin or  
30 nisin/alginate coacervates and the effect of complexation on the preservation of nisin structure  
31 as well as antimicrobial activity in order to develop edible antimicrobial films. Macroscopic  
32 observations revealed that the addition of increasing amounts of pectin or alginate (0-4 g/L) to  
33 a fixed nisin concentration (5 g/L) induced an increase in turbidity of nisin/pectin or  
34 nisin/alginate mixtures especially under acidic conditions. The results were interpreted in terms  
35 of association of nisin/pectin or nisin/alginate complexes. At pH 7, complexation was limited  
36 probably because of the low positive charge and the poor solubility of nisin. Besides, extrinsic  
37 fluorescence measurements revealed that increasing pectin or alginate concentration affected  
38 nisin surface hydrophobicity especially at pH 3 and pH 5. Nisin/pectin and nisin/alginate  
39 coacervates were then used to manufacture antimicrobial films at the three tested pH. The  
40 structure of the elaborated films and their antimicrobial activity were largely dependent on pH  
41 and were correlated with the properties of complexes in solution.

42

43 **Keywords:** Nisin, Pectin, Alginate, Complexation, pH, Surface hydrophobicity, Edible  
44 antimicrobial films.

45 **Introduction**

46 Nisin is an amphiphilic positively charged peptide that belongs to the class I of  
47 bacteriocins produced by certain strains of *Lactococcus lactis*. It has a molecular weight of 3.5  
48 kDa. Nisin has a relatively broad spectrum of bacteriolytic and bactericidal activities against  
49 Gram positive food spoilage bacteria. The C-terminal extremity of this peptide, with its  
50 hydrophilic character, ensures the formation of electrostatic interactions between positively  
51 charged nisin groups and negatively charged bacterial membrane phospholipids. However,  
52 nisin insertion in the lipid cell membrane is ensured by its hydrophobic N-terminal extremity  
53 causing the permeabilization of lipid cell membrane (McAuliffe, Ross, & Hill, 2001).

54 Incorporation of nisin into polysaccharides-based films can protect this peptide from the  
55 physico-chemical environmental conditions (pH, oxygen, temperature, ionic strength) as well  
56 as from the action of proteolytic enzymes. This can also limit its interaction with food  
57 components and the loss of its activity during food storage. Moreover such systems might also  
58 be used to control its release (Wan, Gordon, Muirhead, Hickey, & Coventry, 1997;  
59 Gharsallaoui, Joly, Oulahal, & Degraeve, 2015). In recent years, several studies have developed  
60 polysaccharide-based matrices containing nisin for food contact applications and demonstrated  
61 how this process can enhance the safety and quality of food products by reducing the growth of  
62 food borne and spoilage microorganisms while using minimum amounts of the antimicrobial  
63 agent.

64 Pectin is a water soluble polysaccharide essentially made up of D-galacturonic residues.  
65 It has a negative charge because ionized carboxylic acid groups are present along its backbone  
66 (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001). This hydrocolloid has been widely used in food industry  
67 for its gelling and thickening properties. Liu, Jin, Coffin, & Hicks (2009) showed that pectin  
68 addition improves nisin thermal stability and preserves its antimicrobial activity by the  
69 formation of complexes when incorporated in extruded polylactic acid (PLA) films.

70 Alginates, hydrophilic, natural and polyanionic polysaccharides, are salts of alginic acids.  
71 They are binary copolymers made up of  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) and  $\beta$ -D-mannuronic acid (M)  
72 residues, linearly linked *via* 1-4 linkages. So, an alginate molecule is considered as a block  
73 copolymer consisting of three types of G, M, and GM blocks with different relative proportions  
74 that determine physico-chemical and functional properties of alginates (Draget, Smidsrød, &  
75 Skjåk-Bræk, 2005). Sodium alginate, the main known form, is used in various food products as  
76 a stabilizer and a thickener (Goh, Heng, & Chan, 2012). Wan et al. (1997), incorporated nisin  
77 into a solid matrix of calcium alginate to form antimicrobial microcapsules and showed that  
78 this strategy did not affect nisin antimicrobial activity. Besides, nisin significantly inhibited the  
79 growth of food borne pathogens when incorporated into alginate-based films (Millette, Le Tien,  
80 Smoragiewicz, & Lacroix, 2007).

81 The aim of this study was (i) to evaluate the influence of pH on the complexation of nisin  
82 with increasing concentrations of pectin or alginate, (ii) to study nisin structural modifications  
83 throughout its complexation with pectin or alginate by surface hydrophobicity analysis and (iii)  
84 to evaluate its antimicrobial activity when incorporated in pectin or alginate-based films.

85 **2. Materials and Methods**

86 **2.1. Materials**

87 Dried powder of nisin A (95% w/w of nisin A and 5% w/w moisture as specified in the  
88 product data sheet) produced by fermentation using the bacterium *Lactococcus lactis* was  
89 obtained from Handary (Lendeledé, Belgium). Low methoxyl amidated pectin (Unipectine™  
90 OF 305 C SB, degree of esterification from 22% to 28% and degree of acetylation from 20% to  
91 23%) and sodium alginate (Algogel 6020) were obtained from Cargill (Baupte, France).  
92 Analytical grade imidazole (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), acetic acid, hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide  
93 (NaOH), 1-AnilinoNaphthalene-8-Sulfonate (ANS), Nile Blue A, and glycerol were purchased  
94 from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). The preparation of all solutions was  
95 done using deionized water.

96 **2.2. Preparation of pectin, alginate and nisin solutions**

97 The preparation of stock solutions of pectin as well as alginate (30 g/L) and nisin (10 g/L)  
98 was performed by dispersing powders in an imidazole-acetate buffer (5 mM) at pH 3, pH 5 and  
99 pH 7 and stirred for at least 2 h at 25 °C until the desired hydration was obtained. In order to  
100 adjust the pH, HCl (1 mol.L<sup>-1</sup>) or NaOH (1 mol.L<sup>-1</sup>) were added. Nisin, pectin and alginate  
101 solutions were then centrifuged (10000 × g; 30 min) (Sigma 3K18, Bioblock Scientific, Illkirch,  
102 France) to eliminate the insoluble residues.

103 **2.3. Formation of nisin/pectin and nisin/alginate complexes**

104 Biopolymer mixtures containing nisin (5 g/L) and pectin or alginate (0-4 g/L) were  
105 prepared at 25 °C by mixing different ratios of the stock solutions with imidazole-acetate buffer  
106 (5 mM) at pH 3, pH 5 and pH 7, respectively.

107 **2.4. Surface hydrophobicity**

108 Extrinsic fluorescence measurements were performed in the mixed systems by using the  
109 hydrophobic fluorescence probe 1-anilino-8-naphtalenesulphonic acid (ANS) according to  
110 Khodarahmi, Karimi, Ashrafi Kooshk, Ghadami, & Ghobadi (2012) with some modifications.  
111 The probe solution was prepared at 0.02 wt % in imidazole–acetate buffer (5 mM) at pH 5. For  
112 all pectin or alginate concentrations (0-4 g/L) and for a fixed nisin concentration in the mixing  
113 systems (5 g/L) prepared at pH 3, pH 5 and pH 7, increasing fractions of ANS (0.02 wt %)   
114 between 5 and 25  $\mu$ L were added to 5 mL of each suspension. Emission wavelengths were  
115 recorded in a wavelength range of 420–650 nm following excitation at 380 nm. The excitation  
116 and emission bandwidths were 5 nm and 4 nm, respectively. The changes in fluorescence  
117 caused by the binding of ANS to the surface hydrophobic regions of the peptide were monitored  
118 with a LS 55 spectrofluorometer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The increase in  
119 fluorescence emission was recorded until no further increase was observed. The maximum  
120 fluorescence intensity was then plotted as a function of the concentration of ANS. The initial  
121 slope of the fluorescence intensity (arbitrary unit, a.u.) versus ANS concentration (mg/L) plot  
122 was calculated and was used as an index of nisin surface hydrophobicity ( $S_0$ ). Each spectrum  
123 was obtained in triplicate. The average of at least three measurements was included in figures  
124 by means of error bars. All measurements were performed at room temperature (25 °C), using  
125 a quartz cuvette (1 cm path length).

## 126 **2.5. Preparation of antimicrobial films containing nisin/pectin or nisin/alginate complexes**

127 Film-forming aqueous solutions were prepared to contain 5 g/L pectin or alginate,  
128 glycerol as a plasticizer (0.3 g/g of pectin), and nisin as an antimicrobial agent (0.2 g/L). The  
129 films were made in order to contain 63  $\mu$ g of nisin per  $\text{cm}^2$ . Pectin or alginate were dissolved  
130 in imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7) at 25 °C for 2 h under magnetic  
131 stirring. Afterwards, glycerol and nisin solution were incorporated under the same conditions  
132 while stirring for 15 min more. Each film was prepared by weighing 20 g of film-forming

133 solution and this mass was spread evenly over a plastic Petri dish (90 mm). Films were formed  
134 by drying overnight at 25 °C under laminar hood and dry films were peeled intact from the  
135 casting surface.

## 136 **2.6. Epifluorescence microscopy**

137 An optical microscope Axiovert 25 CFL (Prolabo, France) was used in the fluorescence  
138 mode to examine the microstructure of nisin/pectin or nisin/alginate films. Nisin was stained  
139 with Nile Blue (5 µL of 1 wt% dye solution added to nisin/pectin or nisin/alginate films to  
140 obtain approximately a dye-peptide ratio of 1:100 (w:w)). Observations were performed at least  
141 30 min after diffusion of the dye into the matrix of the films. The films were then poured  
142 between a slide and a coverslip and then observed by a 100X-oil immersion objective lens.  
143 Samples were excited at 630 nm. Fluorescence intensity data were collected in a channel  
144 corresponding to 610–660 nm. Digital image files were acquired with a Nikon F90X camera  
145 connected to a digital image processing system (AxioVision, Zeiss, Germany).

## 146 **2.7. Scanning Electron Microscopy**

147 Surface morphology of nisin/pectin or nisin/alginate films formed at pH 3, pH 5 and pH  
148 7 was observed by scanning electron microscopy (4000× magnification for pectin or alginate  
149 films and 2000× or 1200x magnification for pectin or alginate films containing nisin). Films  
150 were attached to a sample stub with a double-sided sticky tape. Then, the specimens were  
151 examined using a scanning electron microscope (Hitachi Tabletop Microscope, TM3030) at an  
152 accelerating voltage of 15 kV.

## 153 **2.8. Study of the antibacterial activity of nisin/pectin or nisin/alginate based films**

154 Stock cultures of two Gram-positive bacterial strains, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341  
155 and *Listeria innocua* ATCC 33090, were maintained at -20 °C in Tryptone Soy Broth (TSB),  
156 15% (v/v) glycerol. Before each antibacterial activity assay, the two tested bacteria were  
157 subcultured in TSB at 10% (v/v) during 8 h and then subcultured in TSB at 10 % (v/v) during



158 16 h at 30 °C and then precultured in TSB for 5 h at 30 °C for the requested experiment. The  
159 dilution of the bacterial cells was done in Tryptone Salt (TS) broth to final concentrations of 4  
160  $\times 10^6$  CFU/mL for *K. rhizophila* and  $1 \times 10^7$  CFU/mL for *L. innocua* and incorporated at 5 %  
161 (v/v) in Tryptone Soy Agar (TSA) and poured in Petri dishes. Discs (10 mm in diameter) were  
162 excised from pectin or alginate films with or without (control) nisin prepared at pH 3, pH 5 and  
163 pH 7 with a cork borer. The disks were placed onto TSA plates inoculated with *L. innocua* or  
164 *K. rhizophila*. Pre-incubation of the prepared Petri dishes was performed during 3 h at 4 °C to  
165 favor nisin diffusion in TSA. Petri dishes were then incubated during 24 h at 30 °C. The  
166 diameter of obtained inhibition zones was then measured by subtracting the diameter of the film  
167 from the diameter of the total inhibition zone.

## 168 **2.9. Statistical analysis**

169 All experiments were performed using at least three freshly prepared samples. The results  
170 presented are the means and standard deviations that were calculated from these replicate  
171 measurements.

### 172 3. Results and discussion

#### 173 3.1. Macroscopic observations of nisin/pectin and nisin/alginate suspensions

174 Visible observation of nisin/pectin or nisin/alginate solutions prepared at pH 3 and pH 5  
175 (Fig. 1A and Fig. 1B) showed that they initially became turbid as polysaccharide concentration  
176 increased. Addition of higher polysaccharide concentrations resulted in the precipitation of  
177 large aggregates to the bottom that could be observed by the naked eye. This optical trouble  
178 increase was attributed to the increase of the number and/or the size of nisin/pectin or  
179 nisin/alginate complexes and/or aggregates. Aggregation phenomenon could be explained by  
180 the establishment of electrostatic pectic or alginate bridges between nisin positively charged  
181 sites that remained free at the surface of individual complexes (Bayarri, Oulahal, Degraeve, &  
182 Gharsallaoui, 2014 ; Ben Amara, Eghbal, Degraeve, & Gharsallaoui 2016). Moreover, it is clear  
183 that, under acidic conditions the turbidity of nisin/alginate suspensions was higher than that of  
184 nisin/pectin solutions for the tested polysaccharide concentrations (Fig. 1A and Fig. 1B). The  
185 coacervate phase was also more pronounced for nisin/alginate solutions indicating that the  
186 formed aggregates were large enough to sediment in the bottom of test tubes. This is consistent  
187 with our recent observation that when nisin (5 g/L) was mixed with alginate or pectin (2 g/L)  
188 at pH 5, particles with either a small or a large size were obtained with alginate or pectin,  
189 respectively. Pectin and alginate have different charge densities and thus, the formation of large  
190 complexes and/or aggregates could be explained by the high electrostatic repulsions between  
191 the linear anionic alginate chains (Ben Amara, Kim, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2017).  
192 It was also noticed that for biopolymer mixtures formed at pH 5, turbidity decreased slightly  
193 for pectin and alginate concentrations above 2 g/L and 1 g/L, respectively. This could be  
194 attributed to the partial dissociation of nisin/pectin or nisin/alginate aggregates because of the  
195 strong electrostatic repulsions at pH 5 and at high polysaccharide concentrations. At pH 3, it  
196 seems that the electrostatic repulsions were not strong enough, even at high polysaccharide

197 concentration, to induce the dissociation of nisin/pectin or nisin/alginate aggregates. For  
198 suspensions prepared at pH 7, a steep increase of turbidity was noticed until 0.2 g/L pectin  
199 concentration and 0.05 g/L alginate concentration indicating the limited formation of insoluble  
200 complexes. However, at higher polysaccharide levels, the turbidity decreased gradually until it  
201 became close to zero and the samples were optically clear (Fig. 1A and Fig. 1B).

### 202 **3.2. Surface hydrophobicity of nisin after forming complexes with pectin or alginate**

203 The analysis of surface hydrophobicity of proteins or peptides has been identified as a  
204 useful method to study their conformation and to control their surface activity. The extrinsic  
205 fluorescence was studied by determining the peptide surface hydrophobic values ( $S_0$ ) in the  
206 mixed systems with increasing pectin or alginate concentration for pH 3, pH 5 and pH 7 with  
207 the aid of the fluorescent probe (ANS) (Fig. 2A and Fig. 2B).  $S_0$  is an indicative of the number  
208 of hydrophobic amino acid residues on the peptide surface. A sharp increase in the fluorescence  
209 intensity of ANS is noticed when the rotational motion of its phenylamino group is restricted  
210 or when it is located in a hydrophobic environment. This probe binds to proteins or peptides in  
211 a non-covalent way by means of electrostatic or hydrophobic interactions (Someya & Yui,  
212 2010). In presence of nisin, ANS fluorescence intensity increased dramatically and a blue shift  
213 of  $\lambda$  max from 520 to 480 nm was noticed, indicating that the probe molecules were bound to  
214 the hydrophobic segments of nisin and were shielded from the solvent.

215 A difference in surface hydrophobicity for free nisin (without pectin or alginate) as a  
216 function of pH is noticed. Indeed,  $S_0$  increased with increasing pH (Fig. 2A and Fig. 2B). This  
217 could be attributed to differences in structure and solubility of the peptide. Nisin is expected to  
218 engage conformational changes when pH increases and approaches or exceeds neutrality that  
219 may reflect on ANS fluorescence production or the number of available sites. Moreover, ANS  
220 capacity to bind to peptides is assignable to electrostatic and stoichiometric relationships

221 dependent on polypeptide or polyamino acid number of cationic charges, and hence is  
222 dependent on pH and amino acid composition (Matulis & Lovrien, 1998).

223 For nisin/pectin and nisin/alginate solutions prepared at pH 3 and pH 5,  $S_0$  increased  
224 sharply following the introduction of small concentrations of pectin or alginate indicating that  
225 ANS was bound to the peptide in a better proportion (Fig. 2A and Fig. 2B). This could be related  
226 to the increase of nisin/pectin or nisin/alginate interactions as the polysaccharide concentration  
227 increased. Thus, ANS was bound to nisin in a higher proportion and this could be due to a better  
228 exposition of the hydrophobic binding sites on polypeptide's molecular surface after its partial  
229 unfolding within the self-assembled biopolymer complexes/aggregates, thus increasing ANS  
230 binding affinity. A more hydrophobic environment was probably formed around the ANS  
231 labeled peptide because of water molecules displacement subsequent to binding of nisin to  
232 either pectin or alginate thus causing an increase in fluorescence intensity with pectin or alginate  
233 addition. The increase in  $S_0$  values could also be related to the attractive interactions between  
234 polysaccharides and peptides inducing dynamic modifications or rearrangements of peptides  
235 (Cheng, Ma, Li, Yan, & Cui, 2015). In the case of nisin/pectin complexes,  $S_0$  increased until  
236 reaching a plateau above a 2 g/L pectin threshold concentration at pH 3 and above a 1 g/L pectin  
237 threshold concentration at pH 5 (Fig. 2A). This could be related to the saturation of nisin  
238 hydrophobic binding sites by pectin chains; thus, they were not available anymore for ANS  
239 binding and/or the stabilization of nisin structure inside the pectin network. Besides, it could be  
240 inferred that all ANS molecules in the system were interacting with the peptide/polysaccharide  
241 complexes. Krivorotova, Cirkovas, Maciulyte, Staneviciene, & Budriene (2016) demonstrated  
242 by sodium chloride (NaCl) addition and turbidity measurements that hydrophobic interactions  
243 contributed to the formation of complexes between nisin and pectin, and that these interactions  
244 are prevalent at neutral pH. These authors also showed that at more acidic pH, electrostatic  
245 interactions between nisin and pectin are prevalent and decrease with increasing pH.

246 For nisin/alginate complexes formed at pH 3, an increase of  $S_0$  was noticed until 0.75 g/L  
247 alginate concentration after which  $S_0$  decreased sharply (Fig. 2B). A possible explanation of  
248 this result is that the hydrophobic binding sites of nisin were hidden inside of alginate  
249 aggregates which no longer have access to the hydrophobic dye. As explained above,  
250 nisin/alginate aggregates were the largest at pH 3 for the tested polysaccharide concentrations  
251 because of the lack of electrostatic repulsions. Above a 1 g/L alginate concentration,  $S_0$  reached  
252 a pseudo-plateau and this could be related to the saturation of the hydrophobic binding sites  
253 along nisin by alginate chains and/or the stabilization of nisin structure inside the alginate  
254 network. At pH 5, surface hydrophobicity started to decrease above a 1 g/L alginate  
255 concentration indicating a greater occlusion of the peptide hydrophobic patches during the  
256 partial dissociation of aggregates (Fig. 2B). This could be associated with the existence of  
257 attractive interactions between nisin and alginate even during the dissociation phase. At pH 7,  
258 the peptide surface hydrophobic values in nisin/pectin or nisin/alginate mixed systems were  
259 maintained at stable and high values (Fig. 2A and Fig. 2B). ANS intensity exhibited no change,  
260 mainly due to the lack of interactions between the two polysaccharides and nisin at this pH  
261 value which could be also related to the significant decrease of nisin positive charge as well as  
262 water solubility at pH 7 and thus hydrophilicity.

### 263 **3.3. Morphology of nisin/pectin and nisin/alginate films**

264 The structure of nisin/pectin and nisin/alginate films formed at the three tested pH were  
265 observed using epifluorescence microscopy (Fig. 3A and Fig.3B) and scanning electron  
266 microscopy (Fig. 4A and Fig.4B). From the observed structures, it seems that nisin molecules  
267 incorporated in the films prepared at pH 3, pH 5 and pH 7 were associated with pectin or  
268 alginate chains forming many complexes homogeneously dispersed. Besides, it is clear that the  
269 number and the size of these complexes were dependent on pH and the polysaccharide type.  
270 This is in correlation with the visual aspects of suspensions observations (Fig. 1). In addition,

271 the obtained films were uniform with continuous structures and homogenous appearances and  
272 without any pores or cracks in the matrix. For nisin/pectin films prepared at pH 3, it can be seen  
273 that individual complexes were slightly aggregated and had a mean size of about 30  $\mu\text{m}$  at pH  
274 3. At pH 5, many individual complexes having a less than 1  $\mu\text{m}$  mean size were formed and  
275 dispersed in the film (Fig. 4A). Besides, it can be noticed that the number of nisin/pectin  
276 complexes decreased significantly when the pH increased especially at pH 7 (Fig. 3A and Fig.  
277 4A). In the case of alginate film incorporating nisin prepared at pH 3, many individual  
278 nisin/alginate complexes could be observed. However, in the film formed at pH 5, nisin/alginate  
279 complexes were associated to form larger ones and it seems that their number decreased as  
280 compared to the film prepared at pH 3. Moreover, it is obvious that the number of nisin/alginate  
281 complexes were significantly reduced for the film prepared at pH 7 (Fig. 3B and Fig. 4B).

### 282 **3.4. Antimicrobial activity of nisin/pectin and nisin/alginate based films**

283 It was first verified that pectin and alginate-based films prepared at the three tested pH  
284 (control) did not show any antimicrobial activity against the two tested Gram-positive bacteria  
285 *K. rhizophila* and *L. innocua* (data not shown). Pectin films incorporating nisin prepared at the  
286 three tested pH were effective against the two tested microorganisms as evidenced by the  
287 measured bacterial growth inhibition zones (Fig. 5A). *K. rhizophila* was sensitive to the  
288 antimicrobial activity of nisin/alginate films. However, an antimicrobial activity against *L.*  
289 *innocua* was noticed only for nisin/alginate films prepared at pH 3 and pH 5 (Fig. 5B). The  
290 largest inhibition zones against the two tested bacterial strains were noticed for pectin and  
291 alginate-based films prepared at pH 3. Inhibition zones decreased with increasing pH and were  
292 the lowest for nisin/pectin and nisin/alginate films prepared at pH 7. Besides, nisin/alginate  
293 films formed at pH 3 and pH 5 were more efficient, whatever the tested bacterial strain as  
294 compared to nisin/pectin films obtained at the same pH. In another study, we have produced  
295 antimicrobial microcapsules by spray-drying of nisin/pectin and nisin/alginate complexes

296 formed at pH 5 and at a fixed concentration of nisin (5 g/L) as well as a fixed concentration of  
297 polysaccharide (2 g/L) and we have observed that nisin/pectin microparticles were more  
298 efficient than nisin/alginate microcapsules against *K. rhizophila* and *L. innocua* (Ben Amara et  
299 al., 2017). From the obtained results, it can be deduced that nisin antimicrobial activity, when  
300 incorporated into polysaccharide based systems, is largely dependent on pH, on the  
301 polysaccharide type but also on the encapsulation method.

302 In addition, nisin antimicrobial activity is largely dependent on its aqueous solubility and  
303 structural stability which in turn depend on pH. The antimicrobial activity is higher at acidic  
304 pH and gradually decreases with increasing pH which could be explained by an irreversible  
305 modification of the molecular structure of nisin (Hurst, 1981). Regarding the antimicrobial  
306 activity, pectin and alginate films incorporating nisin prepared at pH 3 were identified as the  
307 most suitable in the perspective to be used in food industry as antimicrobial systems based on  
308 an antimicrobial activity assay for which inhibition zone diameter around the films is measured  
309 after 24 h incubation at 30 °C. However, depending on the pH of the medium but also on the  
310 used polysaccharide, the particle size has to be taken into account as the formation of large  
311 complexes, can limit the diffusion of nisin throughout pectin or alginate matrices. Larger  
312 complexes may also be favorable for decreasing the rate of release of nisin from films to the  
313 agar medium. If a slower controlled release is necessary to extend the shelf life of perishable  
314 foods, films with larger pectin-nisin or alginate-nisin complexes may also be of interest  
315 depending on application.

#### 316 **4. Conclusion**

317 In this study, the interactions between positively charged nisin and negatively charged  
318 pectin or alginate molecules at three pH conditions (pH 3, pH 5 and pH 7) were studied in  
319 solution and in films. Surface hydrophobicity analysis showed that complexation of nisin with  
320 pectin or alginate was accompanied with changes in the peptide structure as well as a better

321 exposure of surface hydrophobic residues especially at pH 3 and pH 5. When nisin was  
322 incorporated into pectin- or alginate-based edible films, its antimicrobial activity was largely  
323 dependent on pH. Considering the antimicrobial activity of the films incorporating nisin, pectin-  
324 or alginate-based films prepared at pH 3 had the highest antimicrobial activity as estimated by  
325 measuring the diameter of inhibition zones around films after 24 h incubation at 30 °C.  
326 However, depending on the pH and the polysaccharide type, the particle size of the formed  
327 complexes and/or aggregates has to be considered as the formation of large complexes could  
328 represent a limit for nisin release throughout the pectin- or alginate-based matrices if a rapid  
329 release of nisin is expected. Thus, it would be interesting to study the release kinetics of this  
330 antimicrobial agent from the prepared films.



331 **References**

- 332 Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme/low  
 333 methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food*  
 334 *Engineering*, 131, 18–25.
- 335 Ben Amara, C., Eghbal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2016). Using complex  
 336 coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *Journal of Food Engineering*,  
 337 183, 50–57.
- 338 Ben Amara, C., Kim, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2017). Using  
 339 complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying.  
 340 *Food Chemistry*, 236, 32–40.
- 341 Cheng, J., Ma, Y., Li, X., Yan, T., & Cui, J. (2015). Effects of milk protein-polysaccharide  
 342 interactions on the stability of ice cream mix model systems. *Food Hydrocolloids*, 45, 327–  
 343 336.
- 344 Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from Algae. In *Biopolymers*  
 345 *Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- 346 Gharsallaoui, A., Joly, C., Oulahal, N., & Degraeve, P. (2015). Nisin as a food preservative:  
 347 part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews*  
 348 *in Food Science and Nutrition*, 8, 1262–1274.
- 349 Goh, C. H., Heng, P. W. S., & Chan, L. W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for  
 350 microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1–12.
- 351 Hurst, A. (1981). Nisin. In *Advances in Applied Microbiology*, D. Perlman and Allen I. Laskin,  
 352 ed. (Academic Press), 27, 85–123.
- 353 Khodarahmi, R., Karimi, S.A., Ashrafi Kooshk, M.R., Ghadami, S.A., Ghobadi, S., & Amani,  
 354 M. (2012). Comparative spectroscopic studies on drug binding characteristics and protein  
 355 surface hydrophobicity of native and modified forms of bovine serum albumin: Possible  
 356 relevance to change in protein structure/function upon non-enzymatic glycation.  
 357 *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 89, 177–186.
- 358 Krivorotova, T., Cirkovas, A., Maciulyte, S., Staneviciene, R., Budriene, S., Serviene, E., &  
 359 Sereikaite, J. (2016). Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food*  
 360 *Hydrocolloids*, 54, Part A, 49–56.

- 361 Liu, L., Jin, T.Z., Coffin, D.R., & Hicks, K.B. (2009). Preparation of antimicrobial membranes:  
362 coextrusion of poly(lactic acid) and Nisaplin® in the presence of plasticizers. *Journal of*  
363 *Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8392–8398.
- 364 Matulis, D., & Lovrien, R. (1998). 1-anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding  
365 depends primarily on ion pair formation. *Biophysical Journal*, 74, 422–429.
- 366 McAuliffe, O., Ross, R.P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of  
367 action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 285–308.
- 368 Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., & Lacroix, M. (2007). Inhibition of  
369 *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food*  
370 *Control*, 18, 878–884.
- 371 Ridley, B.L., O'Neill, M.A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and  
372 oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.
- 373 Someya, Y., & Yui, H. (2010). Fluorescence lifetime probe for solvent microviscosity utilizing  
374 Anilinonaphthalene Sulfonate. *Analytical Chemistry*, 82, 5470–5476.
- 375 Wan, J., Gordon, J.B., Muirhead, K., Hickey, M.W., & Coventry, M.J. (1997). Incorporation  
376 of nisin in micro-particles of calcium alginate. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 153–  
377 158.

378 **Figure captions**

379 **Fig. 1.** Visual aspect of mixed biopolymer solutions when increasing concentrations of pectin  
380 **(A)** or alginate **(B)** were titrated into a fixed concentration of nisin (5 g/L) (imidazole-acetate  
381 buffer, 5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7).

382 **Fig. 2.** Dependence of surface hydrophobicity ( $S_0$ ) of nisin on pH and pectin concentration **(A)**  
383 or alginate concentration **(B)** when pectin or alginate solutions were titrated into nisin solution  
384 (5 g/L) (imidazole-acetate buffer, 5 mM, pH 3, pH 5 and pH 7).

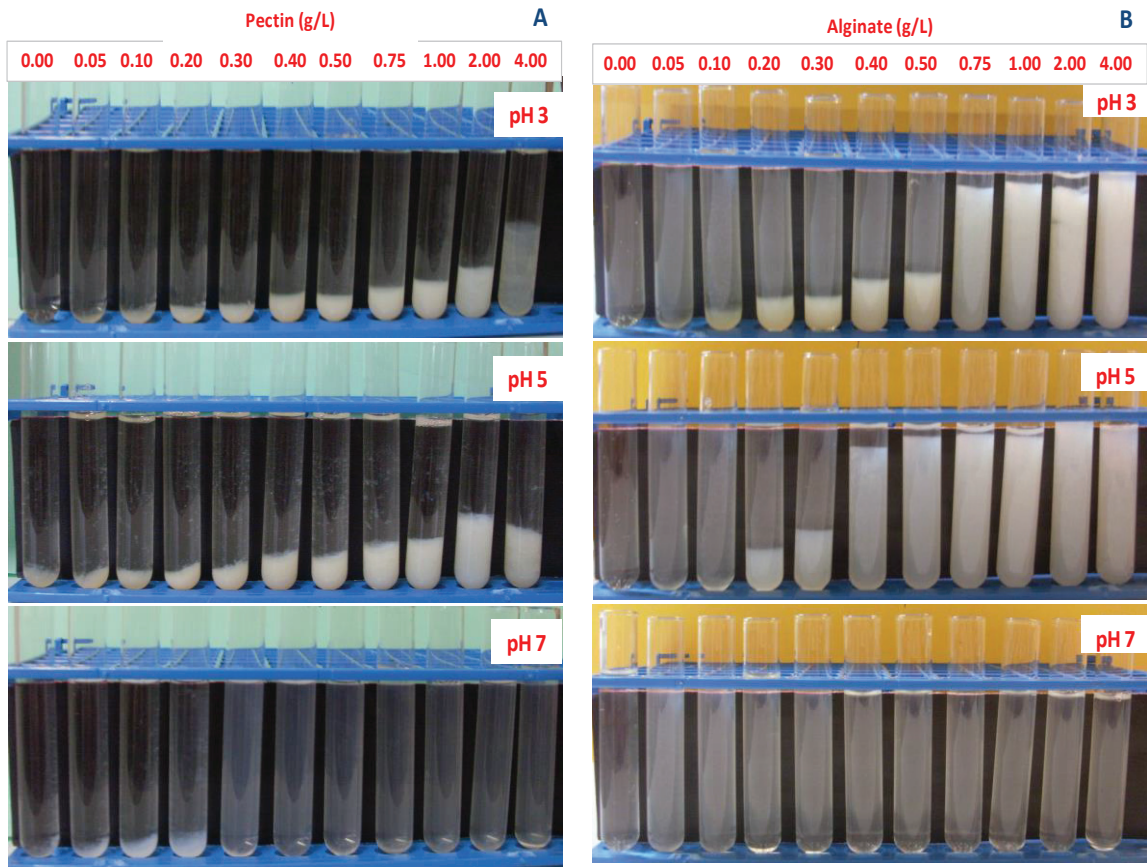
385 **Fig. 3.** Microscopic structure of pectin- **(A)** and alginate- **(B)** based edible antimicrobial films  
386 (pH 3, pH 5 and pH 7) observed by epifluorescence microscopy containing nisin (0.04 g/g of  
387 pectin or alginate). Nisin was stained with Nile Blue (dye/peptide ratio = 1/100 (w/w)).

388 **Fig. 4.** Microscopic structure of pectin- **(A)** or alginate- **(B)** based edible antimicrobial films  
389 (pH 3, pH 5 and pH 7) observed by scanning electron microscopy (MEB) containing nisin (0.04  
390 g/g of pectin or alginate) (pectin- or alginate-based films and those containing nisin were  
391 observed at 4000x, 2000x or 1200x magnification).

392 **Fig. 5.** Antibacterial activity (growth inhibition zone) of pectin- **(A)** or alginate- **(B)** based  
393 edible antimicrobial films containing nisin against two Gram-positive bacteria, *K. rhizophila*  
394 and *L. innocua*. The observed inhibition zones around pectin-based or alginate-based films  
395 containing nisin for the two tested bacterial strains are shown in the photographs.

396

Figure 1



397

398

399

400

401

402

403

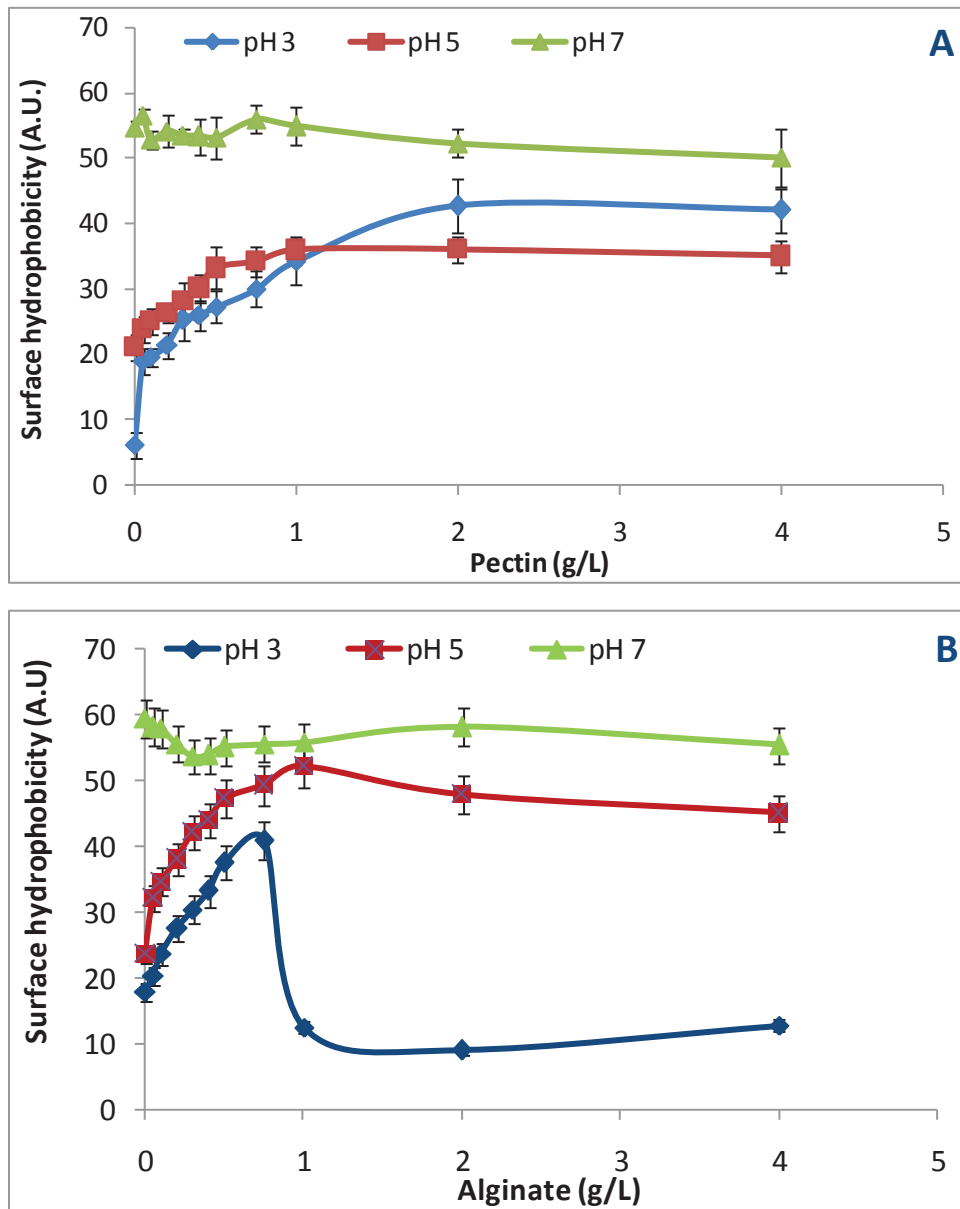
404

405

406

407

Figure 2



408

409

410

411

412

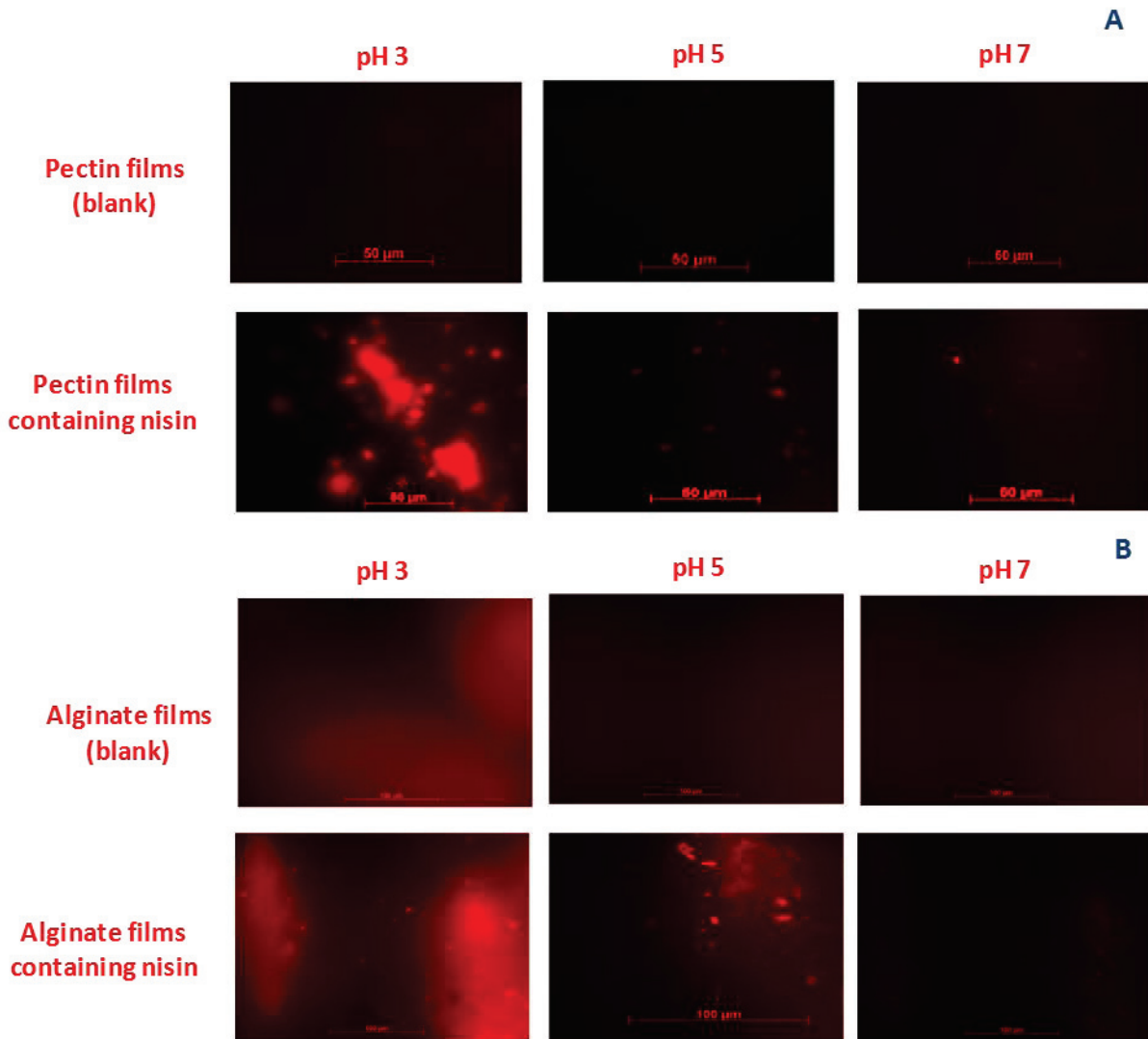
413

414

415

416

Figure 3



417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

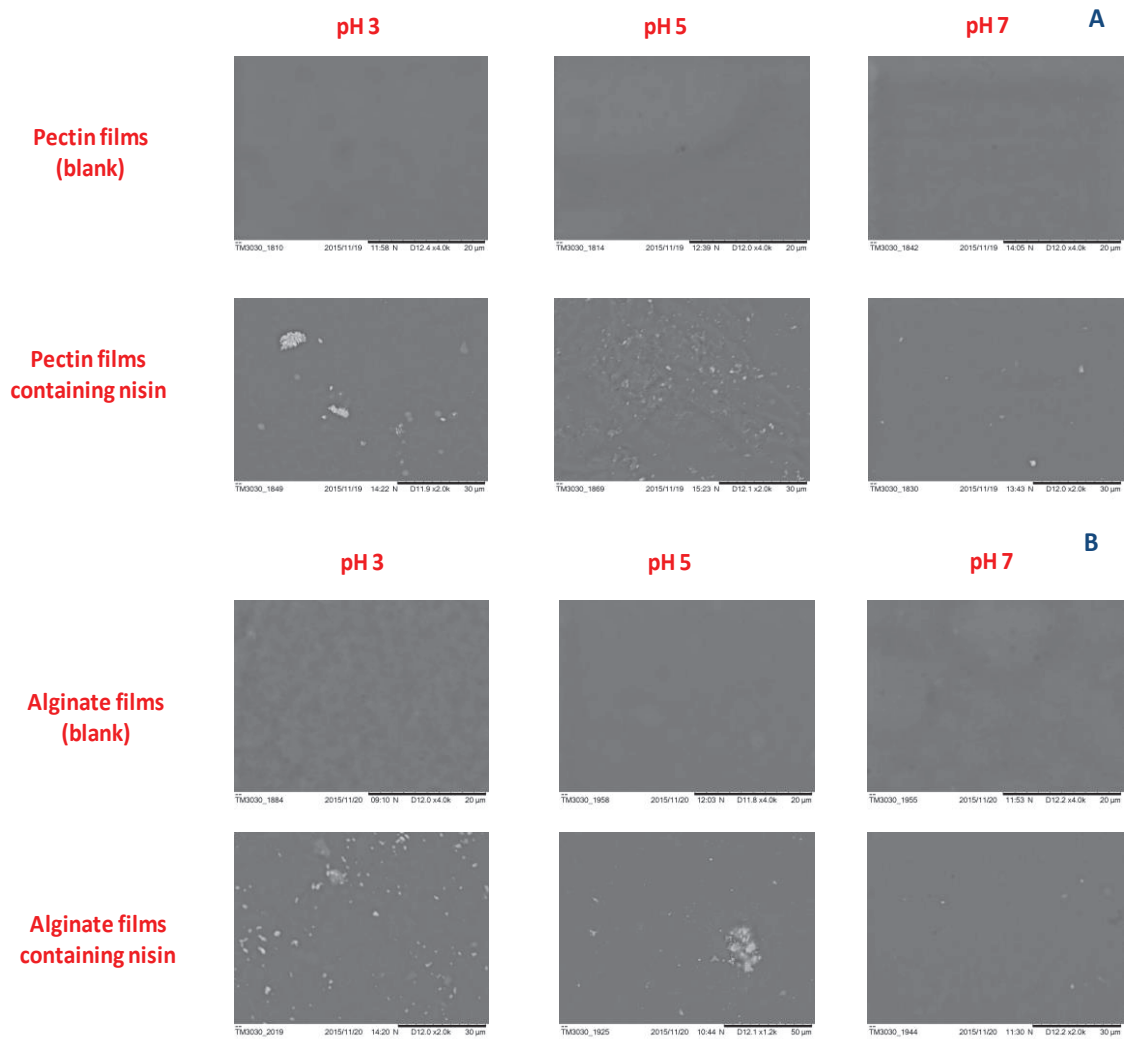
431

432

433

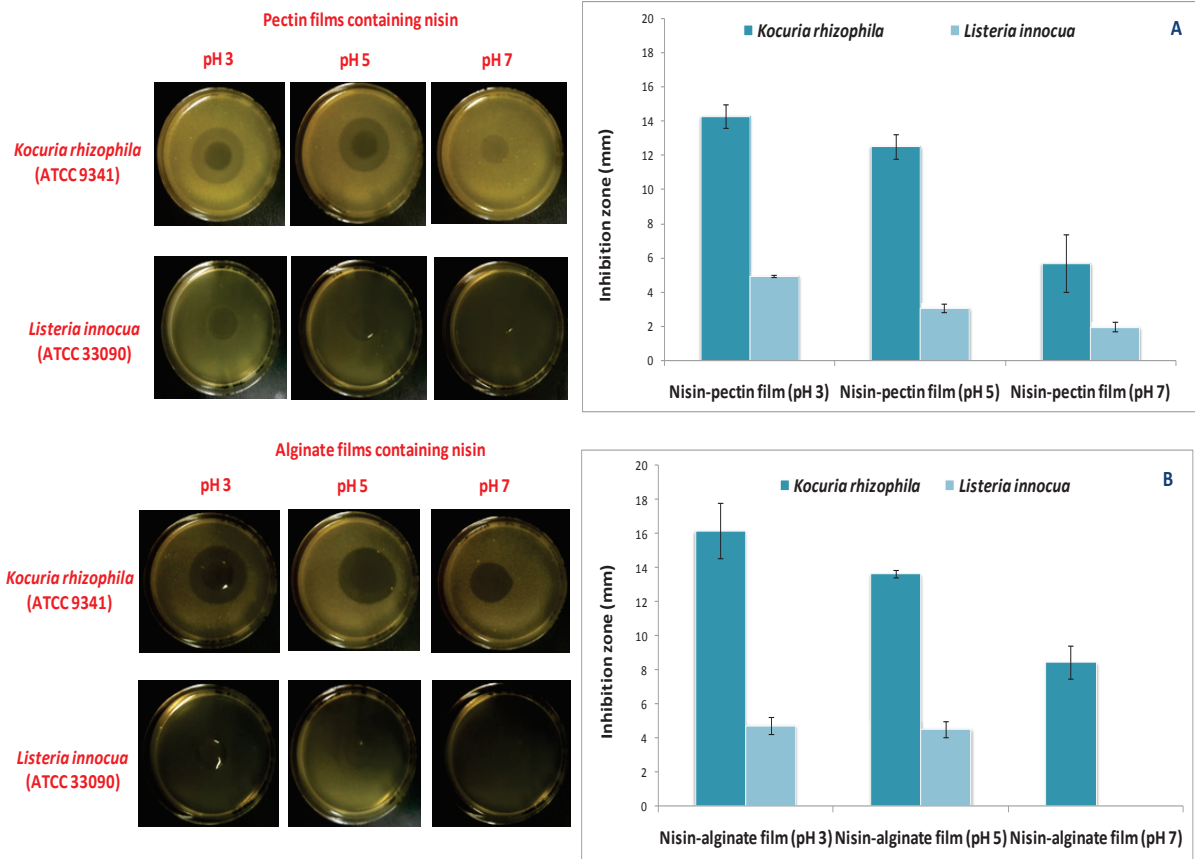
434

435 **Figure 4**



436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456

457 **Figure 5**



458



### **III.5.3. Conclusion**

Les observations macroscopiques réalisées dans le cadre de ce travail ont permis de montrer que la formation des complexes nisine/pectine ou nisine/alginate a été promue dans des conditions acides (pH 3 et pH 5). De plus, la complexation de la pectine ou de l'alginat avec la nisine à ces deux valeurs de pH a entraîné des changements au niveau de la structure de la nisine, avec une meilleure exposition des sites hydrophobes du peptide. A pH 7, la complexation a été défavorisée et ceci peut être expliqué par la faible solubilité du peptide à cette valeur de pH mais aussi par la réduction des charges positives portées par la nisine en se rapprochant de son *pI*. Les observations microscopiques ont montré aussi que le nombre et la taille des complexes nisine/pectine ou nisine/alginat présents dans les films antimicrobiens élaborés aux trois pH étudiés ont été dépendants du pH et du type de polysaccharide utilisé pour le même ratio peptide/polysaccharide. En particulier, l'activité antimicrobienne la plus élevée, constatée en mesurant le diamètre d'inhibition après 24 h d'incubation à 30 °C en milieu gélosé, a été observée autour des films à base des complexes nisine/pectine ou nisine/alginat préparés à pH 3 et qui sont ceux contenant le plus grand nombre de complexes de petite taille. Il conviendrait désormais d'étudier la cinétique de relargage de la nisine vers des matrices d'aliments périssables.

## **III.6. Encapsulation de la nisine par complexation/séchage**

### **III.6.1. Introduction**

Cette étude a été menée pour étudier la possibilité d'utiliser la complexation avec des polysaccharides anioniques dans le but d'encapsuler un peptide cationique par séchage par atomisation et pour répondre à la question suivante : la complexation de la nisine avec l'alginate ou la pectine, peut-elle protéger la structure de la nisine ainsi que son activité antimicrobienne lors du procédé de séchage par atomisation ? Ce travail a été réalisé à pH 5, pH optimum permettant à la fois de fortes interactions entre la nisine et chacun des deux polysaccharides mais aussi une bonne solubilité de la nisine. On a choisi de travailler à une concentration finale en nisine de 5 g/L et une concentration finale en alginate ou en pectine de 2 g/L, condition pour laquelle une coacervation maximale a été observée (maximum de turbidité). L'objectif général de ce travail présenté sous forme d'un article qui a été publié dans le journal « **Food Chemistry** » en 2017 consiste à étudier, d'une part, l'effet de la complexation de la nisine avec l'alginate ou la pectine ainsi que l'impact du séchage par atomisation sur les propriétés structurales des complexes formés, et vise d'autre part à montrer l'intérêt de cette complexation pour la préservation de la structure et de l'activité antimicrobienne de la nisine.

### **III.6.2. Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying**



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying



Chedia Ben Amara, Lanhee Kim, Nadia Oulahal, Pascal Degraeve, Adem Gharsallaoui\*

Université Lyon 1, ISARA Lyon, Laboratoire BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 January 2017  
Received in revised form 22 April 2017  
Accepted 26 April 2017  
Available online 27 April 2017

#### Keywords:

Nisin  
Pectin  
Alginate  
Complexation  
Spray-drying  
Antimicrobial activity

### ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the potential of complexation to encapsulate nisin (5 g/L concentration) using spray-drying technique and to evaluate how complexation with pectin or alginate (2 g/L concentration) can preserve nisin structure and antimicrobial activity. Spray-drying of nisin-low methoxyl pectin or nisin-alginate electrostatic complexes has led to the microencapsulation of the peptide in different networks that were highly influenced by the polysaccharide type. Turbidity and particle size measurements indicated that while spray-drying promoted the aggregation of nisin-pectin complexes, it favored the dissociation of nisin-alginate aggregates to form individual complexes. Structural changes of nisin induced by complexation with pectin or alginate and spray-drying were studied by using UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopy. The results showed that complexation with pectin or alginate preserved nisin structure as well as its antimicrobial activity during spray-drying.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nisin is an amphiphilic cationic ribosomally synthesized peptide belonging to the class I of bacteriocins, produced by certain strains of *Lactococcus lactis*. This small peptide has a molecular weight of 3510 Da. Nisin possesses a relatively broad spectrum of antibacterial activity against Gram-positive food borne pathogens and spoilage organisms. The hydrophilicity of the C-terminal extremity of nisin allows the establishment of electrostatic interactions between this positively charged peptide and the negatively charged bacterial membrane phospholipids. However, the hydrophobicity of the N-terminal extremity of nisin acts subsequently to allow the insertion of nisin in the lipid cell membrane leading to its permeabilization (McAuliffe, Ross, & Hill, 2001). The Food and Drug Administration (FDA) has recognized nisin (E234) as an approved food additive because of its non-toxicity and its bacteriolytic and bactericidal activities (Hagiwara et al., 2010). Nisin exhibits a great stability and solubility especially under acidic conditions and can withstand moderate thermal processing without major activity loss (Hurst, 1981). At pH 2.0, this peptide withstands a temperature of 121 °C for 30 min without losing its activity. Nisin is particularly sensitive to proteolytic

enzymes such as trypsin, pancreatin, salivary and digestive enzymes (De Vuyst & Vandamme, 1994).

Nisin has been widely studied for its incorporation into food packaging materials. Besides, this peptide is stable in a dry form for years, and thus expected to be safe when incorporated into the polymer structure (De Vuyst & Vandamme, 1994). The use of nisin in its free unencapsulated form is associated with loss of activity due to degradation or deactivation. Thus, incorporation of nisin within films or particles of edible polymers can protect it from the action of proteases as well as from the physico-chemical environmental conditions (pH, temperature, oxygen, ionic strength), and limits the interactions between nisin and food components resulting in the loss of activity during food storage. Moreover, this can also allow a controlled release of this antimicrobial agent (Gharsallaoui, Joly, Oulahal, & Degraeve, 2016).

Net positive charge of nisin across an extended range of pH as a result of its high isoelectric point pI (~8–9), makes it possible to form complexes with anionic polysaccharides. Many studies revealed that the formation of complexes between oppositely charged molecules including anionic polysaccharides and cationic proteins like whey protein-carrageenan (Weinbreck, Nieuwenhuijse, Robijn, & de Kruijff, 2004), lentil protein isolates-gum Arabic (Aryee & Nickerson, 2012), whey protein isolates-alginate (Fioramonti, Perez, Aringoli, Rubiolo, & Santiago, 2014), lysozyme-pectin (Bayarri, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2014; Ben Amara, Eghbal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2016;

\* Corresponding author.

E-mail address: [adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr](mailto:adem.gharsallaoui@univ-lyon1.fr) (A. Gharsallaoui).

Ormus, Oulahal, Noël, Degraeve, & Gharsallaoui, 2015) or cationic peptides like  $\epsilon$ -polylysine-pectin (Chang, McLandsborough, & McClements, 2012, 2014), nisin-pectin (Krivorotova et al., 2016), nisin-alginate (Hosseini et al., 2014; Maresca et al., 2016), occurs mainly via electrostatic interactions under different physico-chemical conditions.

Large aggregates are favored when the stoichiometry of opposite charges reaches 1 (neutralization). Many parameters can influence complexation through electrostatic interactions such as ionic strength, pH, peptide or protein to polysaccharide ratio, concentration of the interacting components, charge distribution on the polypeptide, and relative hydrophobicity of molecules (Schmitt, Sanchez, Desobry-Banon, & Hardy, 1998). Krivorotova et al. (2016) designed antimicrobial nanoparticles incorporating nisin for food preservation by using three types of pectin with different methoxylation degrees in the pH range of 4.0–7.0 and confirmed the presence of electrostatic interactions between the peptide and pectin by  $\zeta$ -potential measurements and Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis. When two molecules form complexes, they may exhibit superior functional characteristics compared to the original polymers and this represents a useful way for incorporating functional ingredients. Thus, complexes have been used in different applications in food industry: emulsion stabilizers (Dickinson, 2003), design of edible antimicrobial films (Bayarri et al., 2014), or encapsulation of active antimicrobial agents for shelf life extension of food (Ben Amara et al., 2016).

In food industry, spray-drying is widely used to microencapsulate active compounds. A variety of heat sensitive model enzymes and therapeutic peptides has been successfully spray-dried without great denaturation (Broadhead, Edmond Rouan, & Rhodes, 1992). During spray-drying of peptides or proteins, the product may undergo several stresses through exposure to heating, shearing, dehydration and distribution of air-water interfaces.

These stresses can result in unfolding of peptides or proteins structure with subsequent aggregation and denaturation, thus creating substantial problems about possible loss of their biological activity (Lee, 2002). In our recent work (Ben Amara et al., 2016), the properties of spray-dried lysozyme as well as the influence of complexation with increased pectin amounts on the preservation of lysozyme structure and activity were evaluated. Results demonstrated that spray-drying had a significant effect on lysozyme structure, mobility and activity. Xiao, Davidson, and Zhong (2011a) used zein (corn protein) to encapsulate nisin by spray-drying at four inlet temperatures and they observed that at 95 °C and above, no apparent loss of nisin activity was observed after spray-drying. Besides, this study also showed that pH significantly affected the release kinetics of nisin. In another study, Xiao, Davidson, and Zhong (2011b) demonstrated that gradual release of nisin from zein capsules improved the antimicrobial properties of nisin against *Listeria monocytogenes* compared to unencapsulated (free) nisin. The impact of electrostatic interactions, that may be either attractive or repulsive, as a function of pH between nisin (pI = 8.8) and carrier zein (pI = 6.8) was discussed regarding a more complete release of nisin from capsules under acidic conditions where the interactions between nisin and zein are mainly repulsive (Xiao et al., 2011b).

In the present work, complexation of nisin with two anionic polysaccharides, low methoxyl (LM) pectin and alginate, was studied before and upon spray-drying. Pectin, an hydrophilic compound, is essentially made up of d-galacturonic residues, has a negative charge due to the presence of carboxylic acid groups along its backbone that have pKa values of about 3.6 (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001). Alginates are binary copolymers made up of  $\alpha$ -l-guluronic acid (G) and  $\beta$ -d-mannuronic acid (M) residues, linearly linked via 1–4 linkages. Tendency of alginates to be negatively charged over a broad range of pH values is attributed to dis-

sociation constants of 3.38 for mannuronic (M) and 3.65 for guluronic acid (G) monomers (Harnsilawat, Pongsawatmanit, & McClements, 2006).

Pectin and alginate are characterized by many ionized carboxylic groups along their backbone making the two polysaccharides negatively charged, thus contributing to electrostatic attractive interactions with positively charged nisin at pH 5. The main purpose of this work was to encapsulate nisin by spray-drying and to investigate the effect of peptide complexation with pectin or alginate on the structural properties of complexes by using SEM micrographs, turbidity, fluorescence, and UV-Vis absorption measurements as well as on nisin antimicrobial activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Low methoxyl amidated pectin (Unipectine™ OF 305 C SB, degree of esterification: 22–28%, degree of acetylation: 20–23%) and alginate (Algogel 6020) were purchased from Cargill (Baupre, France). Dried powder of nisin A (95% w/w of nisin A and 5% w/w moisture according to the product data sheet) produced by fermentation using the bacterium *Lactococcus lactis* was purchased from Handary (Lendeled, Belgium). 1-Anilino-naphthalene-8-sulfonate (ANS), analytical grade imidazole (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH) and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). Tryptone Salt broth (TS), Tryptone Soy broth (TSB) and Tryptone Soy agar (TSA) were purchased from Biokar Diagnostics (Beauvais, France). Maltodextrin DE 19 was purchased from Roquette-frères SA (Lestrem, France). All solutions were prepared by using deionized water.

### 2.2. Nisin, pectin and alginate solutions preparation

Nisin (10 g/L) and pectin (30 g/L) or alginate (30 g/L) stock solutions were prepared by dissolving powders in an imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5) and dispersed under continuous magnetic stirring during at least 2 h until complete rehydration. HCl (1 mM) or NaOH (1 mM) were added to adjust the pH. The insoluble residues present in pectin and alginate solutions were then removed by centrifugation (10,000g, 30 min) (Sigma 3K18, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

### 2.3. Zeta potential measurement

The zeta potential ( $\zeta$ -potential) of nisin, pectin and alginate as a function of pH as well as the  $\zeta$ -potential of nisin solution and nisin-pectin or nisin-alginate complexes before and after spray-drying and reconstitution in imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5), were determined at 25 °C using a Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5) was used to dilute the samples. The mean  $\zeta$ -potential (ZP) values ( $\pm$ SD (standard deviation)) were collected from the instrument.

### 2.4. Nisin-pectin and nisin-alginate complexes formation and turbidity measurement

Appropriate ratios of nisin, pectin and alginate solutions were mixed with imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5) to prepare biopolymer mixtures containing nisin (5 g/L) and pectin (2 g/L) or alginate (2 g/L). The resulting solutions were vortexed for 1 min and their pH was adjusted again. Immediately after vortexing, turbidity measurements were performed with a UV/Vis spectropho-

tometer (Jenway 3705, Villepinte, France). The absorbance was recorded at 600 nm at room temperature (25 °C) against pure nisin solution (without pectin or alginate) in imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5).

2.5. Spray-drying of nisin-pectin and nisin-alginate complexes

The suspensions of nisin-pectin and nisin-alginate complexes prepared in imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5) containing 10 wt.% maltodextrin DE 19 were subjected to a laboratory-scale spray-drier (Mini spray-dryer B-290, Büchi, Switzerland) equipped with a 0.5 mm nozzle atomizer. The drying system was operated with a feeding rate of 0.5 L/h at room temperature. The inlet and outlet temperatures were 180 °C and 90 °C, respectively (Ben Amara et al., 2016). Dry powders were then collected and stored in opaque, airtight glass containers at 4 °C until characterization. Dry powders were weighted and stirred into imidazole/acetate buffer (5 mM, pH 5) to prepare reconstituted mixtures of complexes having the same content of dry matter as the initial suspensions before drying (taking into account the residual moisture). The samples were immediately analyzed after rotation for 1 h at approximately 200 rpm.

2.6. Scanning electron microscopy (SEM)

Spray-dried microcapsules were fixed on an aluminum stub using a double-sided adhesive tape. Then, the specimens were examined using a scanning electron microscope (Hitachi TM3030, Tokyo, Japan) at 4000× magnification and at an accelerating voltage of 15 kV.

2.7. UV-vis absorption measurements

UV absorption spectra were measured from 200 nm to 350 nm with an UV/Vis spectrophotometer (Lightwave II 109233, Biochrom, Cambridge, UK) in a 1 cm quartz cuvette at 25 °C against imidazole acetate buffer (5 mM, pH 5). Samples were diluted 15 times in imidazole acetate buffer (5 mM, pH 5) before essays.

2.8. Particle size measurement

Particle size distributions of nisin-pectin and nisin-alginate complexes before and after spray-drying were measured with a laser diffraction instrument (Malvern Mastersizer). To avoid multiple scattering effects, the complexes were diluted with imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5) prior to the measurements. The complexes were stirred continuously throughout the measurement to ensure the samples were homogeneous. The volume particle diameter ( $d_{43}$ ) was calculated from three injections of three separate samples with three readings per sample.

2.9. Surface hydrophobicity

Intrinsic fluorescence measurements were done in the mixed systems using the hydrophobic fluorescence probe 1-anilino-8-naphthalenesulphonic acid (ANS) according to Khodarahmi et al. (2012) with some modifications. The probe solution was prepared at 0.02 wt% in imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5). For nisin-pectin and nisin-alginate mixing systems formed before and after spray-drying and reconstitution in imidazole-acetate buffer (5 mM, pH 5), increasing volumes of ANS (0.02 wt%) ranging from 5 to 25 µL were added to 5 mL of each solution. Emission wavelengths were recorded in a wavelength range of 420–650 nm after excitation at 380 nm. The bandwidths of excitation and emission were 5 nm and 4 nm, respectively. The changes in fluorescence intensity associated with the binding of ANS to the peptide surface

hydrophobic regions were monitored with a LS 55 spectrofluorometer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The increase in fluorescence emission was recorded until no further increase was observed. The maximum fluorescence intensity was plotted as a function of ANS concentration. The initial slope of the fluorescence intensity (arbitrary unit, a.u.) versus ANS concentration (mg/L) plot was calculated and was used as an index of nisin surface hydrophobicity ( $S_0$ ). Each spectrum was obtained in triplicate. All measurements were made at room temperature (25 °C), using a quartz cuvette with 1 cm path length.

2.10. Evaluation of the antimicrobial activity of nisin-pectin based films

Stock cultures of two Gram-positive bacteria, *Listeria innocua* (ATCC 33090) and *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) were maintained at –20 °C in Tryptone Soy Broth (TSB) supplemented with 15% (v/v) glycerol. Before each antimicrobial activity assay, the two target strains were subcultured in TSB at 10% (v/v) for 8 h and then subcultured in TSB at 10% (v/v) for 16 h at 30 °C and then precultured in TSB for 5 h at 30 °C. The cells were then diluted in Tryptone Salt (TS) broth to final concentrations of  $4 \times 10^6$  CFU/mL for *K. rhizophila* and  $1 \times 10^7$  CFU/mL for *L. innocua* and incorporated at 5% (v/v) in Tryptone Soy agar (TSA) and poured in Petri dishes. Nisin, nisin-pectin and nisin-alginate microcapsules were then placed in form of disks (diameter: 15 mm) on the prepared TSA Petri plates inoculated with *L. innocua* or *K. rhizophila*. Petri plates were then incubated for 3 h at 4 °C and then incubated for 24 h at 30 °C. The inhibition zones were then calculated by subtracting the diameter of the total inhibition zone from the diameter of the disk.

2.11. Statistical analysis

All experiments were carried out using at least three freshly prepared samples. The results are provided as the averages with their respective standard deviations that were determined from these measurements. Statistical differences between samples were calculated using Student's *t* test for independent samples (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA).

3. Results and discussion

3.1. Nisin-pectin and nisin-alginate interactions

ζ-potential measurements were conducted on nisin, pectin and sodium alginate, separately, in order to evaluate the effect of pH on

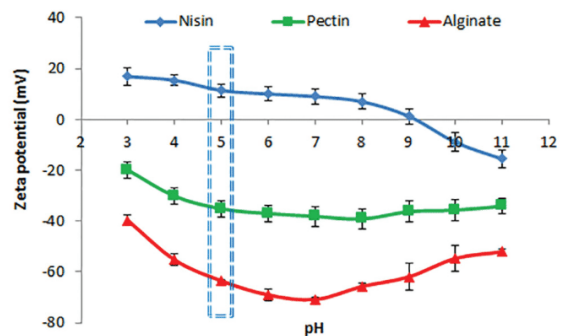


Fig. 1. Dependence of the ζ-potential of nisin, pectin and alginate on pH (5 mM imidazole-acetate buffer at 25 °C).

their electrostatic charge. The  $\zeta$ -potential of free nisin, pectin and sodium alginate was measured as a function of pH (Fig. 1).

The net charge of free nisin varied from positive at pH 3.0 to negative at pH 11.0, reaching a point of zero charge around pH 9.0. Pectin and sodium alginate were negatively charged from pH 3.0 to 11.0, but displayed less negative charges below pH 5.0 (Fig. 1). In fact, pectin and sodium alginate are polyanionic polymers for which the number of deprotonated carboxyl groups increases as the pH increases. Besides, it seems that sodium alginate chains became less negatively charged above pH 7. In fact, the electrostatic repulsions between sodium alginate anionic chains are relatively important at high pH values thus increasing the space occupied by the biopolymer molecules in the solution known as the hydrodynamic volume and thus affecting their diffusivity and electrophoretic mobility in the applied electrical field during the measurement.

In the mixed biopolymer solutions at pH 5 (condition used in this work), one would therefore assume that complexes were formed between cationic patches on the nisin molecules and negatively charged groups of the pectin or sodium alginate molecules. Nisin has a basic character due to its four positively charged sites supported by the lysine residues and by the  $\text{NH}_2$  groups and thus the peptide is positively charged in our experimental conditions (Rollema, Kuipers, Both, de Vos, & Siezen, 1995). In fact, pectin and alginate carry many negative charges at pH 5 favoring attractive electrostatic interactions with nisin which is highly positively charged at this pH (Fig. 1).

### 3.2. Turbidity measurements

The effect of both complexation and spray-drying on the turbidity of suspensions containing nisin at a fixed concentration (5 g/L) and pectin or sodium alginate at a constant concentration (2 g/L) was examined (Fig. 2). Previous results have shown that the addition of increasing pectin or sodium alginate concentrations (0–4 g/L) to a constant concentration of nisin (5 g/L) resulted in an increasing turbidity up to a threshold (2 g/L pectin or sodium alginate) above which turbidity was kept constant (data not shown). Turbidity increased as a result of the gradual association of individual complexes or small aggregates to form larger ones. In our previous work, we have shown that association of complexes, which is the main reason of increasing turbidity value, between lysozyme, a

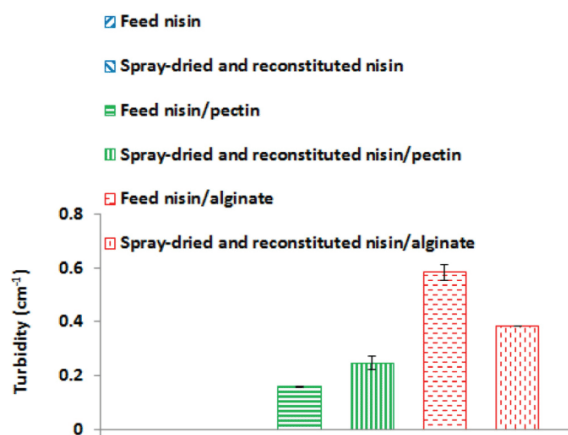


Fig. 2. Turbidity (at 600 nm) of unprocessed and spray-dried nisin-pectin and nisin-alginate complexes at a constant nisin concentration (5 g/L) and a constant pectin or alginate concentration (2 g/L) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 5 at 25 °C).

cationic antimicrobial protein, and pectin is associated to establishment of electrostatic pectic bridges between cationic sites of lysozyme that remained free at the surface of individual lysozyme and pectin complexes (Bayarri et al., 2014; Ben Amara et al., 2016). The turbidity of nisin-alginate feed solution was significantly higher compared to that of nisin-pectin feed solution indicating that the number and/or the size of nisin-alginate complexes were more important. Pectin molecules consist of linear anionic carbohydrate side chains that may be involved in electrostatic interactions, as well as neutral carbohydrate side chains ('hairy' regions) that might provide steric hindrance effects. On the other hand, alginate is a linear anionic polysaccharide without side chains. These differences in structure between the two polysaccharides are likely to affect the nature of the formed complexes and/or aggregates (Chang et al., 2014). Besides, reconstituted spray-dried nisin-pectin complexes showed significantly higher turbidity compared to untreated complexes and this is probably due to heat-induced aggregation. On the other hand, it can be seen from Fig. 2 that spray-dried nisin-alginate complexes were characterized by a significantly lower turbidity than untreated complexes and thus we can assume that nisin-alginate aggregates were gradually dissociated during spray-drying to reform smaller aggregates and/or more individual complexes. In fact, application of stresses during spray-drying such as heat, shear and dehydration can destabilize the configuration of aggregates leading to their partial disassembly and/or enhancing the number of individual complexes (Ben Amara et al., 2016; Jones, Decker, & McClements, 2009). Consequently, we can assume that electrostatic repulsions between the anionic alginate chains were strong enough to inhibit thermal aggregation of complexes and to make them more subjected to dissociation.

### 3.3. Particle size distribution of nisin-pectin and nisin-alginate complexes

Fig. 3A shows the particle mean diameter ( $D_{43}$ ) of complexes formed with mixtures of a fixed positively charged nisin concentration (5 g/L) and a fixed concentration of negatively charged pectin or alginate (2 g/L) at pH 5.0 before and after spray-drying and resuspension. Whereas a monomodal distribution and a small particle size ( $38.45 \pm 7 \mu\text{m}$ ) were obtained for the suspension containing nisin and pectin before spray-drying indicating the formation of small and insoluble nisin-pectin complexes, a monomodal distribution and a large particle size ( $480 \pm 23 \mu\text{m}$ ) were obtained for the mixture containing nisin and alginate indicating high aggregation of individual insoluble nisin-alginate complexes resulting in obtaining large particle size with a wide distribution. Pectin and alginate are characterized by different charge densities and thus, we could assume that large aggregates with a loose structure were formed as a result of the strong electrostatic repulsions between the linear negatively charged alginate chains. After spray-drying and reconstitution, the particle mean size of nisin-alginate complexes ( $96 \pm 3 \mu\text{m}$ ) decreased compared to unprocessed complexes and a bimodal curve was observed confirming that the spray-drying process could promote the dissociation of large aggregates to smaller insoluble complexes and/or aggregates with a lower particle size and this is also in agreement with the turbidity decrease. After spray-drying and reconstitution, the particle mean diameter of nisin-pectin complexes increased as well as turbidity as compared to untreated complexes and a multimodal curve was observed confirming that the drying/heating process could promote aggregation of complexes.

### 3.4. $\zeta$ -potential of nisin-pectin and nisin-alginate complexes

$\zeta$ -potential measurements were done in order to study the influence of spray-drying on the charge of nisin as well as the elec-

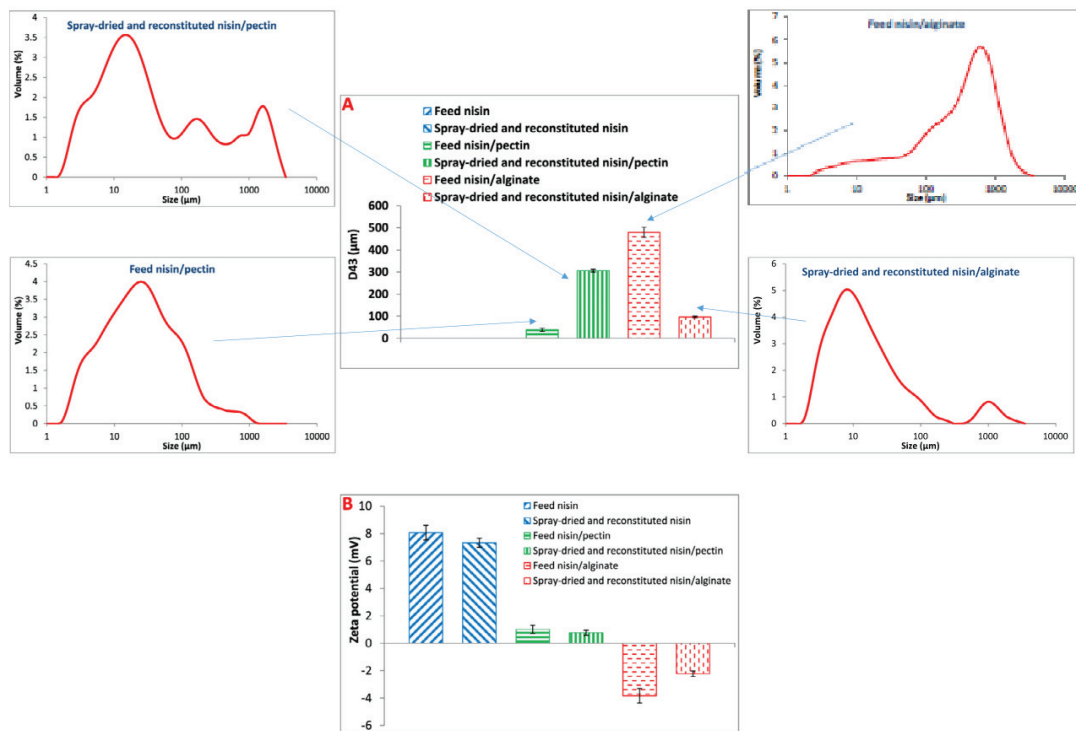


Fig. 3. (A) Particle size distribution of unprocessed and spray-dried nisin-pectin and nisin- alginate complexes at a constant nisin concentration (5 g/L) and a constant pectin or alginate concentration (2 g/L) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 5). (B)  $\zeta$ -potential of unprocessed and spray-dried nisin solution, nisin-pectin and nisin-alginate complexes at a constant nisin concentration (5 g/L) and a constant pectin or alginate concentration (2 g/L) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 5).

trostatic interactions between nisin and both polysaccharides before and after spray-drying (Fig. 3B). The  $\zeta$ -potential of nisin molecules at pH 5 became less positive after spray-drying indicating that the drying/heating process probably caused some changes in the polypeptide structure. Whereas the overall charge of nisin-pectin complexes was positive, the overall charge of nisin-alginate complexes was negative before the spray-drying process indicating that the outer layer of nisin-alginate aggregates could be dominated by the anionic polysaccharide and this is probably due to differences in the charge densities between the two polysaccharides. Alginate is a linear unbranched polymer and thus the negative charges carried by this polysaccharide are relatively important compared to those carried by pectin chains. Besides, it seems that spray-drying had a more significant effect on the  $\zeta$ -potential of nisin-alginate complexes indicating that the partial dissociation of the formed aggregates could induce the appearance of some cationic groups of nisin and/or the hiding of some anionic groups of alginate.

### 3.5. Microstructure of spray-dried microcapsules

Fig. 4 shows the scanning electron micrographs of dried microencapsulated nisin, nisin-pectin or nisin-alginate complexes with maltodextrins as a drying matrix. The three types of microcapsules consisted of spherical particles, well-separated, with similar diameters that ranged from 2 to 20  $\mu\text{m}$ . Indeed, the shear stress endured during the encapsulation by spray-drying may lead to the association of nisin-pectin complexes or the dissociation of nisin-alginate complex aggregates making it difficult to observe the differences in size between microcapsules. However, the polysaccharide type had a significant effect on the shape of the obtained

microcapsules. In fact, nisin-pectin microcapsules were characterized by an irregular shape and a rough surface characterized by some dents whereas nisin-alginate microcapsules had a round shape and a smooth surface. Both capsule structure and molecular interactions between carrier polymer and encapsulated compound are important factors impacting release profiles (Zhong & Jin, 2009). The particles formed from nisin-pectin complexes were smaller and less homogeneous compared to nisin-alginate microcapsules and thus one could expect that the larger surface area for nisin-pectin microcapsules could increase the mass transfer rate for internal nisin diffusing out of capsules, resulting in a greater extent of nisin release (Xiao et al., 2011a). After manually fracturing microcapsules, the inner structure of some broken microcapsules was observed consisting of a shell matrix (core material) and a large air bubble (called void) in the center of the microcapsule. The formation of the central void can be attributed to the expansion of air bubbles in the droplets during spray-drying (Teixeira, Andrade, Farina, & Rocha-Leão, 2004).

### 3.6. UV-vis spectra of nisin-pectin and nisin-alginate complexes

UV-vis absorption spectra of nisin were analyzed in order to study the structural changes of nisin after complexation with pectin and alginate and the effect of spray-drying on nisin-pectin or nisin-alginate interactions (Fig. 5A). The nisin spectra exhibited one main peak located in the far UV region (226 nm) which reflects the peptide backbone structure. Generally speaking, the  $\pi$ - $\pi^*$  transition of the peptide backbone structure can be characterized by the UV-vis absorption peak at the low wavelength region (Zhao, Liu, Chi, Teng, & Qin, 2010). Nisin has no absorbance at 280 nm because it does not contain aromatic amino acids. The absorbance

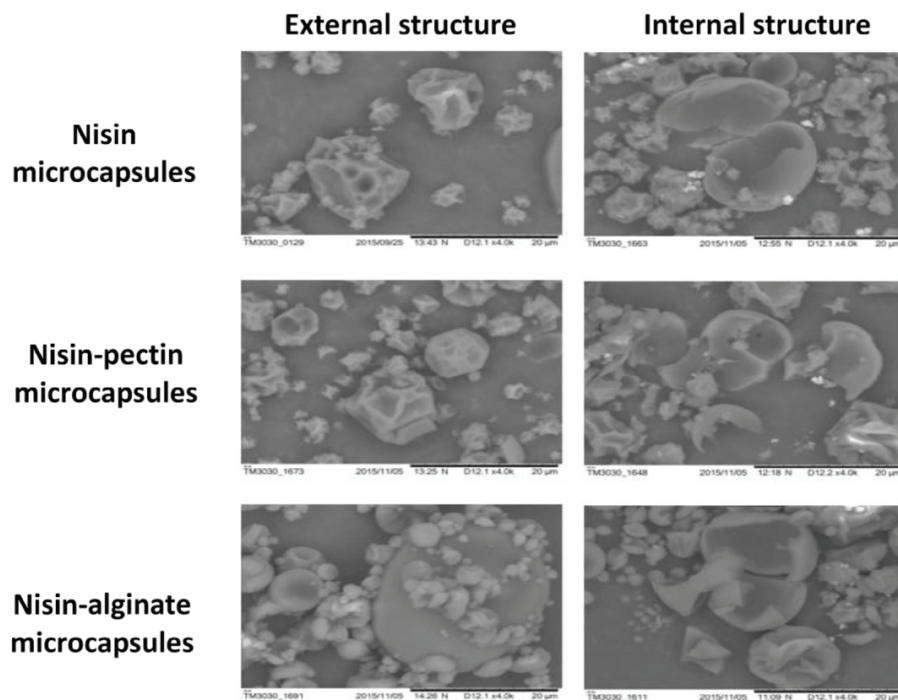


Fig. 4. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of spray-dried nisin, nisin-pectin and nisin-alginate complexes containing a constant nisin concentration (5 g/L) and a constant concentration of pectin or alginate (2 g/L) in the presence of maltodextrin DE 19 (10 wt.%) (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 5).

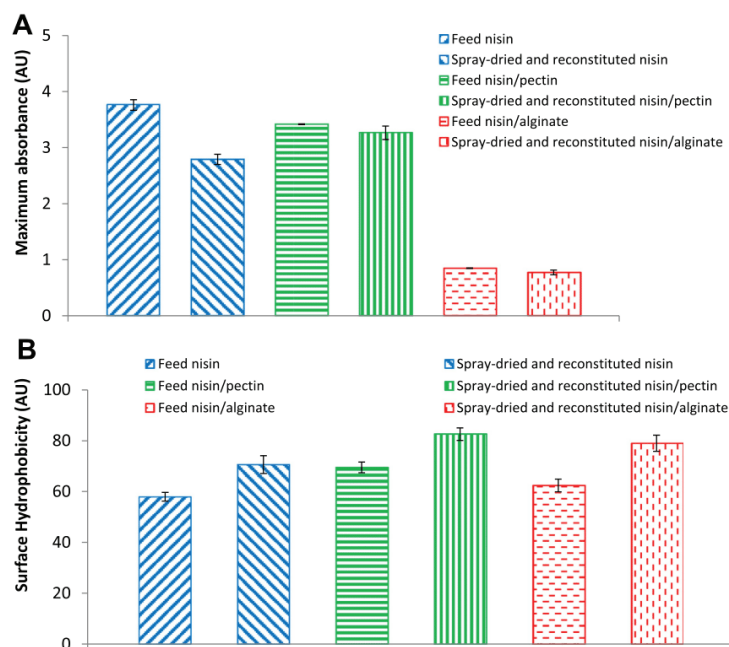


Fig. 5. (A) Absorbance at 226 nm of nisin, nisin-pectin and nisin-alginate complexes before and after spray-drying/reconstitution (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 5). (B) Surface hydrophobicity ( $S_0$ ) of nisin (5 g/L) in the presence of pectin or alginate (2 g/L) before and after spray-drying/reconstitution (5 mM imidazole-acetate buffer, pH 5).

intensity maxima for nisin-alginate feed solution decreased significantly compared to nisin-pectin feed solution indicating that

changes in the conformation of nisin peptide backbone structure were the most significant in presence of alginate. Besides, the



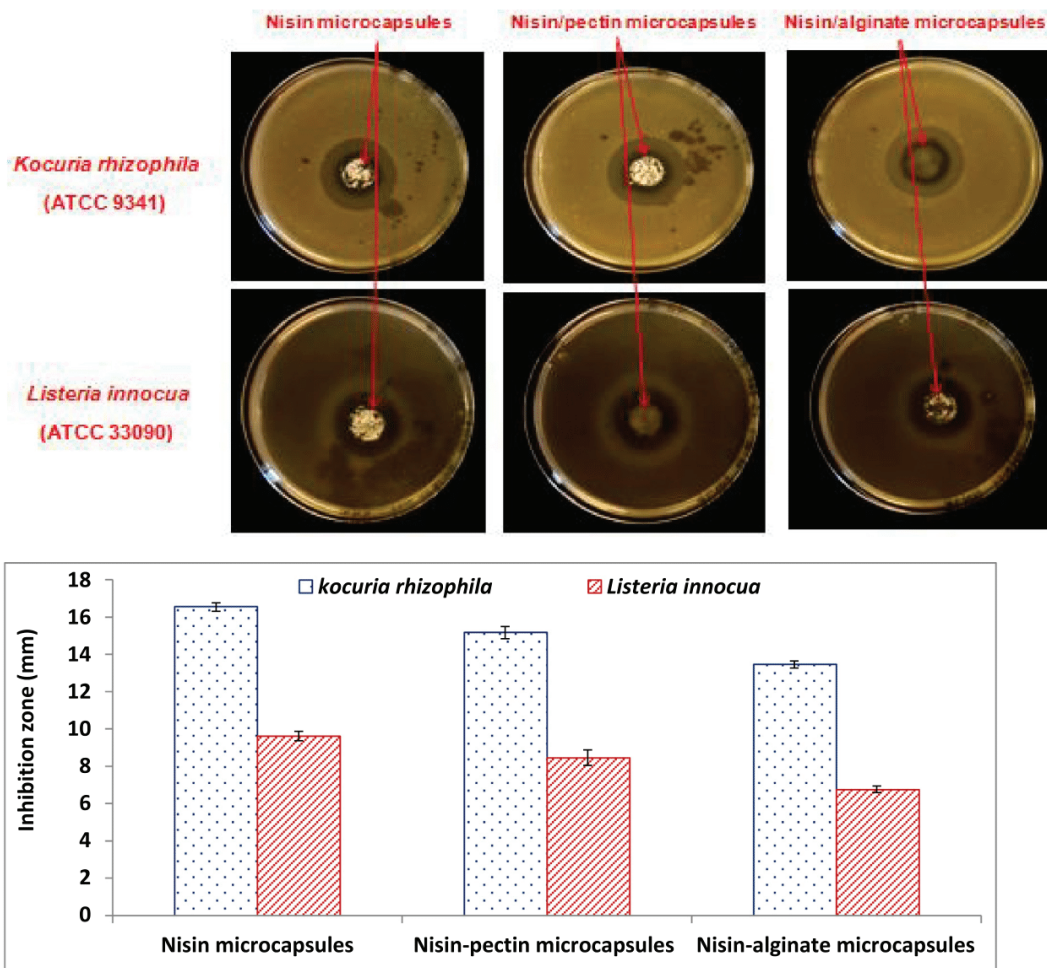


Fig. 6. Antibacterial activity (growth inhibition zone measured after 24 h incubation at 30 °C) of spray-dried nisin, nisin-pectin and nisin-alginate complexes against two Gram-positive bacteria, *K. rhizophila* and *L. innocua*. The photos show an example of the observed inhibition zone for *K. rhizophila* and *L. innocua*.

absorbance intensity maxima at 226 nm decreased for spray-dried and reconstituted nisin showing that changes occurred in the conformation of nisin peptide backbone after the drying process. However, no significant changes occurred in the absorbance intensity maxima at 226 nm for nisin-pectin and nisin-alginate complexes after spray-drying. The interactions between nisin and pectin or alginate probably decreased heat induced unfolding and aggregation of nisin molecules and thus one could suppose that the two polysaccharides acted as protective agents.

### 3.7. Effect of complexation with pectin and alginate and spray-drying on nisin surface hydrophobicity

Estimation of the surface hydrophobicity of polypeptides has been recognized as an effective method to identify polypeptide conformational changes and to control its surface activity. The extrinsic fluorescence was studied measuring the peptide surface hydrophobic values ( $S_0$ ) alone and in presence of pectin or alginate before and after spray-drying with the aid of the fluorescent probe, ANS (Fig. 5B).  $S_0$  is proportional to the number of hydrophobic amino acid residues on the polypeptide surface. ANS fluorescence intensity increases dramatically in a hydrophobic environment or

when the rotational motion of its phenylamino group is restricted. This probe binds to peptides or proteins in a non-covalent way by means of hydrophobic or electrostatic interactions (Someya & Yui, 2010). In presence of nisin, ANS fluorescence intensity increased significantly and  $\lambda_{max}$  was blue shifted from 520 to 480 nm. This observation is consistent with the fact that ANS molecules bound to the peptide hydrophobic segments, and are shielded from the solvent. Before spray-drying,  $S_0$  increased in presence of pectin or alginate as compared to nisin alone and this could be related to the attractive interactions between peptides and polysaccharides resulting in rearrangement or dynamic modification of peptides (Cheng, Ma, Li, Yan, & Cui, 2015). Besides, before spray-drying and in presence of maltodextrin, the highest  $S_0$  value was noticed for the mixed system containing nisin-pectin complexes. Thus, ANS was probably bound to nisin in a higher proportion in presence of pectin. For nisin-alginate complexes, we can assume that the high aggregation rate of complexes decreased the accessibility of ANS molecules to the polypeptide hydrophobic binding sites that were probably hidden inside the polymer network and that were not available anymore for ANS binding. After spray-drying,  $S_0$  slightly increased for nisin, nisin-pectin and nisin-alginate complexes indicating that the drying/heating process could induce a

partial unfolding of nisin molecules inside of self-assembled biopolymer complexes/aggregates leading to a better exposition of the hydrophobic binding sites on polypeptide's molecular surface thus increasing slightly ANS binding affinity.

### 3.8. Antimicrobial activity of spray-dried nisin, nisin-pectin and nisin-alginate complexes

The antimicrobial activity of spray-dried nisin, nisin-pectin and nisin-alginate complexes was assayed against two Gram-positive bacteria, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 and *Listeria innocua* ATCC 33090 by agar well diffusion method. The three types of microcapsules were effective against the two tested microorganisms as evidenced by the growth inhibition zones (Fig. 6). Based on inhibition zones diameters around nisin, nisin-pectin and nisin-alginate particles, nisin microcapsules had the highest antimicrobial activity compared to nisin-pectin and nisin-alginate capsules indicating that complexation with pectin or alginate affected either nisin structure as shown from UV–Vis spectroscopy, activity, and/or diffusion kinetics. Besides, nisin-alginate microcapsules were less efficient than nisin-pectin microcapsules, whatever the tested bacterial strain indicating that changes of nisin structure and consequently its antimicrobial activity were more important in the presence of alginate after complexation and this result is also in agreement with UV–Vis analysis.

## 4. Conclusion

Spray-drying of nisin-pectin and nisin-alginate electrostatic complexes resulted in the microencapsulation of the antimicrobial peptide in different polysaccharide networks. Turbidity and particle size measurements indicated that spray-drying promoted the aggregation of nisin-pectin complexes as well as the dissociation of nisin-alginate aggregates to form more individual complexes. Complexation with pectin or alginate as well as the drying process enhanced nisin surface hydrophobicity. Besides, spray-dried nisin exhibited significant reduction in UV–Vis maximum absorption intensity when compared to spray-dried nisin-pectin or nisin-alginate complexes indicating that complexation with pectin or alginate preserved the structure of nisin during the drying process. This study showed that the complexation of antimicrobial nisin with pectin or alginate leading to high turbidity values especially for alginate can effectively protect its activity during the encapsulation by spray-drying. However, further investigations by techniques such as circular dichroism or Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy are required to understand the molecular mechanisms involved in the preservation of nisin structure after interacting with pectin or alginate during spray-drying. Further experiments should also be performed to check whether the lower inhibition diameter around nisin-alginate particles than around free nisin and to a lesser extent nisin-pectin particles is due to the respective strengths of interactions between nisin and alginate or pectin.

## Acknowledgements

Chedia BEN AMARA received a Ph D grant from the French Ministry of Higher Education and Research. The authors are indebted to Conseil Départemental de l'Ain and Bourg en Bresse Agglomération for their financial support.

## References

Aryee, F. N. A., & Nickerson, M. T. (2012). Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International*, 48, 520–527.

Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, 131, 18–25.

Ben Amara, C., Eghbal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2016). Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 183, 50–57.

Broadhead, J., Edmond Rouan, S. K., & Rhodes, C. T. (1992). The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18, 1169–1206.

Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2012). Cationic antimicrobial ( $\epsilon$ -Polylysine)-anionic polysaccharide (pectin) Interactions: Influence of polymer charge on physical stability and antimicrobial efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1837–1844.

Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2014). Interaction of cationic antimicrobial ( $\epsilon$ -polylysine) with food-grade biopolymers: Dextran, chitosan, carrageenan, alginate, and pectin. *Food Research International*, 64, 396–401.

Cheng, J., Ma, Y., Li, X., Yan, T., & Cui, J. (2015). Effects of milk protein-polysaccharide interactions on the stability of ice cream mix model systems. *Food Hydrocolloids*, 45, 327–336.

De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Nisin, A Lantibiotic Produced by *Lactococcus lactis* Subsp. *Lactis*: Properties, Biosynthesis, Fermentation and Applications. In L. De Vuyst & E. J. Vandamme (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications* (pp. 151–221). Boston, MA, US: Springer.

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

Fioramonti, S. A., Perez, A. A., Aringoli, E. E., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2014). Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, 35, 129–136.

Gharsallaoui, A., Joly, C., Oulahal, N., & Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: Part 2: Antimicrobial polymer materials containing nisin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1275–1289. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2013.763766>.

Hagiwara, A., Imai, N., Nakashima, H., Toda, Y., Kawabe, M., Furukawa, F., ... Hayashi, S. (2010). A 90-day oral toxicity study of nisin A, an anti-microbial peptide derived from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2421–2428.

Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20, 577–585.

Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., German, J. B., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., et al. (2014). Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydrate Polymers*, 103, 573–580.

Hurst, A. (1981). Nisin. In D. Perlman & Allen I. Laskin (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (27, pp. 85–123). Academic Press.

Jones, O. G., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Formation of biopolymer particles by thermal treatment of  $\beta$ -lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 23, 1312–1321.

Khodarahmi, R., Karimi, S. A., Ashrafi Kooshk, M. R., Ghadami, S. A., Ghobadi, S., & Amani, M. (2012). Comparative spectroscopic studies on drug binding characteristics and protein surface hydrophobicity of native and modified forms of bovine serum albumin: Possible relevance to change in protein structure/function upon non-enzymatic glycation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 89, 177–186.

Krivorotova, T., Cirkovas, A., Maciulyte, S., Staneviciene, R., Budriene, S., Serviene, E., et al. (2016). Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hydrocolloids*, 54(Part A), 49–56.

Lee, G. (2002). Spray-drying of proteins. In J. F. Carpenter & M. C. Manning (Eds.), *Rational design of stable protein formulations: Theory and practice* (pp. 135–158). Boston, MA, US: Springer.

Maresca, D., De Prisco, A., La Stora, A., Cirillo, T., Esposito, F., & Mauriello, G. (2016). Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT – Food Science and Technology*, 66, 436–443.

McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 285–308.

Ormus, S., Oulahal, N., Noël, C., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2015). Effect of low methoxyl (LM) pectin complexation on the thermal and proteolytic inactivation of lysozyme: A kinetic study. *Food Hydrocolloids*, 43, 812–818.

Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929–967.

Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, P., de Vos, W. M., & Siezen, R. J. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2873–2878.

Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., & Hardy, J. (1998). Structure and techno-functional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689–753.

Someya, Y., & Yui, H. (2010). Fluorescence lifetime probe for solvent microviscosity utilizing anilino-naphthalene sulfonate. *Analytical Chemistry*, 82, 5470–5476.

Teixeira, M. I., Andrade, L. R., Farina, M., & Rocha-Leão, M. H. M. (2004). Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. *Materials Science and Engineering: C*, 24, 653–658.

Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G. W., & de Kruijff, C. G. (2004). Complexation of Whey Proteins with Carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550–3555.

- Xiao, D., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2011a). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1977–1985.
- Xiao, D., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2011b). Spray-dried zein capsules with coencapsulated nisin and thymol as antimicrobial delivery system for enhanced antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7393–7404.
- Zhao, X., Liu, R., Chi, Z., Teng, Y., & Qin, P. (2010). New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. *Journal of Physical Chemistry B*, 114, 5625–5631.
- Zhong, Q., & Jin, M. (2009). Nanoscale structures of spray-dried zein microcapsules and *in vitro* release kinetics of the encapsulated lysozyme as affected by formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3886–3894.

### **III.6.3. Conclusion**

Le travail présenté dans cette partie a montré que l'atomisation des complexes nisine/pectine et nisine/alginate a permis une bonne encapsulation de la nisine dans différents réseaux polysaccharidiques. En effet, la forme des microparticules obtenues a été significativement influencée par le type de polysaccharide utilisé. De plus, les résultats ont montré que le procédé de séchage par atomisation a favorisé l'agrégation des complexes nisine/pectine tandis qu'il a plutôt promu la dissociation des agrégats nisine/alginate. Cette étude a permis de démontrer l'intérêt de la complexation avec l'alginate ou la pectine pour la protection de la structure et de l'activité antimicrobienne de la nisine lors du procédé de séchage par atomisation.

**Discussion générale**

Si la conception de systèmes de microencapsulation formés entre des polysaccharides et des protéines (ou des peptides) a eu un intérêt croissant durant ces dernières années, plusieurs aspects liés à cette conception restent imparfaitement connus jusqu'à ce jour comme les interactions moléculaires mises en jeu au niveau de ces systèmes. En effet, la nature des complexes protéines/polysaccharides ou peptides/polysaccharides ainsi que leurs propriétés physico-chimiques dépendent fortement de ces interactions. Ces interactions peuvent être influencées par plusieurs facteurs intrinsèques qui sont propres aux polymères utilisés (poids moléculaire,  $pK_a$  des groupements fonctionnels des polysaccharides anioniques employés dans le cadre de notre étude,  $pH_i$  des protéines ou des peptides, nombre de charges électrostatiques positives et négatives, charge nette,...), ou extrinsèques propres au milieu (ratio polysaccharide/protéine,  $pH$ , force ionique, température,...), mais aussi à la méthode d'encapsulation adoptée. L'influence de ces facteurs sur la formation et/ou la stabilité des complexes protéines/polysaccharides ou peptides/polysaccharides doit être étudiée de façon approfondie avant d'envisager la mise en forme de systèmes d'encapsulation (films ou microparticules) à partir de ces complexes. A titre d'exemple, dans le cas de l'encapsulation par séchage par atomisation, plusieurs phénomènes peuvent également se produire avant, après et durant le procédé (cisaillement, traitement thermique, déshydratation) et peuvent donc affecter les interactions mises en jeu entre les biopolymères. Ce travail préalable de caractérisation est donc très important pour une meilleure compréhension de l'influence du procédé de séchage par atomisation sur la formation et les propriétés des complexes atomisés et reconstitués mais surtout sur les caractéristiques des microparticules obtenues (taille, forme, structure interne, protection et/ou libération du composé encapsulé,...).

Dans ce contexte bien précis, plusieurs aspects ont été étudiés dans le cadre de cette thèse dont l'objectif principal est de former des microparticules ou des films antimicrobiens à partir des complexes formés : **(i)** le rôle des interactions entre une protéine (le lysozyme) ou un peptide (la nisine) et la pectine (polysaccharide anionique estérifié) ou l'alginate (polysaccharide anionique linéaire non branché) dans les mécanismes d'association/dissociation des complexes qui en découlent ; **(ii)** l'influence de ces interactions sur la structure du lysozyme ou de la nisine lorsqu'ils sont complexés avec la pectine ou l'alginate ; **(iii)** l'impact du procédé de séchage par atomisation sur les propriétés des complexes formés et sur la structure du lysozyme ou de la nisine quand ils sont utilisés seuls ou lorsqu'ils

sont complexés par la pectine ou l'alginate ; et enfin (iv) l'importance de tous ces phénomènes dans la conservation de l'activité antimicrobienne du lysozyme ou de la nisine.

Parmi les points originaux de ce travail, on peut citer l'utilisation de polysaccharides comme la pectine et l'alginate pour développer des systèmes d'encapsulation incorporant des molécules antimicrobiennes complexées. Ces matrices polysaccharidiques peuvent être dégradées en présence de bactéries cibles productrices d'enzymes pectinolytiques ou alginolytiques pour favoriser la libération de la molécule encapsulée. Lors de la conception de ce type de système, la difficulté provient essentiellement de la dépendance des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des complexes formés des conditions environnantes mais aussi de la méthode d'encapsulation choisie.

La démarche adoptée dans notre travail se base sur l'étude de l'influence de différents facteurs comme le pH et la force ionique sur le phénomène de complexation du lysozyme ou de la nisine par la pectine ou l'alginate (aspect formulation). Notre travail concerne aussi l'étude de l'effet du cisaillement et/ou du traitement thermique appliqués durant le procédé de séchage par atomisation sur les interactions mises en jeu (aspect procédé). La complexation a été étudiée sur une large gamme de pH de manière à identifier la zone de pH qui permet de favoriser les interactions attractives entre les molécules étudiées. Le tampon imidazole-acétate (5 mM), ajusté au pH adéquat, a été utilisé pour la préparation des suspensions de complexes puisqu'il s'agit d'un tampon caractérisé par une faible force ionique. La stratégie sur laquelle ce travail s'est basé a consisté à étudier la formation des complexes et les interactions moléculaires qui ont lieu en ajoutant des concentrations croissantes en polysaccharide (pectine ou alginate) de 0 à 4 g/L à une quantité fixe en lysozyme (0,714 g/L) ou en nisine (5 g/L). Le polysaccharide est ajouté en quantité suffisante jusqu'à saturation des sites cationiques du peptide ou de la protéine (en mesurant le potentiel zêta). Dans des études précédentes, la formation des complexes lysozyme/pectine à pH 7 ainsi que leur stabilité vis-à-vis d'enzymes protéolytiques ou de traitements thermiques ont déjà été étudiées (Bayarri *et al.*, 2014 ; Ormus *et al.*, 2015). Ces études ont permis de montrer que le lysozyme est capable de se complexer avec la pectine à pH 7 *via* des interactions électrostatiques. Les complexes formés ont été caractérisés par une forme sphérique et une charge nette globale négative ce qui suggère que le lysozyme, chargé positivement, est 'piégé' à l'intérieur d'un réseau formé par les chaînes anioniques de pectine. Ces études ont permis une meilleure caractérisation des interactions lysozyme/pectine. Toutefois, il existe un manque d'informations concernant les facteurs qui permettent de contrôler la taille et les propriétés physico-chimiques des complexes lysozyme/pectine.

Dans un premier temps, l'étude des interactions entre le lysozyme et la pectine en solution a été réalisée et a montré que des complexes entre ces deux molécules peuvent être formés sur une large gamme de pH allant de 3 à 9, principalement par des interactions électrostatiques. L'addition graduelle de pectine à une concentration fixe en lysozyme aux différents pH étudiés s'est traduite par une phase d'association des complexes lysozyme/pectine (agrégation) suivie d'une phase de dissociation des agrégats. Le phénomène d'agrégation des complexes pourrait être expliqué par l'établissement de ponts pectiques entre les sites cationiques du lysozyme demeurant libres à la surface des complexes (Bayarri *et al.*, 2014). Les études spectroscopiques ont montré qu'au cours de ces deux phases d'association et de dissociation, des changements au niveau de la conformation du lysozyme ont eu lieu. Il a également été observé que des conditions spécifiques de ratio lysozyme/pectine et de pH sont nécessaires pour permettre une agrégation optimale des complexes et ceci a été relié à la variation de la densité des charges des deux biopolymères en fonction du pH. D'une part, l'association entre les deux molécules a nécessité de fortes concentrations en pectine à pH 3 et ce résultat peut s'expliquer par la faible densité de charge du polysaccharide à cette valeur de pH. D'autre part, la formation des complexes a eu lieu dès l'ajout de faibles quantités de pectine à pH 9 ce qui pourrait être expliqué par le fait que les interactions électrostatiques avec les sites cationiques du lysozyme ont été probablement promues puisque les chaînes de pectine portent une charge négative élevée à ce pH. Une bonne modulation de ces interactions peut donc être favorablement exploitée pour augmenter la stabilité du lysozyme, concevoir des films ou des microparticules antimicrobiennes pour la préservation des aliments et/ou contrôler la libération du lysozyme à partir de ces matrices.

Par la suite, on a montré que des complexes formés entre le lysozyme (0,714 g/L) et à différentes concentrations en pectine (0-4 g/L) à pH 7 peuvent être utilisés pour former des microparticules antimicrobiennes par le procédé de séchage par atomisation, en utilisant les maltodextrines comme matrice de séchage. Intentionnellement, les complexes lysozyme/pectine ont été formés à pH 7 puisque le lysozyme possède une activité enzymatique optimale à ce pH (Bayarri *et al.*, 2014). Afin d'étudier l'effet du séchage par atomisation sur les interactions mises en jeu, les propriétés des complexes formés avant et après atomisation et reconstitution ont été comparées. Dans cette section, il a été démontré que le lysozyme a été efficacement encapsulé dans différents réseaux polysaccharidiques. La turbidité maximale des complexes atomisés a été plus faible que celle des complexes non atomisés à une concentration en pectine permettant une agrégation optimale des complexes et à partir de laquelle la turbidité



a diminué. A partir de ce résultat, il est clair que le procédé de séchage par atomisation a favorisé la dissociation des agrégats de complexes lysozyme/pectine. Au-delà d'une concentration en pectine de 0,5 g/L, une baisse de l'activité enzymatique du lysozyme complexé et atomisé a été notée et ceci pourrait être dû à la limitation de la diffusion et de l'accessibilité du substrat aux sites actifs du lysozyme encapsulé au sein du réseau polysaccharidique. De plus, les observations microscopiques ont montré que la taille des microparticules a été similaire quelque soit la concentration en pectine et ceci pourrait être dû au cisaillement exercé sur les complexes lors de l'atomisation mais aussi à la 'dilution' de ces complexes suite à l'addition des maltodextrines rendant la différenciation entre les différentes poudres obtenues difficile.

Il nous a également semblé intéressant d'étudier les interactions entre le lysozyme et l'alginate de sodium, un polysaccharide anionique non estérifié. Ainsi, des concentrations croissantes en alginate de sodium (0-4 g/L) ont été rajoutées au lysozyme (0,714 g/L) à pH 7 et les effets de la complexation lysozyme/alginate sur la structure et les activités enzymatique et antimicrobienne du lysozyme ont été évalués. Dans cette étude, il a été montré que la taille et l'aspect des complexes et des agrégats formés ont été dépendants de la concentration du polysaccharide. De plus, l'agrégation des complexes a été maximale pour une concentration en alginate au niveau de laquelle une neutralisation des charges nettes des deux biopolymères a eu lieu. Il a été également constaté que l'activité enzymatique du lysozyme a baissé suite à sa complexation avec l'alginate mais a été totalement restaurée après l'addition du chlorure de calcium indiquant que les interactions sont principalement électrostatiques. Cette étude a également montré l'intérêt potentiel de l'utilisation des complexes lysozyme/alginate pour produire des films antimicrobiens. En effet, les films obtenus ont été actifs contre deux bactéries à Gram positif *Kocuria rhizophila* et *Listeria innocua* et il a été également constaté que leur activité antimicrobienne a augmenté significativement suite à l'ajout de l'alginate lyase. Ceci peut s'expliquer par la dissociation des complexes lysozyme/alginate et/ou l'augmentation de la vitesse de libération du lysozyme à travers la matrice d'alginate suite à l'hydrolyse enzymatique. Les films obtenus peuvent donc cibler efficacement des bactéries sensibles au lysozyme et productrices d'enzymes alginolytiques. Dans une étude similaire (Bayarri *et al.*, 2014), il a été constaté que l'ajout d'enzymes pectinolytiques a entraîné une augmentation importante de la vitesse de relargage du lysozyme quand il est incorporé dans des films à base de pectine.

Dans un second temps, le lysozyme (protéine globulaire) a été remplacé par la nisine (peptide) afin d'étudier l'effet de la taille et de la structure de l'agent protéique antimicrobien

sur la formation des complexes avec la pectine ou l'alginate à trois valeurs de pH (pH 3, pH 5 et pH 7). A ces valeurs de pH, la nisine, chargée positivement, est capable d'interagir notamment *via* des interactions électrostatiques avec la pectine ou l'alginate qui sont chargés négativement. Ces travaux ont permis, entre autres, de mieux comprendre l'effet du pH sur les propriétés des complexes nisine/pectine ou nisine/alginate formés (taille, forme, charge,...), sur les interactions moléculaires mises en jeu entre ces molécules mais, aussi sur la structure et l'activité antimicrobienne de la nisine suite à sa complexation.

L'activité antimicrobienne de la nisine implique des interactions électrostatiques entre l'extrémité C-terminale du peptide (positivement chargé) et les phospholipides de la membrane des bactéries (chargés négativement) ainsi que des interactions hydrophobes *via* l'extrémité N-terminale qui permet l'insertion de la nisine dans la bicouche phospholipidique de la membrane bactérienne entraînant sa perméabilisation (McAuliffe *et al.*, 2001). En se basant sur ce mode d'action, il est important d'évaluer l'influence de la complexation par la pectine ou l'alginate sur la structure de ce peptide, de caractériser les interactions qui sont mises en jeu et aussi de mieux comprendre l'effet de ces interactions sur l'hydrophobicité de surface de la nisine. Ainsi, dans cette section, il a été démontré que la complexation de la nisine par les deux polysaccharides est dépendante du pH étant donné que ce facteur influence la densité des charges des molécules étudiées. Les résultats ont révélé que la complexation de la nisine avec la pectine ou l'alginate a été favorisée dans des conditions acides (pH 3 et pH 5). En effet, l'ajout de quantités croissantes en pectine ou en alginate (0-4 g/L) à une concentration fixe en nisine à pH 3 et pH 5 a entraîné une augmentation de la turbidité jusqu'à atteindre un pic à partir duquel la turbidité est restée constante (pH 3) ou a diminué légèrement (pH 5). La formation et/ou l'agrégation des complexes nisine/pectine et nisine/alginate ont été suivies d'un changement au niveau de leur taille, de leur charge et de leur structure. Cette complexation a été aussi accompagnée d'un changement au niveau de la structure du squelette peptidique de la nisine et de son hydrophobicité de surface. En effet, l'interaction de la nisine avec la pectine ou l'alginate a entraîné une meilleure exposition des résidus hydrophobes du peptide, essentiellement à pH 3 et pH 5. Par contre, à pH 7, la formation des complexes était réduite et les modifications structurales de la nisine étaient beaucoup moins significatives et ceci peut s'expliquer par la diminution de la charge positive portée par la nisine mais aussi par la baisse de sa solubilité à cette valeur de pH (Hurst, 1981). Dans un second temps, il a été également montré qu'à partir des complexes nisine/pectine ou nisine/alginate, il est possible d'obtenir des films dont l'activité antimicrobienne contre les bactéries cibles serait dépendante du pH.

Ce résultat montre clairement qu'il serait intéressant de contrôler et/ou de déclencher la déstabilisation de la matrice formée en modifiant le pH dans le but d'optimiser le relargage de la nisine. Par la suite, on s'est intéressé à l'étude du potentiel de complexation avec la pectine ou l'alginate pour encapsuler la nisine par le procédé de séchage par atomisation et protéger sa structure contre les différentes contraintes (cisaillement, traitement thermique, déshydratation) qu'elle peut subir lors de l'atomisation. Dans le cadre de cette étude, la formation des complexes nisine/pectine et nisine/alginate a été réalisée à pH 5, condition permettant de favoriser les interactions électrostatiques entre la nisine et les deux polysaccharides, et à un ratio peptide/polysaccharide de 5/2 qui permet une coacervation maximale. Les complexes formés ont été par la suite atomisés en présence de maltodextrines comme matrice de séchage. Les observations réalisées par microscopie électronique à balayage ont montré que l'atomisation des coacervats nisine/pectine et nisine/alginate a permis une bonne encapsulation de la nisine dans différentes matrices polysaccharidiques et que l'aspect des microparticules obtenues a été dépendant du type de polysaccharide utilisé. Les résultats ont également révélé que l'atomisation a favorisé l'association des complexes nisine/pectine tandis qu'elle a plutôt promu la dissociation des agrégats nisine/alginate. De plus, cette étude a permis de démontrer que la structure de la nisine ainsi que son activité antimicrobienne semblent être mieux protégées, lorsqu'elle est complexée avec un polysaccharide anionique.

Mis ensemble, ces différents résultats montrent que lors de la conception de systèmes d'encapsulation (films ou microparticules) constitués de complexes protéines/polysaccharides ou peptides/polysaccharides, le contrôle des différents facteurs pouvant influencer les liaisons moléculaires mises en jeu et l'état d'association ou de dissociation des complexes formés est un élément clé pour produire des systèmes performants. Il est également nécessaire d'évaluer l'effet de ces interactions sur la structure des molécules encapsulées et sur le maintien de leur activité. Une bonne connaissance des propriétés des molécules utilisées et une bonne maîtrise des conditions opératoires (ratio protéine/polysaccharide, ratio peptide/polysaccharide, pH, force ionique, température, cisaillement, degré de déshydratation,...) sont nécessaires pour contrôler l'association encapsulant/encapsulé dans l'objectif de concevoir des systèmes d'encapsulation efficaces et avec des propriétés fonctionnelles (protection de l'agent d'intérêt, libération contrôlée,...) modulables.

**Conclusions et perspectives**

Ce travail de thèse, qui vise à concevoir des systèmes d'encapsulation en utilisant des complexes formés entre une protéine (le lysozyme) ou un peptide (la nisine) et des polysaccharides anioniques, a permis de mieux appréhender les relations qui existent entre la composition, la structure et la libération des molécules d'intérêt à travers les systèmes formés (films ou microparticules). L'objectif était donc de comprendre les mécanismes mis en jeu et les facteurs impliqués, éléments indispensables pour une bonne maîtrise de tels systèmes. Il s'agissait d'avoir une vision plus claire sur les interactions moléculaires qui ont lieu entre le lysozyme ou la nisine et la pectine ou l'alginate, la structure des films produits par voie solvant (casting) ou des microparticules obtenues par séchage par atomisation et qui représentent une barrière qu'un composé encapsulé doit franchir lors de sa libération. Un autre objectif était de comprendre l'effet du séchage par atomisation sur les propriétés des complexes formés et sur la structure des molécules encapsulées (nisine ou lysozyme) et leur activité antimicrobienne. Ce travail doit permettre d'élaborer des systèmes dont les fonctions principales, la protection et le contrôle de la libération, seraient modulables en fonction des interactions mises en jeu qui dépendent à la fois des propriétés des matériaux qui les constituent et d'un ensemble de facteurs propres au milieu (pH, force ionique, température,...).

Dans un premier temps, il a été indispensable de sélectionner les molécules d'intérêt et les polysaccharides à l'étude. Les molécules d'intérêt sont la nisine et le lysozyme, utilisées pour leur activité antimicrobienne comme additifs en industrie alimentaire. De plus, ces deux molécules sont caractérisées par une charge positive sur une large gamme de pH en raison de leur  $pH_i$  élevé. Elles sont donc capables d'interagir *via* des interactions électrostatiques avec les polysaccharides anioniques choisis, l'alginate et la pectine, à un pH au-dessous de leur  $pH_i$  et au-dessus du  $pK_a$  du polysaccharide. Etant donné que la complexation *via* des interactions électrostatiques est un processus qui dépend fortement de certains facteurs comme le pH ou la force ionique, il nous a semblé nécessaire de comprendre l'influence de ces paramètres sur la nature et l'intensité des interactions qui s'exercent entre le lysozyme ou la nisine et les polysaccharides utilisés. On a pu démontrer que la conception de systèmes d'encapsulation à base de complexes formés entre des molécules antimicrobiennes et des polysaccharides représente une alternative intéressante dans la mesure où ces systèmes peuvent cibler efficacement des bactéries sensibles aux agents antimicrobiens utilisés et capables de produire des enzymes pectinolytiques ou alginolytiques.

Une attention particulière a été portée sur l'effet du séchage par atomisation sur les propriétés des complexes formés, les propriétés de dissociation/association de ces complexes,

et sur la structure des molécules encapsulées. Nous avons pu montrer qu'à des concentrations en polysaccharide qui permettent une complexation maximale, la structure de la protéine (lysozyme) ou du peptide (nisine) encapsulés est bien protégée contre le cisaillement, le traitement thermique et/ou la déshydratation lors du séchage par atomisation.

En revanche, à l'issue de ce travail, plusieurs questions se posent, et des études complémentaires semblent nécessaires pour une meilleure compréhension de la nature exacte des interactions moléculaires mises en jeu au sein des complexes formés et des sites moléculaires au niveau desquels les interactions entre les deux biopolymères peuvent avoir lieu. En effet, même si les interactions électrostatiques s'avèrent être les interactions majoritaires au sein de ces systèmes, d'autres types de liaisons peuvent également se manifester comme les interactions hydrogènes, les interactions hydrophobes ou les interactions de van der Waals. Il est également important de déterminer si ces interactions entraînent une modification de la conformation du lysozyme ou de la nisine, voire un dépliement de leur structure, et de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la protection de la structure de ces molécules lors de procédé de séchage. Parmi les techniques envisageables, on cite la titration calorimétrique isotherme, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou le dichroïsme circulaire. En outre, la dissociation des contraintes mécanique (cisaillement), thermique et hydrique que subissent les complexes lors du séchage par atomisation faciliterait la compréhension des mécanismes impliqués dans leur déstabilisation lors de l'atomisation.

Parmi les voies d'exploration qui peuvent être envisagées à l'issue de ce travail on peut citer : **(i)** l'utilisation de pectines caractérisées par différents degrés d'estérification afin de mieux comprendre le rôle du degré d'estérification et de cerner les sites moléculaires au niveau desquels les assemblages moléculaires peuvent avoir lieu ; **(ii)** l'emploi de complexes protéines/polysaccharides (par exemple le système caséinate de sodium/pectine) pour stabiliser des émulsions qui peuvent être obtenues à partir des complexes préalablement préparés et rajoutés à l'huile ou par la méthode couche par couche et qui sont destinées à être séchées. Cette perspective est très intéressante si on envisage d'encapsuler une huile essentielle caractérisée par de bonnes propriétés antimicrobiennes mais une insolubilité dans l'eau; **(iii)** l'exploitation de l'intérêt potentiel des complexes solubles afin de stabiliser des émulsions ; **(iv)** l'étude de l'effet de la réticulation enzymatique sur les propriétés des complexes protéines/polysaccharides ou peptides/polysaccharides et sur celles des systèmes d'encapsulation qui en découlent (l'objectif de la réticulation serait de rendre ces complexes plus résistants aux changements des facteurs environnementaux) ; **(v)** l'étude des propriétés des

complexes formés à des valeurs de pH supérieures au  $pHi$  en utilisant un polysaccharide cationique comme le chitosane...

Plusieurs applications peuvent aussi être envisagées puisque les complexes formés entre les protéines (ou les peptides) et les polysaccharides peuvent être utilisés pour encapsuler des bactéries probiotiques afin de les protéger ou bien pour encapsuler des molécules lipophiles oxydables (acides gras polyinsaturés,...) dans l'objectif de relier la perméabilité de la matrice d'encapsulation à l'oxygène à sa capacité à protéger les molécules encapsulées contre le phénomène d'oxydation. Une autre approche intéressante consiste à étudier le devenir des systèmes d'encapsulation élaborés dans le tractus digestif puisque les polysaccharides utilisés peuvent être sensibles à l'action de la microflore intestinale favorisant une déstabilisation des complexes et engendrant ainsi la libération du composé encapsulé. Ainsi, l'emploi des complexes peptides/polysaccharides (ou protéines/polysaccharides) afin de développer des systèmes d'encapsulation présente un éventail large d'applications aussi bien dans le domaine agroalimentaire que dans le domaine nutraceutique ou pharmaceutique.

**Références bibliographiques**



- Ach, D., Briançon, S., Dugas, V., Pelletier, J., Broze, G., Chevalier, Y. (2015). Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with acacia gum. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *481*, 367–374.
- Antonov, Y.A., Zhuravleva, I.L., Cardinaels, R., Moldenaers, P. (2015). Structural studies on the interaction of lysozyme with dextran sulfate. *Food Hydrocolloids*, *44*, 71–80.
- Augustin, M.A., Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, *38*, 902–912.
- Bakker, M.A.E., Koning, M.M.G., Visser, J. (1994). Fatty ingredient. W.O. Patent application. 14334.
- Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, *131*, 18–25.
- Bosnea, L., Moschakis, T., Biliaderis, C. (2014). Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. *Food and Bioprocess Technology*, *7*, 2767–2781.
- Bosnea, L.A., Moschakis, T., Biliaderis, C.G. (2017). Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix. *Food & Function*, *8*, 554–562.
- Bouksaim, M., Lacroix, C., Audet, P., Simard, R. (2000). Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *59*, 141–156.
- Burgess, D. (1990). Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, *140*, 227–238.
- Burgess, D.J., Carless, J.E. (1984). Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *98*, 1–8.
- Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H.B., Pedraza-Chaverri, J., Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, *62*, 49–57.
- Callewaert, L., Michiels, C.W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, *35*, 127–160.
- Campo, V.L., Kawano, D.F., Silva Jr., D.B. da, Carvalho, I. (2009). Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis—a review. *Carbohydrate Polymers*, *77*, 167–180.
- Capitani, C., Pérez, O.E., Pacheco, B., Teresa, M., Pilosof, A.M.R. (2007). Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, *21*, 1344–1354.

- Chai, C., Lee, J., Huang, Q. (2014). The effect of ionic strength on the rheology of pH-induced bovine serum albumin/ $\kappa$ -carrageenan coacervates. *LWT-Food Science and Technology*, *59*, 356–360.
- Champagne, C.P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*, 184–190.
- Chanasattru, W., Jones, O.G., Decker, E.A., McClements, D.J. (2009). Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of  $\beta$ -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, *23*, 2450–2457.
- Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. (2014). Antimicrobial delivery systems based on electrostatic complexes of cationic  $\epsilon$ -polylysine and anionic gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, *35*, 137–143.
- Chapeau, A. L., Tavares, G.M., Hamon, P., Croguennec, T., Poncelet, D., Bouhallab, S. (2016). Spontaneous co-assembly of lactoferrin and  $\beta$ -lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloids*, *57*, 280–290.
- Chen, F. P., Ou, S. Y., Tang, C. H. (2016). Core–shell soy protein–soy polysaccharide complex (nano)particles as carriers for improved stability and sustained release of curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*, 5053–5059.
- Cheng, J., Ma, Y., Li, X., Yan, T., Cui, J. (2015). Effects of milk protein-polysaccharide interactions on the stability of ice cream mix model systems. *Food Hydrocolloids*, *45*, 327–336.
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, *19*, 982–989.
- Chourpa, I., Ducel, V., Richard, J., Dubois, P., Boury, F. (2006). Conformational modifications of alpha gliadin and globulin proteins upon complex coacervates formation with gum Arabic as studied by Raman microspectroscopy. *Biomacromolecules*, *7*, 2616–2623.
- Conte, A., Buonocore, G.G., Sinigaglia, M., Del Nobile, M.A. (2007). Development of immobilized lysozyme based active film. *Journal of Food Engineering*, *78*, 741–745.
- Cooper, C.L., Dubin, P.L., Kayitmazer, A.B., Turksen, S. (2005). Polyelectrolyte–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *10*, 52–78.
- Corsaro, C., Mallamace, D. (2011). A Nuclear Magnetic Resonance study of the reversible denaturation of hydrated lysozyme. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications*, *390*, 2904–2908.
- Cousin, F., Gummel, J., Combet, S., Boué, F. (2011). The model lysozyme–PSSNa system for electrostatic complexation: similarities and differences with complex coacervation. *Advances in Colloid and Interface Science*, *167*, 71–84.
- Daemi, H., Barikani, M., Barmar, M. (2013). Compatible compositions based on aqueous polyurethane dispersions and sodium alginate. *Carbohydrate Polymers*, *92*, 490–496.

- De Kruif, C.G., Weinbreck, F., de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *9*, 340–349.
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., Maji, T.K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, *239*, 136–145.
- Diamond, R. (1974). Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, *82*, 371–391.
- Dickinson, E McClements, D.J. (1996). Molecular basis of protein functionality. In *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic & Professional, London, pp 27–76.
- Dickinson, E. (1998). Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions. *Trends in Food Science & Technology*, *9*, 347–354.
- Dong, D., Hua, Y., Chen, Y., Kong, X., Zhang, C., Wang, Q. (2013). Charge compensation, phase Diagram, and protein aggregation in soy protein–gum Arabic complex formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 3934–3940.
- Dong, D., Li, X., Hua, Y., Chen, Y., Kong, X., Zhang, C., Wang, Q. (2015). Mutual titration of soy proteins and gum Arabic and the complexing behavior studied by isothermal titration calorimetry, turbidity and ternary phase boundaries. *Food Hydrocolloids*, *46*, 28–36.
- Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D., Sanchez, C. (2000). Protein–polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *5*, 202–214.
- Du, X., Dubin, P.L., Hoagland, D.A., Sun, L. (2014). Protein-selective coacervation with hyaluronic acid. *Biomacromolecules*, *15*, 726–734.
- Duhoanimana, E., Karangwa, E., Lai, L., Xu, X., Yu, J., Xia, S., Zhang, X., Muhoza, B., Habinshuti, I. (2017). Effect of sodium carboxymethyl cellulose on complex coacervates formation with gelatin: coacervates characterization, stabilization and formation mechanism. *Food Hydrocolloids*, *69*, 111–120.
- Eghbal, N., Degraeve, P., Oulahal, N., Yarmand, M.S., Mousavi, M.E., Gharsallaoui, A. (2017). Low methoxyl pectin/sodium caseinate interactions and composite film formation at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, *69*, 132–140.
- Eghbal, N., Yarmand, M.S., Mousavi, M., Degraeve, P., Oulahal, N., Gharsallaoui, A. (2016). Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 947–956.
- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T.R., Dowling, K., Barrow, C.J., Adhikari, B.P. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, *19, Part B*, 882–892.
- Evans, M., Ratcliffe, I., Williams, P.A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *18*, 272–282.

- Fang, Y., Li, L., Inoue, C., Lundin, L., Appelqvist, I. (2006). Associative and segregative phase separations of gelatin/ $\kappa$ -carrageenan aqueous mixtures. *Langmuir*, *22*, 9532–9537.
- Farris, S., Schaich, K.M., Liu, L., Cooke, P.H., Piergiovanni, L., Yam, K.L. (2011). Gelatin–pectin composite films from polyion-complex hydrogels. *Food Hydrocolloids*, *25*, 61–70.
- Fioramonti, S.A., Perez, A.A., Aringoli, E.E., Rubiolo, A.C., Santiago, L.G. (2014). Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocolloids*, *35*, 129–136.
- Frith, W.J. (2010). Mixed biopolymer aqueous solutions—phase behaviour and rheology. *Advances in Colloid and Interface Science*, *161*, 48–60.
- Frugier, D., Audebert, R. (1994). Interaction between oppositely charged low ionic density polyelectrolytes: complex formation or simple mixture? In *macromolecular complexes in chemistry and biology*. Springer, Berlin, pp 135–149.
- Galazka, V.B., Smith, D., Ledward, D.A., Dickinson, E. (1999). Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. *Food Chemistry*, *64*, 303–310.
- Gharsallaoui, A., Joly, C., Oulahal, N., Degraeve, P. (2015). Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *8*, 1262–1274.
- Gharsallaoui, A., Yamauchi, K., Chambin, O., Cases, E., Saurel, R. (2010). Effect of high methoxyl pectin on pea protein in aqueous solution and at oil/water interface. *Carbohydrate Polymers*, *80*, 817–827.
- Ghosh, A.K., Bandyopadhyay, P. (2012). Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids, D.N. Karunaratne (Ed.), *the complex world of polysaccharides*, In *Tech*, *14*, Rijeka, pp 397.
- Girard, M., Sanchez, C., Laneuville, S.I., Turgeon, S.L., Gauthier, S.F. (2004). Associative phase separation of  $\beta$ -lactoglobulin/pectin solutions: a kinetic study by small angle static light scattering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *35*, 15–22.
- Gohil, R.M. (2011). Synergistic blends of natural polymers, pectin and sodium alginate. *Journal of Applied Polymer Science*, *120*, 2324–2336.
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Letters*, *32*, 195–198.
- Grinberg, V.Y., Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, *11*, 145–158.
- Gulão, E., de Souza, C.J.F., da Silva, F.A.S., Coimbra, J.S.R., Garcia-Rojas, E.E. (2014). Complex coacervates obtained from lactoferrin and gum Arabic: formation and characterization. *Food Research International*, *65*, Part C, 367–374.
- Hansen, P.M.T., Hidalgo, J., Gould, I.A. (1971). Reclamation of whey protein with carboxymethylcellulose. *Journal of Dairy Science*, *54*, 830–834.

- Happi Emaga, T., Garna, H., Paquot, M., Deleu, M. (2012). Purification of pectin from apple pomace juice by using sodium caseinate and characterisation of their binding by isothermal titration calorimetry. *Food Hydrocolloids*, *29*, 211–218.
- Haug, A., Larsen, B., Smidsrød, O., Smidsrød, O., Eriksson, G., Blinc, R., Paušak, S., Ehrenberg, L., Dumanović, J. (1967). Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica*, *21*, 691–704.
- Huang, T., Tu, Z., Wang, H., Shangguan, X., Zhang, L., Zhang, N., Bansal, N. (2017). Pectin and enzyme complex modified fish scales gelatin: rheological behavior, gel properties and nanostructure. *Carbohydrate Polymers*, *156*, 294–302.
- Huang, W., Xu, H., Xue, Y., Huang, R., Deng, H., Pan, S. (2012). Layer-by-layer immobilization of lysozyme–chitosan–organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Research International*, *48*, 784–791.
- Hurst, A. (1981). Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, *27*, 85–123.
- Ibanoglu, E. (2005). Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chemistry*, *90*, 621–626.
- Imoto, T., Forster, L.S., Rupley, J.A., Tanaka, F. (1972). Fluorescence of lysozyme: emissions from tryptophan residues 62 and 108 and energy migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *69*, 1151–1155.
- Israelachvili, J. (1992). *Intermolecular and surface forces* 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press, London, pp 450.
- Jaramillo, D.P., Roberts, R.F., Coupland, J.N. (2011). Effect of pH on the properties of soy protein–pectin complexes. *Food Research International*, *44*, 911–916.
- Jones, O.G., McClements, D.J. (2010). Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*, 374–397.
- Jones, O.G., McClements, D.J. (2011). Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein–polysaccharide complexes. *Advances in Colloid and Interface Science*, *167*, 49–62.
- Khalesi, H., Emadzadeh, B., Kadkhodae, R., Fang, Y. (2016). Whey protein isolate-Persian gum interaction at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, *59*, 45–49.
- Khodarahmi, R., Karimi, S.A., Ashrafi Kooshk, M.R., Ghadami, S.A., Ghobadi, S., and Amani, M. (2012). Comparative spectroscopic studies on drug binding characteristics and protein surface hydrophobicity of native and modified forms of bovine serum albumin: Possible relevance to change in protein structure/function upon non-enzymatic glycation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *89*, 177–186.
- Koupantsis, T., Pavlidou, E., Paraskevopoulou, A. (2014). Flavour encapsulation in milk proteins – CMC coacervate-type complexes. *Food Hydrocolloids*, *37*, 134–142.

- Koupantsis, T., Pavlidou, E., Paraskevopoulou, A. (2016). Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins – CMC complex coacervates for flavour encapsulation. *Food Hydrocolloids*, *57*, 62–71.
- Krzeminski, A., Prell, K.A., Busch-Stockfisch, M., Weiss, J., Hinrichs, J. (2014). Whey protein–pectin complexes as new texturising elements in fat-reduced yoghurt systems. *International Dairy Journal*, *36*, 118–127.
- Laugel, N., Betscha, C., Winterhalter, M., Voegel, J. C., Schaaf, P., Ball, V. (2006). Relationship between the growth regime of polyelectrolyte multilayers and the polyanion/polycation complexation enthalpy. *The Journal of Physical Chemistry B*, *110*, 19443–19449.
- Lauth, V., Maas, M., Rezwani, K. (2014). Coacervate-directed synthesis of CaCO<sub>3</sub> microcarriers for pH-responsive delivery of biomolecules. *Journal of Materials Chemistry B*, *2*, 7725–7731.
- Le, X.T., Rioux, L.E., Turgeon, S.L. (2017). Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. *Advances in Colloid and Interface Science*, *239*, 127–135.
- Li, D., Yang, Y., Cao, X., Xu, C., Ji, B. (2012). Investigation on the pH-dependent binding of vitamin B12 and lysozyme by fluorescence and absorbance. *Journal of Molecular Structure*, *1007*, 102–112.
- Li, Y., Huang, Q. (2015). Protein–polysaccharide complexes for effective delivery of bioactive functional food ingredients. In *Nanotechnology and Functional Foods*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp 224.
- Li, Z., Wang, Y., Pei, Y., Xiong, W., Xu, W., Li, B., Li, J. (2017). Effect of substitution degree on carboxymethylcellulose interaction with lysozyme. *Food Hydrocolloids*, *62*, 222–229.
- Liu, F., Ma, C., Gao, Y., McClements, D.J. (2017a). Food-grade covalent complexes and their application as nutraceutical delivery systems: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *16*, 76–95.
- Liu, J., Shim, Y.Y., Shen, J., Wang, Y., Reaney, M.J.T. (2017b). Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic coacervates: turbidity and rheology. *Food Hydrocolloids*, *64*, 18–27.
- Liu, L., Liu, C.K., Fishman, M.L., Hicks, K.B. (2007). Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 2349–2355.
- Liu, S., Cao, Y.L., Ghosh, S., Rousseau, D., Low, N.H., Nickerson, M.T. (2010). Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 552–556.
- Lv, Y., Zhang, X., Abbas, S., Karangwa, E. (2012). Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. *Journal of Food Engineering*, *111*, 225–233.

- Ma, W., Tang, C.H., Yin, S.W., Yang, X.Q., Qi, J.R. (2013). Genipin-crosslinked gelatin films as controlled releasing carriers of lysozyme. *Food Research International*, *51*, 321–324.
- Makki, F., Durance, T.D. (1996). Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. *Food Research International*, *29*, 635–645.
- Masschalck, B., Michiels, C.W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *29*, 191–214.
- Matalanis, A., Jones, O.G., McClements, D.J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, *25*, 1865–1880.
- Mattison, K.W., Brittain, I.J., Dubin, P.L. (1995). Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnology Progress*, *11*, 632–637.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*, 285–308.
- McClements, D.J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, *24*, 621–625.
- McClements, D.J., Decker, E.A., Park, Y., Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*, 577–606.
- Mckenzie, H.A., White, F.H. (1991). Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in Protein Chemistry*, *41*, 173–315.
- Mecitoğlu, Ç., Yemenicioğlu, A., Arslanoğlu, A., Elmacı, Z.S., Korel, F., Çetin, A.E. (2006). Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International*, *39*, 12–21.
- Mendes de Souza, P., Fernández, A., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloids*, *24*, 300–306.
- Mohajer, S., Rezaei, M., Hosseini, S.F. (2017). Physico-chemical and microstructural properties of fish gelatin/agar bio-based blend films. *Carbohydrate Polymers*, *157*, 784–793.
- Moschakis, T., Biliaderis, C.G. (2017). Biopolymer-based coacervates: structures, functionality and applications in food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *28*, 96–109.
- Moschakis, T., Murray, B.S., Biliaderis, C.G. (2010). Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum Arabic mixed dispersions. *Food Hydrocolloids*, *24*, 8–17.
- Nigen, M. (2008). Interactions et assemblages entre l'alpha lactalbumine et le lysozyme: mécanismes, structures et stabilité. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes. pp 47–51.

- Ormus, S., Oulahal, N., Noël, C., Degraeve, P., Gharsallaoui, A. (2015). Effect of low methoxyl (LM) pectin complexation on the thermal and proteolytic inactivation of lysozyme: A kinetic study. *Food Hydrocolloids*, *43*, 812–818.
- Picart, C., Lavalle, P., Hubert, P., Cuisinier, F.J.G., Decher, G., Schaaf, P., Voegel, J. C. (2001). Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir*, *17*, 7414–7424.
- Prausnitz, J.M., Lichtenthaler, R.N de Azevedo, E.G. (1999). Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria 3<sup>rd</sup> Edition. Prentice-Hall, Inc, New Jersey, pp 9–117, 213–453.
- Rinaudo, M. (2006). Non-covalent interactions in polysaccharide systems. *Macromolecular Bioscience*, *6*, 590–610.
- Rocha-Selmi, G.A., Theodoro, A.C., Thomazini, M., Bolini, H.M.A., Favaro-Trindade, C.S. (2013). Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. *Journal of Food Engineering*, *119*, 28–32.
- Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M., Siezen, R.J. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*, 2873–2878.
- Sanchez, C., Mekhloufi, G., Renard, D. (2006). Complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum: a nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, *299*, 867–873.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *38*, 689–753.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Despond, S., Renard, D., Thomas, F., Hardy, J. (2000). Effect of protein aggregates on the complex coacervation between  $\beta$ -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, *14*, 403–413.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Lamprecht, A., Renard, D., Lehr, C. M., de Kruif, C.G., Hardy, J. (2001). Study of  $\beta$ -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *20*, 267–280.
- Schmitt, C., Turgeon, S.L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, *167*, 63–70.
- Serov, A.V., Antonov, Y.A., Tolstoguzov, V.B. (1985). Isolation of lactic whey proteins in the form of complexes with apple pectin. *Food / Nahrung*, *29*, 19–30.
- Slootweg, J.C., van der Wal, S., Quarles van Ufford, H.C., Breukink, E., Liskamp, R.M.J., Rijkers, D.T.S. (2013). Synthesis, antimicrobial activity, and membrane permeabilizing properties of C-terminally modified nisin conjugates accessed by CuAAC. *Bioconjugate Chemistry*, *24*, 2058–2066.



- Soucie, W.G., Chen, W.S. (1986). Edible xanthan gum-protein fibrous complexes. U.S. Patent application. 4563360.
- Sperber, B.L.H.M., Schols, H.A., Cohen Stuart, M.A., Norde, W., Voragen, A.G.J. (2009). Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, *23*, 765–772.
- Su Cha, D., Choi, J.H., Chinnan, M.S., Park, H.J. (2002). Antimicrobial films based on Na-alginate and  $\kappa$ -carrageenan. *LWT - Food Science and Technology*, *35*, 715–719.
- Thongkaew, C., Gibis, M., Hinrichs, J., Weiss, J. (2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates. *Food Hydrocolloids*, *41*, 103–112.
- Tian, L., Hu, X., Liu, Z., Liu, S. (2016). Studies on the interaction of heparin with lysozyme by multi-spectroscopic techniques and atomic force microscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *154*, 27–32.
- Timilsena, Y.P., Wang, B., Adhikari, R., Adhikari, B. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate–chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, *52*, 554–563.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, *17*, 1–23.
- Tolstoguzov, V.B. (1986). Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. In *Functional Properties of Food Macromolecules*. Elsevier, London, pp 385-415.
- Tolstoguzov, V.B. (1997). Protein-polysaccharide interactions. In *Food Proteins and Their Applications*, Marcel Dekker, Inc, New York, pp 171-198.
- Turgeon, S.L., Beaulieu, M., Schmitt, C., Sanchez, C. (2003). Protein–polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *8*, 401–414.
- Turgeon, S.L., Schmitt, C., Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *12*, 166–178.
- Ueda, T., Masumoto, K., Ishibashi, R., So, T., Imoto, T. (2000). Remarkable thermal stability of doubly intramolecularly cross-linked hen lysozyme. *Protein Engineering Design and Selection*, *13*, 193–196.
- Videcoq, P., Steenkeste, K., Bonnin, E., Garnier, C. (2013). A multi-scale study of enzyme diffusion in macromolecular solutions and physical gels of pectin polysaccharides. *Soft Matter*, *9*, 5110–5118.
- Voragen, A.G.J., Pilnik, W., Thibault, J.F., Axelos, M.A.V., Renard, C.M.G.C. (1995). Pectins. In *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp 287–339.
- Wagoner, T.B., Foegeding, E.A. (2017). Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications. *Food Hydrocolloids*, *63*, 130–138.

- Wan, J., Gordon, J.B., Muirhead, K., Hickey, M.W., Coventry, M.J. (1997). Incorporation of nisin in micro-particles of calcium alginate. *Letters in Applied Microbiology*, *24*, 153–158.
- Wang, L., Cao, Y., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O. (2015). Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between  $\kappa$ -carrageenan and gelatin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *482*, 604–610.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., de Kruif, C.G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum Arabic. *Biomacromolecules*, *4*, 293–303.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., and de Kruif, C.G. (2004a). Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3550–3555.
- Weinbreck, F., Rollema, H.S., Tromp, R.H., de Kruif, C.G. (2004c). Diffusivity of whey protein and gum Arabic in their coacervates. *Langmuir* *20*, 6389–6395.
- Weinbreck, F., Tromp, R.H., de Kruif, C.G. (2004b). Composition and structure of whey protein/gum Arabic coacervates. *Biomacromolecules*, *5*, 1437–1445.
- Xiao, D., Davidson, P.M., Zhong, Q. (2011). Spray-dried zein capsules with coencapsulated nisin and thymol as antimicrobial delivery system for enhanced antilisterial properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 7393–7404.
- Yu, H., Muñoz, E.M., Edens, R.E., Linhardt, R.J. (2005). Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1726*, 168–176.
- Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., McClements, D.J. (2016). Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *Food Hydrocolloids*, *58*, 308–315.
- Zhao, Y., Li, F., Carvajal, M.T., Harris, M.T. (2009). Interactions between bovine serum albumin and alginate: an evaluation of alginate as protein carrier. *Journal of Colloid and Interface Science*, *332*, 345–353.

**Annexe**

# Enrobages comestibles et emballages actifs pour la conservation d'aliments périssables

## présentation et premiers résultats du projet de coopération Franco-Thaïlandaise ActiFoodCoat

Saroat RAWDKUEN<sup>(a)</sup>, Phunsiri SUTHILUK<sup>(a)</sup>, Wirongrong TONGDEESOONTORN<sup>(a)</sup>, Samart SAI-UT<sup>(b)</sup>, Pimonpan KAEWPRACHU<sup>(a)</sup>, Chedia BEN AMARA<sup>(c)</sup>, Lynda BOUARAB-CHIBANE<sup>(c)</sup>, Aurélie LAGORCE-TACHON<sup>(d)</sup>, Adem GHARSALLAOUI<sup>(c)</sup>, Catherine JOLY<sup>(c)</sup>, Nadia OULAHAL<sup>(c)</sup>, Thomas KARBOWIAK<sup>(d)</sup>, Frédéric DEBEAUFORT<sup>(d)</sup>, Pascal DEGRAEVE<sup>(c)</sup>

<sup>(a)</sup> Mae Fah Luang University, School of Agro-Industry, Chiang Rai, Thaïlande

<sup>(b)</sup> Burapha University, Faculty of Science, Department of Food Science and Technology, Chonburi, Thaïlande

<sup>(c)</sup> Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 - ISARA Lyon, laboratoire BioDyMIA (EA n°3733), Bourg en Bresse, France

<sup>(d)</sup> Univ Bourgogne-Franche Comté, Agro Sup Dijon, UMR PAM A 02.102, Dijon, France

Les différentes étapes pour la préparation de films à base de biopolymères contenant des biomolécules antimicrobiennes et/ou antioxydantes applicables pour la conservation d'aliments périssables sont illustrées par les études réalisées par 4 équipes de recherche associées à un programme de coopération Franco-Thaïlandaise. Ces grandes étapes sont : (i) le choix de la formulation des ingrédients entrant dans la composition du film, (ii) les paramètres associés aux procédés d'élaboration des films, (iii) la caractérisation des propriétés physico-chimiques des films et l'évaluation in vitro de leur activité antimicrobienne ou antioxydante et (iv) leur application in situ à des aliments périssables pour en évaluer l'effet sur la durée de vie de ces produits. Les biopolymères filmogènes et les biomolécules actives considérés comprennent des co-produits de l'agriculture Thaïlandaise comme la gélatine préparée à partir de peau de poisson-chat géant ou un extrait de graines de longane ayant un pouvoir antioxydant avéré.

### ABSTRACT

The different steps leading to the preparation of biopolymer-based films incorporated with antimicrobial and/or antioxidant biomolecules which can be applied to the preservation of perishable foods are illustrated by the studies performed by 4 research groups associated within a Franco-Thai cooperation program. The major steps are: (i) the choice of the formulation of film-forming ingredients, (ii) the processing conditions used to make films, (iii) the characterization of the physico-chemical properties of films and the in vitro assay of their antimicrobial and/or antioxidant activities, and (iv) the in situ application of these films to perishable foods to assess their impact on their shelf-life. The film-forming biopolymers and active biomolecules considered include Thai agricultural by-products such as gelatin prepared from giant catfish skin or antioxidant longan seed extract, respectively.

### POURQUOI UNE COLLABORATION FRANCO-THAÏLANDAISE SUR LES ENROBAGES COMESTIBLES ET LES EMBALLAGES ACTIFS ?

De nombreux biopolymères présentent des propriétés filmogènes qui peuvent être exploitées pour enrober des aliments par dépôt d'une solution filmogène à leur surface ou pour élaborer des films pour des applications en contact alimentaire. Les enrobages ou films ainsi obtenus peuvent remplir certaines des fonctions traditionnelles d'un film d'emballage plastique telles que des propriétés de résistance mécanique, de barrière aux gaz, à l'eau ou aux matières grasses ou encore pour améliorer la présentation de l'aliment conditionné. Pour la conservation de produits rapidement périssables tels que poissons, fruits de mer, viandes, produits de 4<sup>ème</sup> gamme, produits élaborés prêts à consommer, disposer d'enrobages ou de films jouant un rôle actif et ainsi capables de ralentir efficacement les altérations microbiennes ou chimiques de ces produits permettrait

d'en allonger la durée de vie. C'est dans cet objectif qu'à vu le jour un programme de collaboration Franco-Thaïlandais rassemblant 4 équipes déjà fortement engagées dans ce domaine de recherche. Les compétences développées sont illustrées par des travaux de ces 4 équipes et par les premiers fruits de cette collaboration dans le domaine des films actifs antimicrobiens et/ou antioxydants à base de biopolymères pour la conservation des aliments rassemblés au niveau du Tableau 1.

Les étapes qui se succèdent pour élaborer des films actifs à base de biopolymères naturels contenant des antioxydants ou des antimicrobiens sont présentées au niveau de la Figure 1.

1) Choix de la formulation : biopolymère filmogène, plastifiant, composés antimicrobiens et/ou antioxydants et éventuellement agents de réticulation
2) Elaboration des films : voie solvant (« casting ») ou fondue (extrusion-gonflage) possibilité de réticulation pendant (exemple : réticulation enzymatique de protéines par la transglutaminase) ou après l'élaboration (exemple : irradiation par faisceaux d'électrons)
3) Caractérisation des films : - Evaluation des propriétés mécaniques, thermiques (DSC, TGA), barrières aux gaz (vapeur d'eau, O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> ) dans des conditions de température et d'humidité relative définies, solubilité dans l'eau, propriétés de surface (mesure d'angle de contact d'une goutte de liquide avec un goniomètre) - Evaluation de l'activité antimicrobienne et/ou antioxydante in vitro
4) Essais d'application in situ des films pour la conservation d'un aliment réel (ou modèle)

**Figure 1 : Etapes se succédant pour élaborer des films actifs antioxydants ou antimicrobiens à base de biopolymères.**

## DOSSIER

Biopolymères filmogènes	Etude réalisée	Références correspondantes
<b>Protéines</b>		
gélatine bovine ou de poisson	Comparaison des propriétés physico-chimiques de films à base de gélatine d'os bovin ou de peau de poisson chat géant ( <i>Pangasianodon gigas</i> )	Rawdkuen et al. (2010)
	Impact de l'irradiation par faisceau d'électrons sur les propriétés de films à base de gélatine de poisson	Benbettaieb et al. (2015)
	Comparaison de l'activité antioxydante de films de gélatine avec de l'extrait de graines de longane ou du BHT (butylhydroxytoluène) : application à la conservation de l'huile de soja	Vichalsip et al. (2014)
	Application de films de gélatine bovine réticulés par la transglutaminase contenant de la catéchine et du lysozyme à la conservation de viande hachée de porc	Kaewprachu et al. (2015)
protéines myofibrillaires de poisson	Caractérisation physico-chimique des films	Kaewprachu et al. (2016)
isolat de protéines de lactosérum	Caractérisation physico-chimique de films à base de mélange d'amidon de blé et de protéines sériques laitières	Basiak et al. (2017)
caséinates	Activité antimicrobienne de films de caséinates élaborés par extrusion-gonflage contenant du lysozyme, de la nisine ou de la natamycine	Colak et al. (2015, 2016)
	Caractéristiques physico-chimiques de films à base de pectines LM et de caséinate de sodium	Eghbal et al. (2016, 2017)
<b>Polyosides</b>		
chitosane	Propriétés, morphologie et activité antioxydante de films composites de chitosane avec de la lignine	Crouvisier-Urien et al. (2017)
amidon de blé	Caractéristiques physico-chimiques de films à base d'amidon de blé et de protéines sériques laitières	Basiak et al. (2017)
alginate	Activité antimicrobienne et caractéristiques physico-chimiques de films d'alginate contenant du lysozyme	Ben Amara et al. (2016)
pectines faiblement méthylées (LM)	Activité antimicrobienne et caractéristiques physico-chimiques de films de pectines LM contenant du lysozyme	Bayarri et al. (2014)
	Caractéristiques physico-chimiques de films à base de pectines LM et de caséinate de sodium	Eghbal et al. (2016, 2017)

**Tableau 1 : Exemples d'études concernant l'élaboration, la caractérisation et l'application de films à base de biopolymères.**

Comme indiqué dans le tableau 1, les biopolymères employés pour élaborer des enrobages ou des films comestibles sont notamment des protéines ou des polyosides, de préférence issus de co-produits ou de déchets des industries agricoles et alimentaires. Ces polymères hydrophiles ont de ce fait des propriétés très variables en fonction de l'humidité de l'atmosphère environnante. Leurs propriétés barrières à la vapeur d'eau s'avèrent généralement très limitées comparativement à celles de films plastiques de même épaisseur. Pour les applications en contact direct avec des aliments périssables riches en eau, comme la viande ou le poisson, le gonflement et la solubilisation des films à base de biopolymères peuvent s'avérer excessifs et conduire à leur déstructuration. La diminution de l'hydrosolubilité de ces films est une des motivations de leur réticulation par différents moyens tels que la réticulation enzymatique de films protéiques par une transglutaminase microbienne. Cette étape se déroule alors dans la suspension filmogène avant l'évaporation du solvant. Une autre voie également testée avec de la gélatine de poisson consiste à ajouter des composés phénoliques tels que la catéchine (Rawdkuen et al., 2012). Enfin, un traitement de films à base de gélatine de poisson par irradiation par

un faisceau d'électrons (60 kGy) a permis d'augmenter de 30% leur résistance mécanique à la traction (Benbettaieb et al., 2016).

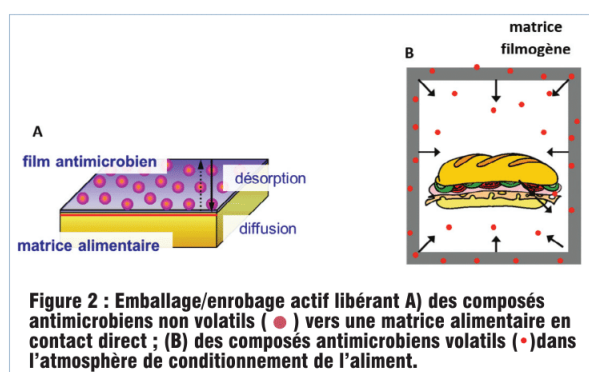
#### DES PROPRIÉTÉS DES FILMS DÉPENDANTES DU COUPLE FORMULATION - PROCÉDÉ D'ÉLABORATION

Les propriétés des films élaborés sont intimement dépendantes à la fois de la formulation choisie (voir Tableau 1) mais également du procédé d'élaboration des films. Ces deux facteurs conditionnent notamment les interactions qui s'établissent entre les biopolymères employés, les plastifiants (de façon classique le glycérol et l'eau selon l'humidité de l'atmosphère de conditionnement des films) et les composés antioxydants ou antimicrobiens employés dans le cas des films actifs. Il est aussi possible de mélanger en proportions variables des biopolymères qui peuvent s'avérer miscibles ou immiscibles suivant leurs natures respectives et les conditions environnementales. Mélanger des polymères permet ainsi de moduler les propriétés d'usage des films obtenus, comme illustré pour les propriétés de surface de films à base de mélanges d'amidon de blé et de protéines de lactosérum (Basiak et al., 2017) ou encore pour les propriétés de résistance mécanique à la traction de films à base de mélanges de

pectines faiblement méthylées et de caséinate de sodium (Eghbal et al., 2016, 2017). La possibilité de disperser de la lignine qui est un polymère non filmogène dans une matrice filmogène de chitosane en recourant à un pré-traitement d'homogénéisation de la suspension filmogène pour obtenir des films présentant une activité antioxydante est particulièrement intéressante : en effet, un des intérêts de la lignine par rapport à d'autres antioxydants réside dans son faible coût (Crouvisier-Urien et al., 2016, 2017).

La libération contrôlée des composés actifs : une problématique clé pour les films actifs

L'activité de nombreux enrobages ou films actifs intégrant des composés antioxydants ou antimicrobiens repose sur la libération de ces composés bio-actifs des films vers la surface des aliments en contact direct ou vers l'atmosphère de conditionnement des aliments dans le cas où ces composés sont volatils (Figure 2). Kurek et al. (2013, 2014) ont ainsi développé une formulation à base de chitosane incorporant du carvacrol dont la cinétique de libération est accélérée aux fortes humidités de l'atmosphère de conditionnement. L'intérêt réside dans le fait que ces conditions sont aussi celles favorables au développement microbien. Les concentrations minimales en carvacrol dans l'atmosphère de conditionnement pour inhiber le développement de micro-organismes indésirables ont été déterminées et ont servi de base au dimensionnement d'emballages actifs incorporant ce composé volatil antimicrobien.



**Figure 2 : Emballage/enrobage actif libérant A) des composés antimicrobiens non volatils (●) vers une matrice alimentaire en contact direct ; B) des composés antimicrobiens volatils (●) dans l'atmosphère de conditionnement de l'aliment.**

Un facteur clé pour l'efficacité de tels systèmes pour ralentir les altérations des aliments réside alors dans le contrôle de la cinétique de libération de ces composés vers la surface des aliments périssables pour qu'une concentration efficace y soit maintenue durablement. Apporter ces composés par l'intermédiaire d'enrobages ou de films actifs permet, par rapport à une incorporation directe dans la masse de l'aliment, de les apporter précisément à la surface des aliments où les altérations oxydatives et microbiennes sont généralement les plus rapides. La cinétique de libération des composés actifs incorporés dans les films peut dépendre des interactions qui s'établissent entre ces composés et les polymères dans lesquels ils sont incorporés : des films à base de polymères anioniques (alginate de sodium ou pectines faiblement méthylées) ont ainsi permis une libération progressive du lysozyme qui présente au contraire une charge positive élevée à pH neutre (Bayarri et al., 2014 ; Ben Amara et al., 2016). La cinétique de libération de ces composés dépend aussi de phénomènes de transport de type diffusionnel, l'épaisseur et la tortuosité des films étant alors des facteurs décisifs. Dans le cas des films émetteurs de composés actifs, la réticulation du réseau polymérique pour améliorer les propriétés mécaniques et barrière des films peut s'avérer positive si l'objectif est de ralentir la cinétique de libération d'un composé ou négative si ce ralentissement est excessif.

## LES FILMS ACTIFS À BASE DE BIOPOLYMÈRES : UNE VOIE DE VALORISATION DE CO-PRODUITS DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE

Les composés antioxydants incorporés dans des films sont des composés phénoliques purs tels que la catéchine (Kaewprachu et al., 2015), le tyrosol ou l'acide férulique (Benbettaieb et al., 2016), des extraits végétaux riches en polyphénols tels que l'extrait de pépins de longane (Vichasilp et al., 2014) ou encore de la lignine (Crouvisier-Urien et al., 2017). Les composés antimicrobiens employés sont des conservateurs naturels tels que la natamycine, la nisine ou le lysozyme ou des biopolymères antifongiques comme le chitosane. Notons que certains composés phénoliques comme la catéchine présentent à la fois une activité antioxydante et antimicrobienne. Comme l'illustre cette liste de composés actifs et celle des biopolymères présentée dans le Tableau 1, des films ou enrobages comestibles actifs peuvent être élaborés à partir de co-produits de l'agriculture ou de la pêche. Cette collaboration Franco-Thaïlandaise est ainsi l'occasion d'évaluer les potentialités d'exploitation des propriétés filmogènes de co-produits de la pêche tels que la gélatine préparée à partir de poisson-chat géant ou de protéines myofibrillaires de poisson ou encore des propriétés antimicrobiennes ou antioxydantes d'extraits végétaux tels que l'extrait de pépins de longane.

## LA STABILITÉ LIMITÉE DE BIOMOLÉCULES ANTIMICROBIENNES OU ANTIOXYDANTES : UN VERROU TECHNOLOGIQUE POUR LEUR INCORPORATION DANS DES FILMS ÉLABORÉS PAR VOIE FONDUE ?

Dans le cas où les films actifs sont élaborés par voie fondue, la stabilité limitée de nombreuses biomolécules antimicrobiennes ou antioxydantes dans les conditions de température et de cisaillement élevées présentes lors des étapes d'extrusion-gonflage, classiquement employées industriellement pour élaborer des films pour le conditionnement des produits alimentaires, peut constituer un verrou technologique. Un choix judicieux de formulation avec une teneur suffisante en glycérol et une quantité limitée d'eau a cependant permis d'obtenir des films de caséinates dans lesquels l'activité enzymatique du lysozyme ajouté est préservée (Colak et al., 2015). Ces mêmes conditions ont également permis de préserver l'activité de la nisine et de la natamycine dans de tels films (Colak et al., 2016).

## EXEMPLES D'APPLICATION IN SITU DES FILMS ACTIFS

Une fois que les films avec les propriétés requises sont obtenus, il convient de tester leur potentiel en les appliquant à la conservation des aliments. Deux exemples d'application de films actifs à base de gélatine ont ainsi été rapportés par nos collègues thaïlandais :

- l'utilisation de films de gélatine contenant 500 ppm (m/m) d'extrait de pépins de longane pour conditionner de l'huile de soja a ainsi permis de ralentir son oxydation et par conséquent de prolonger sa durée de conservation de manière significative (Vichasilp et al., 2014)
- des films à base de gélatine bovine réticulés par une transglutaminase microbienne contenant du lysozyme et de la catéchine ont été employés pour sceller des barquettes contenant de la viande de porc crue et hachée. Le suivi pendant 7 jours d'indicateurs de la qualité de cette viande de porc (flore totale, exsudation, couleur, oxydation des matières grasses) à 4°C conditionnée soit dans un film de PVC, soit dans un film/enrobage de gélatine avec de la catéchine ou du lysozyme a permis de mettre en évidence un allongement de sa durée de conservation de plusieurs jours.

## DOSSIER

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de l'élaboration de films à base de biopolymères libérant des composés actifs antimicrobiens ou antioxydants, les interactions qui s'établissent entre l'ensemble des constituants des films élaborés constituent un paramètre clé. En effet, l'ensemble de ces interactions conditionne la structure des films, leurs propriétés mécaniques, barrières à différents gaz mais aussi et surtout dans le cadre des applications envisagées les cinétiques de libération vers les aliments conditionnés des actifs qui y sont incorporés. L'étude de ces interactions est donc la première motivation de cette collaboration scientifique franco-thaïlandaise. Il s'agit aussi d'évaluer le potentiel d'exploitation de nouveaux biopolymères et de nouveaux extraits ou biomolécules à action antioxydante ou antimicrobienne en effectuant des tests in situ de conservation d'aliments périssables tels que de la viande ou des produits de la mer frais ou encore des fruits tranchés. La conservation de produits thaïlandais tels que de l'ananas ou de la mangue par des enrobages comestibles à base de co-produits de l'agriculture thaïlandaise est ainsi notamment considérée en complément de la poursuite des travaux sur la conservation de produits d'origine animale à forte valeur ajoutée. Sur un plan réglementaire, les travaux portent prioritairement sur la réalisation de films d'enrobage ou d'emballage actifs comestibles ce qui implique qu'ils soient exclusivement constitués d'ingrédients ou d'additifs alimentaires. La possibilité d'élaborer des « matériaux ou objets actifs destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et conçus de manière délibérée pour contenir des constituants « actifs » destinés à être libérés dans les denrées alimentaires » au sens des règlements de l'Union Européenne CE no. 1935/2004 et CE no. 450/2009 est également évaluée : la migration spécifique et contrôlée d'additifs alimentaires ayant un statut de conservateur ou d'antioxygène vers les aliments ou des simulants est alors notamment considérée (Khalil *et al.*, 2013, 2014). L'utilisation de biopolymères naturels et d'extraits naturels ne présentant pas de limite de toxicité, ou pouvant être utilisés à haute dose dans les aliments permettrait de limiter les risques consommateurs en comparaison de certaines substances chimiques (et coûteuses) classiquement ajoutées dans les aliments et dans les matériaux d'emballage.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Bureau de la Commission pour l'Education Supérieure du Ministère de l'Education thaïlandais (Office of Higher Education Commission, OHEC, Thaïlande), le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (MENESR), Campus France, le Ministère des Affaires Étrangères et du Développement international (MAEDI) (Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France en Thaïlande à Bangkok) pour le soutien apporté au Programme Hubert Curien (PHC) Franco-Thaïlandais Siam « ActiFood Coat ».

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Basiak E, Lenart A, Debeaufort F (2017). Effects of carbohydrate/protein ratio on the microstructure and the barrier and sorption properties of wheat starch-whey protein blend edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 858–867.

Bayarri M, Oulahal N, Degraeve P, Gharsallaoui A (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, 131, 18–25.

Ben Amara C, Eghbal N, Oulahal N, Degraeve P, Gharsallaoui A (2016). Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films. *Food Research International*, 89, 272–280.

Benbettaieb N, Karbowski T, Brachais CH, Frederic Debeaufort F (2016). Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Food Chemistry*, 195, 11–18.

Benbettaieb N, Assifaoui A, Karbowski T, Debeaufort F, Chambin O (2016). Controlled release of tyrosol and ferulic acid encapsulated in chitosan-gelatin films after electron beam irradiation. *Radiation Physics*

and Chemistry, 118, 81–86.

Colak BY, Peynichou P, Galland S, Oulahal N, Assezat G, Prochazka F, Degraeve P (2015). Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability. *Industrial Crops and Products*, 72, 142–151.

Colak BY, Peynichou P, Galland S, Oulahal N, Prochazka F, Degraeve P (2016). Antimicrobial activity of nisin and natamycin incorporated sodium caseinate extrusion-blown films: a comparative study with heat-pressed/solution cast films. *Journal of Food Science*, 81, E-1141-E-1150.

Crouvisier-Urien K, Bodart P, Winckler P, Raya J, Gougeon R, Cayot P, Domenek S, Debeaufort F, Karbowski T (2016). Bio-based composite films from chitosan and lignin: antioxidant activity related to structure and moisture. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4, 6371–6381.

Crouvisier-Urien K, Lagorce-Tachon A, Lauquin C, Winckler P, Tongdeesontorn W, Domenek S, Debeaufort F, Karbowski T (sous presse). Impact of the homogenization process on the structure and antioxidant properties of chitosan-lignin composite films. *Food Chemistry*, DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.094

Eghbal N, Yarmand M. S., Degraeve P, Oulahal N., Gharsallaoui A. (2016). Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate. *Carbohydrate Polymers*, 151, 947–956.

Eghbal N, Degraeve P, Oulahal N., Yarmand M.S., Mousavi M.E., Gharsallaoui A. (2017). Low methoxyl pectin/sodium caseinate interactions and composite film formation at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 69, 132–140.

Kaewprachu P, Osako K, Benjakul S, Rawdkuen S (2016). Effect of protein concentrations on the properties of fish myofibrillar protein based film compared with PVC film. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 2083–2091.

Kaewprachu P, Osako K, Benjakul S, Rawdkuen S (2015). Quality attributes of minced pork wrapped with catechin-lysozyme incorporated gelatin film. *Food Packaging and Shelf Life*, 3, 88–96.

Khalil F, Galland S, Cottaz A, Degraeve P, Joly C (2013). Intérêts des systèmes multiphasés pour l'élaboration d'emballages actifs à libération contrôlée. *Industries Alimentaires et Agricoles*, Novembre/Décembre, 18–20.

Khalil F, Galland S, Cottaz A, Joly C, Degraeve P (2014). Polybutylene succinate adipate/starch blends: A morphological study for the design of controlled release films. *Carbohydrate Polymers*, 108, 272–280.

Kurek M, Moundanga S, Favier C, Galic K, Debeaufort F (2013). Antimicrobial efficiency of carvacrol vapour related to mass partition coefficient when incorporated in chitosan-based films aimed for active packaging. *Food Control*, 32, 168–175.

Kurek M, Guinault A, Voilley A, Galic K, Debeaufort F (2014). Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan-based films and coatings. *Food Chem*, 144, 9–17.

Rawdkuen S, Sai-Ut S, Benjakul S (2010). Properties of gelatin films from giant catfish skin and bovine bone: a comparative study.

Rawdkuen S, Suthiluk P, Kamhangwong D, Benjakul S (2012). Mechanical, physico-chemical, and antimicrobial properties of gelatin-based film incorporated with catechin-lysozyme. *Chemistry Central Journal*, 6, 131.

Règlement CE n°1935/2004 du parlement européen et du conseil du 27 octobre 2004 concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE.

Règlement CE n°450/2009 du 29 mai 2009 concernant les matériaux et objets actifs et intelligents destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.

Sai-Ut S, Benjakul S, Kraithong S, Rawdkuen S (2015). Optimization of antioxidants and tyrosinase inhibitory activity in mango peels using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 742–749.

Vichasilp C, Samart Sai-Ut S, Benjakul S, Rawdkuen S (2014). Effect of longan seed extract and BHT on physical and chemical properties of gelatin based film. *Food Biophysics*, 9, 238–248.

## Résumé

---

### **Etude des interactions polysaccharides – biomolécules antimicrobiennes de nature protéique : application à l'élaboration de microcapsules et de films actifs pour la conservation des aliments**

---

Ce travail porte sur le développement de systèmes d'encapsulation à base de polysaccharides et de molécules antimicrobiennes de nature protéique comme le lysozyme du blanc d'œuf et la nisine produite par la bactérie *Lactococcus lactis*. La coacervation complexe de l'alginate ou la pectine (deux polysaccharides anioniques) avec le lysozyme ou la nisine, chargés positivement sur une large gamme de pH, serait une solution pour protéger ces molécules et assurer une libération contrôlée lors de la conservation d'un aliment. Les polysaccharides utilisés ont été choisis en fonction de leur sensibilité aux enzymes produites par les bactéries cibles. L'ensemble des travaux menés à différentes échelles a mis en évidence (i) le rôle de certains facteurs physico-chimiques (ratio, pH, force ionique,...) sur les interactions mises en jeu entre le lysozyme ou la nisine et l'alginate ou la pectine, (ii) l'influence de ces facteurs sur les propriétés des complexes formés et (iii) le rôle des polysaccharides sélectionnés dans la stabilisation de la structure du lysozyme ou de la nisine lors du séchage par atomisation. Enfin, la structure et l'activité antimicrobienne des films obtenus par voie solvant (casting) et des microcapsules obtenues par atomisation sont étudiées en relation avec les propriétés des complexes formés. Ce travail a permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des complexes peptides/polysaccharides ou protéines/polysaccharides, leur résistance au séchage par atomisation ainsi que leur capacité à protéger et à libérer des molécules actives.

**Mots-clés** : Coacervation, alginate, pectine, lysozyme, nisine, microencapsulation, interactions.



## Abstract

---

### **Study of the interactions polysaccharides - antimicrobial biomolecules of protein nature: application to the development of microcapsules and active films for food preservation**

---

This work deals with the development of encapsulation systems based on polysaccharides and antimicrobial molecules of protein nature such as hen egg-white lysozyme and nisin produced by *Lactococcus lactis*. Complex coacervation of alginate or pectin (two anionic polysaccharides) with lysozyme or nisin, positively charged over a wide range of pH, would be a solution to protect these molecules and ensure their controlled release during food preservation. The used polysaccharides were chosen according to their sensitivity to the enzymes produced by the targeted bacteria. The whole of this work performed at various levels showed **(i)** the impact of some physicochemical factors (ratio, pH, ionic strength,...) on the interactions between lysozyme or nisin and alginate or pectin, **(ii)** the influence of these factors on the properties of the formed complexes, and **(iii)** the role of the selected polysaccharides in stabilizing the structure of lysozyme or nisin during spray-drying. Finally, the structure and the antimicrobial activity of films produced by casting and microcapsules obtained by spray-drying were studied in relation to the properties of the formed complexes. This work makes it possible to contribute to a better understanding of the various mechanisms implied in the formation of peptide/polysaccharide or protein/polysaccharide complexes, their resistance to spray-drying and their ability to protect and release active molecules.

**Keywords:** Coacervation, alginate, pectin, lysozyme, nisin, microencapsulation, interactions.