



Etude de la coacervation complexe de biopolymères d'origine végétale pour l'élaboration de systèmes d'encapsulation à libération contrôlée d'actifs lipophiles

Jérémy Carpentier

► To cite this version:

Jérémy Carpentier. Etude de la coacervation complexe de biopolymères d'origine végétale pour l'élaboration de systèmes d'encapsulation à libération contrôlée d'actifs lipophiles. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2021. Français. ⟨NNT : 2021LAROS011⟩. ⟨tel-04149371⟩

HAL Id: tel-04149371

<https://theses.hal.science/tel-04149371v1>

Submitted on 3 Jul 2023

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.



HAL Authorization



LA ROCHELLE UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE
EUCLIDE

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS-ULR
Equipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS)

THESE CONFIDENTIELLE

Présentée par :

Jérémy CARPENTIER

Soutenance réalisée le 23 Juin 2021

Pour l'obtention du grade de Docteur de La Rochelle Université
Discipline : Valorisation chimique et biologique des agroressources.

**Etude de la coacervation complexe de biopolymères d'origine végétale pour
l'élaboration de systèmes d'encapsulation à libération contrôlée d'actifs
lipophiles**

JURY :

Mr DEGRAEVE Pascal
Mr LE CERF Didier
Mme ARNAUDIN-FRUITIER Ingrid
Mr DHULSTER Pascal
Mr PICOT Arnaud
Mr VENDEVILLE Jean-Eudes
Mme CHAIGNEAU Carine
Mr MAUGARD Thierry

Professeur, Université de Lyon 1, Rapporteur
Professeur Université de Rouen Normandie, Rapporteur
Professeure, La Rochelle Université, Examinatrice
Professeur, Université de Lille 1, Examineur, Président du jury
Directeur de CAPSULAE, Invité
Directeur Scientifique d'IDCAPS, Encadrant scientifique
Chef de projet R&D d'IDCAPS, Encadrante scientifique
Professeur, La Rochelle Université, Directeur de thèse

*A mon père,
A ma mère et mon frère*

Contribution scientifique

En lien direct avec ce travail

Carpentier J., Conforto E., Chaigneau C., Vendeville J.-E., Maugard T., 2020. Complex coacervation of pea protein isolate and tragacanth gum: comparative study with commercial polysaccharides. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *article accepté en février 2021*.

Carpentier J., Vendeville J., Chaigneau C., Maugard T., 2019. Elaboration de systèmes d'encapsulation pH dépendant à libération contrôlée d'actifs à partir de biopolymères naturels d'origine végétale terrestre ou marine. Colloque des doctorants, 2019, La Rochelle, France. *Affichage poster et communication orale*.

Remerciements

Les travaux de recherche décrits dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire LIENSs (Littoral, Environnement et Sociétés) UMR 7266 CNRS-ULR de l'Université de la Rochelle au sein de l'équipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS) en collaboration avec la société INNOV'IA et sa filiale R&D, IDCAPS.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr **Alain GRIZEAU**, Directeur de la société INNOV'IA, de m'avoir accueilli au sein de son entreprise et, sans qui les travaux présentés n'auraient été possibles sans son soutien financier.

Je remercie Mr **Olivier DE VIRON** pour m'avoir accueilli au sein de la structure du laboratoire LIENSs UMR 7266 CNRS-ULR au sein de l'équipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS).

J'adresse mes plus sincères remerciements au Pr **Thierry Maugard**, mon directeur de thèse, pour son soutien, sa rigueur scientifique, son accessibilité et sa disponibilité tout au long du projet.

Un grand merci également à Mr **Jean-Eudes Vendeville**, directeur scientifique d'IDCAPS et co-encadrant de thèse, de m'avoir guidé dans ce projet. Ce fut un plaisir de collaborer avec vous tant par le partage de votre expérience, que votre rigueur et vos conseils dans mon évolution au sein de l'entreprise.

J'adresse mes remerciements au Pr **Pascal Degraeve** et au Pr **Didier Le Cerf** d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et membres du jury de thèse.

Je remercie également les Professeurs **Ingrid Arnaudin** et **Pascal Dhulster**, le Dr **Arnaud Picot**, directeur de Capsulae (Nantes), de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Un grand merci aux membres de l'équipe R&D d'IDCAPS pour leur participation à ce travail, à ma formation ou en participant activement à mon intégration au sein de cette équipe chaleureuse. Ce fut une joie que faire partie de votre équipe et une formidable expérience.

Je remercie chaleureusement **Carine**, d'avoir co-encadré cette thèse, de m'avoir accompagné depuis mon arrivée au sein de l'entreprise IDCAPS. Je te remercie tout particulièrement pour

ton accueil et ton aide chaleureuse à mon intégration dans l'équipe et tes conseils très avisés dans ma formation aux outils pilotes. Tes enseignements me confortent dans mon envie de progresser dans la carrière de recherche et développement.

Merci également à **Sébastien** et **Julien** de m'avoir montré l'exemple de par votre professionnalisme et la passion que vous mettez dans vos projets. Votre dynamisme et votre humour ont su me motiver au cours de ces quatre dernières années passées avec vous.

Un grand merci à **Marion, Jean-René** et **Dylan** pour votre participation active à ce projet de thèse. Votre collaboration et votre bonne humeur m'ont permis d'avancer dans ce projet et d'apprécier les joies du travail d'équipe ! Une attention particulière à toi, Marion, binôme de projets avec qui j'ai eu le plus de fou-rires. Merci également à **Bastien, Cécile** et **Delphine**, pour tout ce que vous avez partagé avec moi, tant professionnellement qu'humainement. Une petite pensée pour toutes ces parties de ballon porté jouées avec toute cette fine équipe au cours des pauses déjeuner.

Un gros merci à **Dominique** (Tonton Dom') pour m'avoir partagé ton expérience sur le métier (notamment pour ton intuition exceptionnelle pour le séchage d'une solution), ta rigueur, ta passion et ton humour légendaire ! Tes blagues et ta bonne humeur garantissaient de passer des journées à IDCAPS avec le sourire.

A toi, **Nicolas**, mes vifs et sincères remerciements de la part de ton ancien stagiaire. Malgré ton départ au cours de ma thèse, ce fut un réel plaisir d'avoir travaillé avec toi. Tu as été d'un grand soutien, autant scientifiquement qu'humainement.

Je remercie également les personnes arrivées récemment dans l'équipe : **Luc, Vincent, Amélie**. Bien que vous soyez arrivés à la fin de ma collaboration avec IDCAPS, je vous remercie pour votre sympathie et votre dynamisme au cours de nos rencontres furtives.

Je remercie également tous les membres de l'équipe BCBS du laboratoire LIENSs.

Merci notamment à mes collègues doctorants : **Rémi, Claire, Justine, Sabrina, Raymundo**, mais également mes collègues de laboratoire **Valérie, Laurent** et **Pierre-Edouard** pour la bonne ambiance apportée dans ce laboratoire.

Un grand merci à mes colocataires de bureau : **Quentin, Oussama et Mahéva**, sans qui l'ambiance ne serait sans doute pas la même dans ce bureau ! Vous avez été d'un soutien énorme pendant ces périodes de stress. Sans oublier le grand **Hugo Groult**, la famille Bonnet Fraise (**Antoine, Elodie** et maintenant **Martin** !), **Pascaline** et **Julia** qui ont su m'épauler dans les pires moments comme dans les meilleurs. Je ne saurais comment montrer toute ma gratitude à tout ce groupe devenu certainement plus que des collègues de travail.

Je remercie chaleureusement Dr **Egle Conforto** du laboratoire LASIE, pour m'avoir consacré tout son temps et sa bonne humeur à ma formation au microscope électronique à balayage.

Je remercie vivement tout le personnel administratif du laboratoire LIENSs : **Viviane Biou, Marie Chivaille, Laetitia Darre, Johan Guiard**, et **Catherine Courtel** qui ont facilité toutes les tâches administratives et ont su répondre instantanément à mes besoins avec bonne humeur. Je remercie également les différents membres de l'école doctorale, en particulier **Isabelle Hirsch** et **Jennifer De La Corte Gomez** pour leur accueil chaleureux.

J'adresse également mes remerciements aux stagiaires ayant contribué de près ou de loin au projet de thèse : **Mathilde Coulais, Marine Reyrolle** et **Dylan Ben Hadj**.

Mes sentiments les plus forts vont bien sûr à ma famille. Je remercie mon père, ma mère et mon frère d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu ces dernières années malgré l'incompréhension de mes recherches. Je leur suis reconnaissant pour leur écoute, leurs encouragements et leur patience. Merci à vous d'avoir été des piliers pour moi.

Table des matières

Contribution scientifique	5
Remerciements.....	7
Liste des figures	15
Liste des tableaux	18
Liste des abréviations et des unités	19
Introduction générale	22
Etude bibliographique.....	28
1. Etat des connaissances sur les différentes techniques de microencapsulation	28
1.1. <i>Les techniques d'encapsulation</i>	29
1.1.1. Les procédés mécaniques.....	30
1.1.1.1. Emulsion / Homogénéisation	30
1.1.1.2. Le séchage par atomisation (Spray-drying)	33
1.1.1.3. Spray cooling/chilling / Prilling	35
1.1.1.4. Gélification de gouttes.....	36
1.1.1.5. Lyophilisation (freeze drying)	37
1.1.1.6. Extrusion / Co-extrusion	38
1.1.1.7. Enrobage en lit d'air fluidisé	39
1.1.1.8. Séchage par des fluides supercritiques	40
1.1.2. Les procédés chimiques.....	41
1.1.3. Les procédés physico-chimiques	42
1.1.3.1. Inclusion moléculaire	42
1.1.3.2. L'évaporation de solvant	43
1.1.3.3. Les hydrogels	44
1.1.3.4. Les liposomes.....	44
1.1.3.5. La coacervation (simple et complexe)	45
1.2. <i>Etat des connaissances sur la coacervation complexe.....</i>	46
1.2.1. Diagramme de phases	46
1.2.2. Modèles théoriques de la coacervation complexe	48
1.2.3. Influence des paramètres sur la coacervation complexe.....	49
1.2.4. La coacervation complexe appliquée à la microencapsulation.....	55
1.2.4.1. Paramètres influençant les propriétés des capsules de coacervats complexes.....	56
1.2.4.2. Le rôle de la réticulation dans le procédé de coacervation complexe	59
1.2.4.3. Le séchage de coacervats complexes	60
1.2.4.4. Avantages et limites de la technique.....	61
2. Biopolymères végétaux pour l'encapsulation d'un actif lipophile : l' α -tocophérol	62
2.1. <i>Les biopolymères aux propriétés encapsulantes.....</i>	62
2.1.1. Protéines de pois	62
2.1.2. Les gommes naturelles et polysaccharides	70

2.1.2.1.	Alginate de sodium	71
2.1.2.2.	Gomme arabique	72
2.1.2.3.	Gomme tara	74
2.1.2.4.	Gomme adragante	74
2.2.	<i>La vitamine E en tant qu'actif lipophile</i>	76
3.	Application des microcapsules pour la libération contrôlée d'actifs par voie orale	81
3.1.	<i>Parcours digestif d'un principe actif chez les monogastriques</i>	81
3.1.1.	La digestion buccale	81
3.1.2.	La digestion gastrique.....	82
3.1.3.	La digestion entérique	82
3.1.4.	Absorption intestinale d'actifs encapsulés.....	84
3.2.	<i>Mécanismes de libération d'un principe actif</i>	89
3.2.1.	Mécanismes de libération	89
3.2.2.	Les systèmes de libération	91
3.2.3.	Polymères stimuli-sensibles	94
4.	Conclusion	96
Chapitre 1 : Etude comparative de l'interaction entre les protéines de pois et différents polysaccharides		100
1.	Introduction.....	104
2.	Material and methods.....	107
2.1.	<i>Materials and chemicals</i>	107
2.2.	<i>Preparation of complex coacervates and turbidimetric acid pH titration</i>	107
2.3.	<i>Turbidimetric analysis</i>	107
2.4.	<i>Protein solubility determination</i>	108
2.5.	<i>Electrophoretic mobility</i>	108
2.6.	<i>Coacervation yield of concentrated mixtures</i>	109
2.7.	<i>Preparation of particles</i>	110
2.8.	<i>Fourier transformation infrared (FTIR) spectroscopy study</i>	110
2.9.	<i>ESEM morphological observations</i>	110
2.10.	<i>Statistical analysis</i>	111
3.	Results and discussion.....	111
3.1.	<i>Investigation of the protein-polysaccharide interaction by optical density measurement</i>	111
3.2.	<i>Zeta potential</i>	114
3.3.	<i>Pea protein solubility</i>	119
3.4.	<i>Coacervation yield of concentrated mixtures</i>	121
3.5.	<i>FTIR analysis</i>	123
3.6.	<i>ESEM observations</i>	125
4.	Conclusion	127
5.	References.....	129
6.	Supplementary data	133

Chapitre 2 : Influence de la coacervation complexe sur le comportement des microsphères	138
1. Introduction / enjeux	138
2. Matériel et méthodes	140
2.1. Matériel	140
2.1.1. Matières appliquées à l'encapsulation	140
2.1.2. La matière active encapsulée	140
2.1.3. Les produits chimiques	141
2.2. Méthodes	141
2.2.1. Formulation des microsphères	141
2.2.2. Séchage par atomisation	143
2.2.3. Analyse granulométrique	144
2.2.3.1. Voie liquide – analyse des émulsions	144
2.2.3.2. Voie sèche – analyse des microparticules	144
2.2.4. Mesure de la viscosité apparente	144
2.2.5. Mesure du taux d'humidité relative	145
2.2.6. Etude morphologique de surface par microscopie électronique à balayage (MEB)	145
2.2.7. Méthode d'analyse HPLC pour le dosage de l' α -tocophérol encapsulé	145
2.2.8. Etude de relargage en milieu tamponné du tocophérol	147
3. Résultats et discussion	149
3.1. <i>Etude de la granulométrie au cours du procédé de coacervation complexe permettant l'encapsulation d'une phase lipidique en vue d'élaborer des microsphères</i>	149
3.1.1. Analyse de la qualité des émulsions préparées à partir de protéines de pois natives	150
3.1.2. Analyse de l'évolution de la granulométrie au cours du procédé de coacervation complexe	151
3.1.3. Influence du ratio protéine/polysaccharide sur la distribution de taille des particules de coacervats complexes	156
3.2. <i>Etude de la viscosité au cours du procédé de coacervation complexe permettant l'encapsulation d'une phase lipidique</i>	159
3.3. <i>Caractéristiques des microsphères</i>	162
3.4. <i>Analyse morphologique</i>	166
3.4.1. Analyse morphologique des microsphères séchées par atomisation	167
3.4.2. Etude de l'influence de la nature du polysaccharide et du ratio protéine - polysaccharide sur la morphologie des microsphères	169
3.4.3. Analyse de surface des microsphères	172
3.5. <i>Etude de la stabilité des microsphères et de la libération de l'α-tocophérol en milieu aqueux en fonction du pH</i>	176
4. Conclusion	186
Conclusion et perspectives	190
Références bibliographiques	196

Liste des figures

Figure 1: Structure de la microcapsule (core-shell) et de la microsphère (matrice).	29
Figure 2: Classification des procédés de microencapsulation.	30
Figure 3: Représentation schématisque des mécanismes de stabilisation de gouttes émulsionnées (Bouyer et al., 2012).	32
Figure 4: Schéma d'une tour d'atomisation (Inspiré de : Fraunhofer-Gesellschaft).	33
Figure 5: Procédé de spray-cooling.	36
Figure 6: Procédé de gélification de goutte.	37
Figure 7: Schéma de lyophilisateur de laboratoire (Fang et al., 2019).	38
Figure 8: Schéma de procédé d'extrusion (de Souza Simões et al., 2017).	39
Figure 9: Lit d'air fluidisé en Top-Spray, Bottom Spray, Tangential-Spray (de gauche à droite).	40
Figure 10: Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant (Richard and Benoit, 2000).	43
Figure 11: Diagramme de phase d'un système ternaire (solvant S + polymère A + polymère B). Chaque point du triangle représente un mélange du système ternaire. Les régions monophasiques et biphasiques sont séparées par la ligne binodale, les phases d'équilibres sont connectées deux à deux par les lignes droites. La forme typique de la région bi-phasique dans les systèmes de coacervation complexe (A) et d'incompatibilité (b) sont présentés (Syrbe et al., 1998).	47
Figure 12: Formation des complexes solubles et insolubles entre les protéines et les polysaccharides avec un comportement de phase associative (Warnakulasuriya and Nickerson, 2018).	51
Figure 13: Diagramme de transitions induites par le pH après titration acide dans des systèmes de biopolymères formant des coacervats (inspiré de Moschakis and Biliaderis, 2017).	52
Figure 14: Influence du pH (figure de gauche) et de la force ionique (figure de droite) sur le rendement de coacervation complexe gomme arabique-chitosan et de la turbidité en fonction de la concentration en sel, pour un ratio de 5 et concentration totale en biopolymères de 6% m/m après 72h (Espinosa-Andrews et al., 2007).	53
Figure 15: Paramètres influençant les propriétés des microcapsules de coacervats complexes.	57
Figure 16: Structure chimique de l'acide alginique et des monomères qui la compose (blocs G, M et GM) (Abasalizadeh et al., 2020).	72
Figure 17: Structure chimique de la gomme arabique (à gauche) et de la structure "wattle-blossom" (à droite) (Atgié et al., 2019; Islam et al., 1997). Légende de la structure chimique de la gomme arabique : A – Arabinosyle ; R1 – Rhamnose-Acide glucuronique ; R2 – Rhamnose-galactose-3-arabinose ; R3 – Arabinose-3-Arabinose-3-Arabinose ; ● – galactose lié en 3- ; ○ – Galactose lié en 6- (galactose ou acide glucuronique).	73
Figure 18: Structure chimique de la gomme tara (Wu et al., 2018).	74
Figure 19: Structure chimique de l'acide tragacanthique (Khajavi et al., 2007).	75

Figure 20: Structure chimique des vitamères de vitamine E.	77
Figure 21: Système gastrointestinal chez les monogastriques.	81
Figure 22: Barrière physique de la muqueuse intestinale (Dussert, 2020).....	83
Figure 23: Voie de transport des molécules au niveau de la barrière intestinale. 1) Diffusion passive ; 2) Voie paracellulaire ; 3) Endocytose ; 4) Transport actif par le biais de transporteur ; 5) Transport actif des acides aminés (Dussert, 2020).	85
Figure 24: Mécanismes de libération: mécanismes de diffusion (pores remplis d'eau (A), diffusion matricielle homogène (B), diffusion matricielle réservoir (C)), mécanisme d'érosion hétérogène et homogène (D et E), rétrécissement particulière (F), Gonflement particulière (G), fragmentation (H) (Fathi et al., 2018).	90
Figure 25: Systèmes de libération d'actifs : microréacteur, libération déclenchée, libération prolongée (Richard and Benoit, 2000).	91
Figure 26: A) Curves of the mean turbidity of PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG and PPI-TARA mixtures at a 2:1 ratio according to the pH. B) Critical pH value (pH_{opt}) according to the mass ratio of mixtures of PPI and different polysaccharides (GAC, ALG, TRAG, TARA).C) Appearance of PPI-TRAG at a 2:1 mixing ratio as a function of pH.	114
Figure 27: Mean zeta potential (mV) of pea protein isolates and polysaccharides (arabic gum, sodium alginate, tragacanth gum and tara gum) (A) and mixtures (PPI-TRAG (B), PPI-GAC (C), PPI-ALG (D) and PPI-TARA (E))at different ratios according to the pH. Data represents the mean $\pm$ standard deviation (n=3). F) Critical pH values according to the mass ratio of PPI and different polysaccharides (GAC, ALG, TRAG, TARA).	118
Figure 28: Percentage of protein solubility of the PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) and PPI-TARA (D) mixtures at different ratios according to the pH. Data represents the mean $\pm$ standard deviation (n=3). E) Critical pH values according to the mass ratio of mixtures PPI and different polysaccharides (GAC, ALG, TRAG, TARA) corresponding to the minimum protein solubility.	121
Figure 29: Coacervation yield of pea protein – polysaccharide mixtures (PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) and PPI-TARA (D)) at ratios of 2:1 (black), 5:1 (light grey) and 10:1 (dark grey) determined based on the protein solubility in concentrated solutions.	122
Figure 30: FTIR spectra of the PPI-TRAG (a), PPI-GAC (b), PPI-ALG (c) and PPI-TARA (d) mixtures prepared at PPI: Polysaccharide ratio of 5 :1.	123
Figure 31: SEM observations (left to right: x8,000; x20,000; x100,000) of spray-dried PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG and PPI-TARA coacervates prepared at a ratio of 5:1.	127
Figure 32: Curves of the mean turbidity of PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) and PPI-TARA (D) mixtures according to the pH.	133
Figure 33: Schéma du procédé de coacervation complexe.	142
Figure 34: Schéma du séchage par atomisation et d'une turbine F11.	143
Figure 35: Gamme étalon d' α -tocophérol détectée par HPLC.....	146
Figure 36: Distribution de taille des gouttelettes d' α -tocophérol en émulsion dans une solution de protéines de pois avant et après homogénéisation à 250 bars.....	151
Figure 37 : Evolution de la distribution de taille des gouttelettes/particules en dispersion au cours du procédé de coacervation complexe à partir de : PPI-TRAG 10 :1 (A), PPI-GAC 10 :1 (B), PPI-ALG 10 :1 (C) et PPI-TARA 10 :1 (D). -x- correspond à la solution de polysaccharide	

seul ; -Δ- correspond à l'émulsion PPI-huile après homogénéisation à 250 bars ; -●- correspond au mélange PPI-polysaccharide sans ajustement du pH ; -○- correspond au mélange PPI-Polysaccharide avec ajustement du pH.	153
Figure 38: Influence du ratio protéine/polysaccharide sur la distribution de taille des particules en suspension de PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) et PPI-TARA (D) encapsulant l'α-tocophérol.	157
Figure 39: Influence de l'acidification du milieu dans le mélange PPI-TRAG 5:1.....	161
Figure 40: Observation MEB de microsphères PPI au grossissement x600 (A) et des surfaces externe (B) et interne de la microsphère (C) au grossissement x8000.....	167
Figure 41: Observation MEB des différentes formulations de microsphères PPI-GAC, PPI-TRAG, PPI-ALG et PPI-TARA aux différents ratios 1 :1, 2 :1, 5 :1 et 10 :1 au grossissement x2500.	170
Figure 42: Observation MEB des différentes formulations de microsphères PPI, PPI-GAC, PPI-TRAG, PPI-ALG et PPI-TARA au ratio 5 :1 aux grossissements x8 000, x20 000 et x100 000.	174
Figure 43: Figure bilan de séchage par atomisation des formulations de coacervats complexes et influence des différents paramètres sur la forme de la particule finale (adaptation du schéma développé par N. Joguet, 2014). En A : la goutte atomisée est soumise aux facteurs physiques (vitesse d'air) et thermiques (T°C de l'air d'entrée). En B : 1 ^{ère} étape de séchage, les facteurs physiques induisent un transfert d'eau par modification de la tension superficielle à la surface de la goutte, ce qui a pour conséquence le séchage d'un film à la surface. En C : 2 nd e étape de séchage, la goutte se réchauffe de l'extérieur vers l'intérieur par transfert thermique et l'eau se vaporise, créant ainsi une cavité centrale. En D : la particule finale voit son film de surface se contracter de par la perte d'eau.....	175
Figure 44: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-GAC sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).	177
Figure 45: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-TRAG sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).	179
Figure 46: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-ALG sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).	181
Figure 47: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-TARA sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).	182
Figure 48: Influence de la nature du polysaccharide sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B). Les microsphères comparées correspondent à des microsphères PPI-polysaccharides au ratio 2 :1.	183
Figure 49: Libération de tocophérol dans les différents mélanges PPI, PPI-GAC, PPI-ALG, PPI-TRAG, PPI-TARA aux différents ratios (1 :1, 2 :1, 5 :1, 10,1) dans une solution à pH 6.8 et pH 2.0 à 120 minutes.	185

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition en acides aminés des protéines de pois (Leterme et al., 1990).	64
Tableau 2: Application de la coacervation complexe aux mélanges protéines de pois - polysaccharides.	65
Tableau 3: Application de la coacervation complexe à base de protéines de pois à la microencapsulation.	66
Tableau 4: Application de la coacervation complexe à partir de biopolymères d'origine végétale à la microencapsulation d'actifs hydrosolubles ou liposolubles	68
Tableau 5: Profil des acides aminés d'hydrolysats de protéines végétales	70
Tableau 6: Procédés de microencapsulation de l' α -tocophérol	79
Tableau 7: Modèles mathématiques de libération contrôlée de substances actives (Estevinho et al., 2013).	93
Table 8: Total biopolymer concentration of the various mixed Protein-polysaccharides solutions tested.	109
Tableau 9: Formulation des microsphères d' α -tocophérol.	142
Tableau 10: Conditions analytiques pour la détection de l' α -tocophérol par HPLC.	146
Tableau 11: Distribution granulométrique des différentes solutions PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PPI-TARA au ratio 10 :1 au cours des différentes étapes du processus de coacervation complexe. Les résultats décrivent la taille des différents pics de la distribution (en μm) ainsi que la proportion de chaque fraction/pic.	155
Tableau 12: Distribution granulométrique des différentes émulsions PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PI-TARA aux différents ratios après coacervation complexe. Les résultats décrivent la taille des différents pics de la distribution (en μm) ainsi que la proportion de chaque fraction/pic.	158
Tableau 13: Viscosité apparente des couples PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PPI TARA à 25°C à un cisaillement de 0.34 s ⁻¹ (1 rpm).	160
Tableau 14: Caractéristiques des microsphères d' α -tocophérol préparées.	163

Liste des abréviations et des unités

Abréviations :

BSA: Bovine Serum Albumin

BSE: Backscattered Electrons

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

FAO: Food and Agricultural Organization

FTIR: Fourier Transformed Infrared

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR: Humidité Relative

MEB : Microscope Electronique à Balayage

OD : Optical Density

pH : potentiel Hydrogène

pl : point isoélectrique

pka : constante d'acidité

SE : Secondary Electrons

ZP : Zeta Potential

Unités

°C : degré Celsius

Da : Dalton

g : gramme

h : heure

Hz : Hertz

L : litre

j : jour

m : mètre

m² : mètre carré

M : molaire (moles par litre)

Pa : Pascal

rpm : round per minute (tour par minute)

s : seconde

μm : micromètre

V : volt

% m/m : pourcentage masse pour masse

% m/v : pourcentage masse pour volume

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les aliments fonctionnels sont définis comme des aliments ou ingrédients apportant des bénéfices physiologiques additionnels à leur qualité nutritive de base (International Food Information Council (IFIC) 2009). Y sont inclus les aliments conventionnels, fortifiés, enrichis et les ingrédients alimentaires. Ces aliments apportent en général un bénéfice pour la santé, que ce soit en stimulant le métabolisme ou en prévenant les risques de maladie. Cette gamme d'aliments concerne aussi bien le domaine de la nutrition humaine que la nutrition animale. Le marché de l'aliment fonctionnel représentait dans le monde 80 milliards de dollars, tenu à 35% par les Etats-Unis et le Japon à 25% ([Vergari et al., 2010](#)). Il représente encore 68 milliards de dollars en 2018 et prévoit 94 milliards de dollars en 2023 ([Singh, 2018](#)). L'origine des molécules apportées est diverse. Il peut s'agir de vitamines, d'acides aminés ou dérivés, de minéraux, d'acides gras essentiels, d'antibiotiques, d'antioxydants, d'enzymes, *etc.* Ces ingrédients présentent une haute valeur ajoutée et sont parfois sensibles aux facteurs environnementaux, qui peuvent induire une diminution de leur activité, voire leur dégradation ([Aditya et al., 2017](#)).

Récemment, les technologies d'encapsulation ont pris de l'importance avec le développement d'ingrédients fonctionnels applicables dans le domaine de l'alimentation et de la santé. L'encapsulation permet notamment la protection d'un actif contre le milieu environnant (conditions de pH, stress oxydatif, activité microbiologique et enzymatique) ou d'améliorer ses propriétés de solubilité dans l'eau dans le cas de principes actifs liposolubles ([Shahidi and Han, 1993](#)). Appliquée à la santé, l'encapsulation d'un actif, et plus particulièrement la microencapsulation, permet son administration orale et d'assurer sa biodisponibilité pour l'organisme considéré. La microencapsulation regroupe l'ensemble des techniques permettant d'isoler un composé bioactif de son environnement. L'intérêt de cette technologie réside dans sa capacité à assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation de l'actif, la préservation de ses fonctionnalités, mais également de maîtriser son profil de libération ([Benoît et al., 2013](#)). Le choix de la matrice encapsulante, conditionné par l'application et l'actif visés, doit répondre à un cahier des charges précis. Le cahier des charges émergeant des données actuelles vise à utiliser uniquement des biopolymères qui soient renouvelables et biocompatibles pour écarter tout risque de réactions toxiques, inflammatoires ou

immunogènes ou d'accumulation chez l'organisme considéré. Parmi ces polymères, les biopolymères d'origine végétale ont l'avantage d'être présents, pour la plupart en grandes quantités, renouvelables, biocompatibles et biodégradables ([Barac et al., 2010](#)). Toutefois, les propriétés intéressantes de certains enrobants synthétiques n'ont pas d'équivalent dans le monde naturel, ou ces équivalents sont difficilement transposables aux procédés industriels.

Ce contexte contraint les industriels de la microencapsulation à maîtriser les connaissances des différentes molécules naturelles disponibles sur le marché et à sélectionner les matières premières intégrant leurs formulations en fonction de l'application visée. Parmi ces molécules naturelles existent les protéines, les polysaccharides et les gommages naturelles, les polyphénols et les acides gras. Chaque biopolymère présente des propriétés caractéristiques modulées en fonction de l'origine, des traitements chimiques ou mécaniques et des processus de purification.

Les solutions proposées par la société IDCAPS permettent la protection d'actifs hydrosolubles ou liposolubles par des avancées technologiques en termes d'enrobage par lit d'air fluidisé ou encore par le développement de technologies innovantes permettant d'obtenir une émulsion submicronique séchable par atomisation. Toutefois, des difficultés persistent sur la maîtrise de la libération contrôlée de principes actifs encapsulés et une demande croissante est rencontrée sur le développement de systèmes avec une libération pH-dépendante.

Dans ce contexte, le présent travail propose d'étudier les phénomènes de coacervation complexe à partir de biopolymères d'origine végétale et de développer des formulations permettant l'encapsulation d'actifs liposolubles avec pour objectif une protection et une libération contrôlée en fonction du pH dans des systèmes complexes.

Les formulations et le développement des microsphères devront remplir un cahier des charges précis incluant le respect des principes de la chimie verte, le développement éco-responsable par la sélection de polymères renouvelables et biodégradables, mais également l'élaboration de procédés économiquement viables et industrialisables. La thèse se base donc sur l'utilisation de biopolymères exclusivement d'origine végétale terrestre ou marine.

L'objectif de ce travail de thèse est d'apporter une compréhension des interactions entre les protéines végétales et différents polysaccharides (gomme arabique, gomme adragante, alginate de sodium et gomme tara) et des mécanismes de formations des microsphères par coacervation complexe permettant l'obtention de systèmes pH-dépendants. Le second objectif consistera à appliquer ces connaissances à la microencapsulation d'un actif modèle lipophile en vue de permettre une protection et une libération pH-dépendante de ce dernier.

Pour ce travail, les phénomènes d'interactions électrostatiques entre polymères cationiques et polymères anioniques sont exploités. Ces interactions sont impliquées notamment dans les phénomènes de coacervation complexe, phénomène sensible au pH. La coacervation complexe consiste en une désolvatation partielle de deux colloïdes et leur agrégation par l'abaissement ou l'augmentation du pH. La technique a montré des propriétés intéressantes dans le domaine de la microencapsulation ([Gouin, 2004](#)). Parmi les modèles les plus décrits, le couple de polymères gélatine/gomme acacia a permis l'encapsulation d'une huile riche en acides gras polyinsaturés ([Lamprecht et al., 2001](#)). La sensibilité du phénomène au pH est exploitée pour moduler la libération de l'actif. Cette technique permettra ainsi la microencapsulation d'un modèle d'actif liposoluble. Le modèle associe des protéines des pois avec différents polysaccharides comme agents encapsulant un actif lipophile émulsionné : l' α -tocophérol. Cet actif, couramment utilisé dans le domaine alimentaire, est très sensible aux facteurs environnementaux. Plusieurs formulations seront établies en vue de protéger l'actif.

Ce manuscrit d'étude sera présenté de la manière suivante :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique traitant dans un premier temps de l'état de l'art de la technologie de microencapsulation, appliquée notamment à l' α -tocophérol. Un point sur l'état de l'art associé aux phénomènes de coacervation complexe sera également abordé ainsi qu'une présentation des différentes matières premières sélectionnées. Enfin, une étude sur le parcours digestif décrira les différentes étapes de digestion et les différentes formes de relargage d'un actif encapsulé.

Les résultats obtenus au cours de cette étude seront décrits dans le second chapitre et le troisième chapitre du manuscrit. Ces chapitres décriront la mise en œuvre des biopolymères permettant la microencapsulation d'un actif liposoluble.

Le second chapitre décrira une étude permettant une meilleure compréhension des phénomènes de coacervation complexe au sein de différents couples protéines de pois /polysaccharides (gomme arabique, gomme adragante, alginate de sodium ou gomme tara). Les protéines de pois employées ici sont constituées d'un mélange commercial Nutralys F85M. L'influence de la nature du polysaccharide, du ratio protéine/polysaccharide et du pH sur la composition du coacervat y seront notamment étudiés.

Le troisième chapitre décrira la microencapsulation d'actifs liposolubles par coacervation complexe en associant la protéine de pois aux différents polysaccharides. Cette étude appliquera les propriétés émulsifiantes et pH-dépendantes pour une application de séchage par atomisation. Cette technologie permettra de générer des microsphères, notamment par formulation d'une émulsion et interaction entre des polymères chargés. Les formulations liquides réalisées seront caractérisées (analyse granulométrique) avant d'aborder l'aspect technologique permettant d'obtenir les microsphères d' α -tocophérol. Les particules sèches seront caractérisées de manière physico-chimique et morphologique avec l'analyse de la structure et de la composition des particules par microscopie électronique à balayage (Conforto et al., 2015). Enfin, le comportement des microsphères en milieu de digestion *in vitro* sera étudié. Cette étude consistera à déterminer les propriétés de relargage des microsphères dans les milieux considérés en mimant les conditions de pH et de température du milieu de digestion. Cette étude permettra également de comprendre les différents mécanismes mis en jeu dans la libération d'un actif lipophile encapsulé. Cette approche permettra finalement l'élaboration de microsphères dont la protection et la libération de l'actif seront maîtrisées en fonction du milieu considéré ou de l'application souhaitée.

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

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Etude bibliographique

1. Etat des connaissances sur les différentes techniques de microencapsulation

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies permettant d'enrober ou de piéger une substance active liquide, solide ou gazeuse au sein d'un film continu ou d'une matrice de polymères. La matière enrobée est appelée cœur, actif, phase interne, et peut être encapsulée seule ou en combinaison avec d'autres matières. Cette dernière est d'origine variée : additif alimentaire, principe actif pharmaceutique, actif cosmétique, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes ([Peighambardoust et al., 2011](#)), cellules, catalyseurs de réaction chimiques ([Rahim et al., 2013](#)). L'enrobant, quant à lui, est appelé en général agent encapsulant, coque ou vecteur et est le plus souvent formulé sous forme d'un mélange de matières présentant des propriétés physico-chimiques différentes permettant de palier aux limitations d'un enrobant unique. Les matières peuvent être d'origine naturelle (polysaccharides, protéines, polyphénols, acides gras, ...) ou synthétiques (hydrocarbures, vinyles, ...). L'encapsulation de l'actif permet leur mise en forme de liquide à solide, le masquage de goût et d'odeur inconvenants, la protection d'actifs sensibles contre le milieu environnant (pH, température, oxydation, ...) et de faciliter une libération contrôlée.

Le produit issu de la microencapsulation se présente sous forme de petites particules (d'une centaine de nanomètres à quelques millimètres) permettant la protection de l'actif face à l'environnement extérieur.

La morphologie des particules peut varier d'une forme simple à irrégulière, avec un ou plusieurs agents encapsulants, agrégés ou non sous forme de multicouches, par la présence d'une matrice particulière contenant un cœur unique ou multiple ([Gibbs et al., 1999](#)). La morphologie dépend des propriétés physico-chimiques de la substance active et de la matière encapsulante, de leur composition et du procédé utilisé.

Deux structures de vecteurs sont globalement distinguées (**Figure 1**) ([Herrero-Vanrell et al., 2014](#)). La première structure, dite microcapsule, consiste en une particule réservoir comportant un cœur de matière liquide ou solide, entouré d'une écorce solide continue de matériau enrobant. La seconde est une microsphère, ou particule matricielle formant un

réseau macromoléculaire continu dans lequel se trouve finement dispersée la substance active.

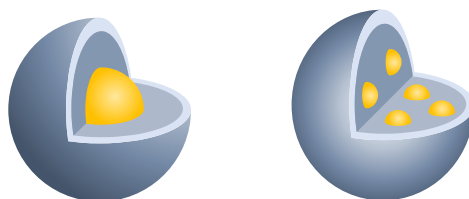


Figure 1: Structure de la microcapsule (core-shell) et de la microsphère (matrice).

La microcapsule se caractérise par un taux d'encapsulation de l'actif de 85 à 90% et permet de libérer totalement ce dernier par rupture de l'enveloppe ou par simple diffusion au travers de l'enveloppe encapsulante. Les microsphères présentent un taux d'encapsulation plus faible (20-35%) et un profil de libération contrôlé par diffusion progressive de l'actif. Le choix entre les deux formes dépend essentiellement de l'application souhaitée. Les microparticules produites présentent une taille comprise entre $1\mu\text{m}$ et $1000\mu\text{m}$ (pour des valeurs inférieures, on parle de nanoparticules et au-delà de minigranules). Les microparticules produites présentent une polydispersité en taille se caractérisant par une distribution gaussienne avec une ou plusieurs populations en fonction du procédé. Les procédés impliquant un contrôle de la formation de gouttelettes ou basés sur la polymérisation permettent la maîtrise de la production de microparticules de taille mono-dispersée.

1.1. Les techniques d'encapsulation

Plusieurs classifications ont permis de rassembler les différentes techniques d'encapsulation en fonction de leur application, de leur rendement énergétique, ou de l'utilisation de solvants organiques (Richard and Benoit, 2000). La classification des techniques d'encapsulation la plus répandue distingue trois procédés différents : les procédés mécaniques, chimiques et physico-chimiques (**Figure 2**).

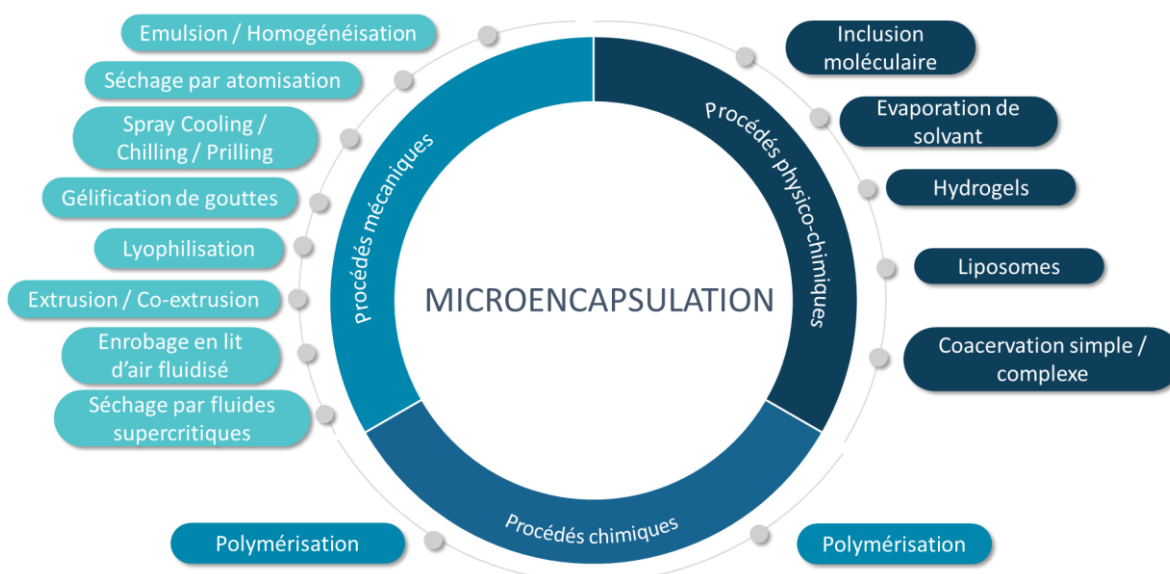


Figure 2: Classification des procédés de microencapsulation.

1.1.1. Les procédés mécaniques

Les procédés physico-mécaniques font intervenir des procédés permettant de sécher directement la solution de matière active encapsulée (lyophilisation, spray-drying, spray-cooling), de pulvériser un enrobant sur une matière active (spray-coating) ou permettre une extrusion.

1.1.1.1. Emulsion / Homogénéisation

La formation d'une émulsion implique le mélange de deux phases non miscibles, l'une des phases étant dispersée sous forme de petites gouttelettes (phase dispersée) dans une solution (phase continue). L'émulsion est considérée comme un système bi-phasique cinétiquement stable plutôt que thermodynamiquement stable. Les émulsions peuvent être classées en différents systèmes en fonction de l'organisation spatiale des deux phases : huile-dans-eau (O/W), eau-dans-huile (W/O), liquide-dans-liquide, solide-dans-liquide. La qualité et la stabilité d'une émulsion dépendent des émulsifiants et surfactants utilisés pour stabiliser l'émulsion, du ratio surfactant/huile, des conditions d'homogénéisation. Le système O/W est largement utilisé pour l'encapsulation d'actifs liposolubles. L'apport important d'énergie, et notamment mécanique, est essentiel pour produire une émulsion. Une émulsion double eau/huile/eau peut également être réalisée. Elle se caractérise par une première phase aqueuse contenant la substance active, et qui est émulsionnée dans un solvant organique ou

une huile contenant le polymère solubilisé. Cette émulsion est ensuite ajoutée à une seconde phase aqueuse contenant des tensioactifs, stabilisant ainsi l'émulsion eau/huile/eau.

Lors de l'émulsification, la surface interfaciale entre les phases continue et dispersée, ainsi que l'énergie libre interfaciale sont plus importantes par rapport à l'interface avant dispersion. En considérant l'aspect thermodynamique, les systèmes évoluent vers leur état global d'énergie minimale. Les émulsions ont rapidement tendance à se séparer en phases afin de minimiser la zone de contact interfaciale et l'énergie libre. Cette instabilité se manifeste par différents mécanismes : floculation, coalescence, crémage ou sédimentation et maturation d'Ostwald (**Figure 3**). La floculation et la coalescence sont les principaux mécanismes de déstabilisation ([Guzey et al., 2004](#)).

La floculation est le résultat de forces attractives entre les gouttelettes conduisant à la formation de flocs de la phase dispersée et altérant l'état de dispersion des gouttes. En fonction de l'interaction entre les gouttes, l'émulsion peut présenter un déphasage ou former un gel par pontage. En fonction de la valeur d'énergie d'attraction entre les gouttes, le phénomène est plus ou moins réversible.

La coalescence, phénomène destructif d'une émulsion, consiste en la fusion de deux gouttes de la phase dispersée qui sont entrées en contact. La fusion des gouttes intervient lors de la rupture du film séparant les deux gouttes.

Les phénomènes de crémage et sédimentation sont des phénomènes réversibles consistant en la migration de globules selon la gravité et les densités relatives des deux phases liquides. Ainsi, pour une émulsion directe, la phase huileuse dispersée est généralement moins dense que la phase aqueuse continue, entraînant la migration des gouttelettes d'huile vers le haut (phénomène de crémage). Pour une émulsion inverse, la phase aqueuse dispersée a tendance à sédimenter.

Enfin, la maturation d'Ostwald est un mécanisme de diffusion de molécules en phase dispersée à travers la phase continue résultant de la différence de pression de Laplace existant entre des gouttes de tailles différentes.

Ces différents mécanismes conduisent à la rupture de l'émulsion en deux phases distinctes. La floculation, la sédimentation et le crémage sont considérés comme des mécanismes

réversibles de migration des gouttelettes, tandis que la maturation et la coalescence d'Ostwald sont des mécanismes non réversibles.

Selon l'application des émulsions, il peut être important de ralentir ou de déterminer les conditions environnementales exactes (taux de cisaillement, pH, etc.) permettant la déstabilisation de l'émulsion et la libération de l'actif encapsulé au temps souhaité, sur le site ciblé.

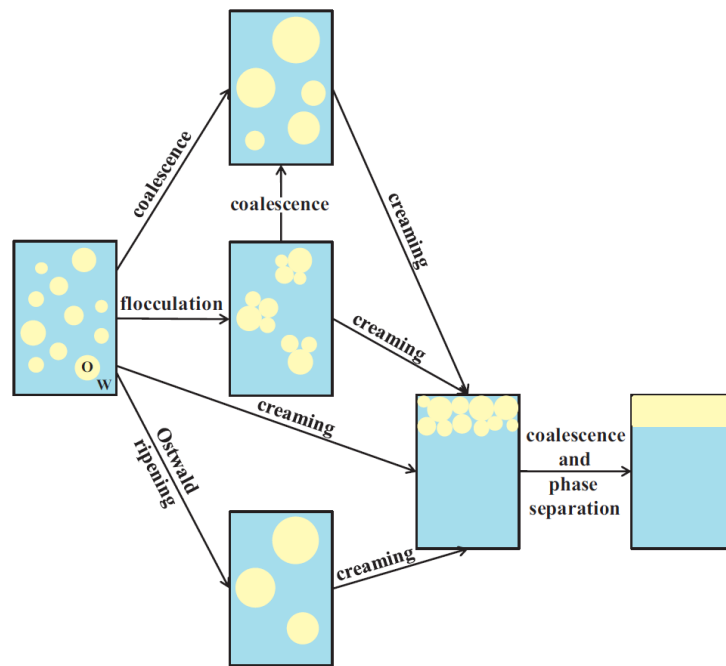


Figure 3: Représentation schématique des mécanismes de stabilisation de gouttes émulsionnées (Bouyer et al., 2012).

Différentes techniques mécaniques (homogénéisateur haute-pression, sonicateur, mixeur à haut cisaillement) apportent une force de rupture suffisamment intense pour séparer les deux phases non miscibles. L'homogénéisation à haute pression, technique d'élaboration d'émulsion la plus répandue, est un traitement physique consistant à faire passer un produit liquide ou pâteux dans des conditions de forte pression (de 30 à 1000 bars) à travers une tête d'homogénéisation. Cette technologie participe à la stabilisation d'émulsions en réduisant la taille des gouttelettes lipidiques stabilisées par un émulsifiant dans une phase aqueuse. Au cours de l'homogénéisation, l'émulsion est soumise principalement aux phénomènes de turbulences et à des contraintes de cisaillement. L'homogénéisation permet d'améliorer la conservation des solutions, de modifier les propriétés de rhéologie, de texture et de couleur des émulsions.

1.1.1.2. Le séchage par atomisation (Spray-drying)

Le séchage par atomisation est un procédé continu utilisé largement depuis les années 1950 comme méthode d'encapsulation de substances fonctionnelles (Shahidi and Han, 1993). Cette technique permet la conversion d'une formulation liquide en matière sèche par évaporation du solvant sous l'effet de la chaleur. La substance active est en général homogénéisée avec la matrice encapsulante pour former une dispersion ou une émulsion sous forme de solution ou suspension. Le système homogénéisé est ensuite alimenté dans la tour d'atomisation sous forme atomisée à l'aide d'une buse ou d'une turbine pour former un aérosol. Les fines gouttelettes atomisées dans la chambre d'atomisation sont évaporées dans un courant de gaz chaud. Le gaz généralement utilisé est l'air, mais il est également possible d'utiliser des gaz inertes tels que l'azote. Les particules sèches sont ensuite séparées du courant d'air chargé en eau par l'intermédiaire du cyclone avant d'être collectées.

L'appareillage utilisé se constitue d'une haute tour sur laquelle la formulation liquide est atomisée (**Figure 4**).

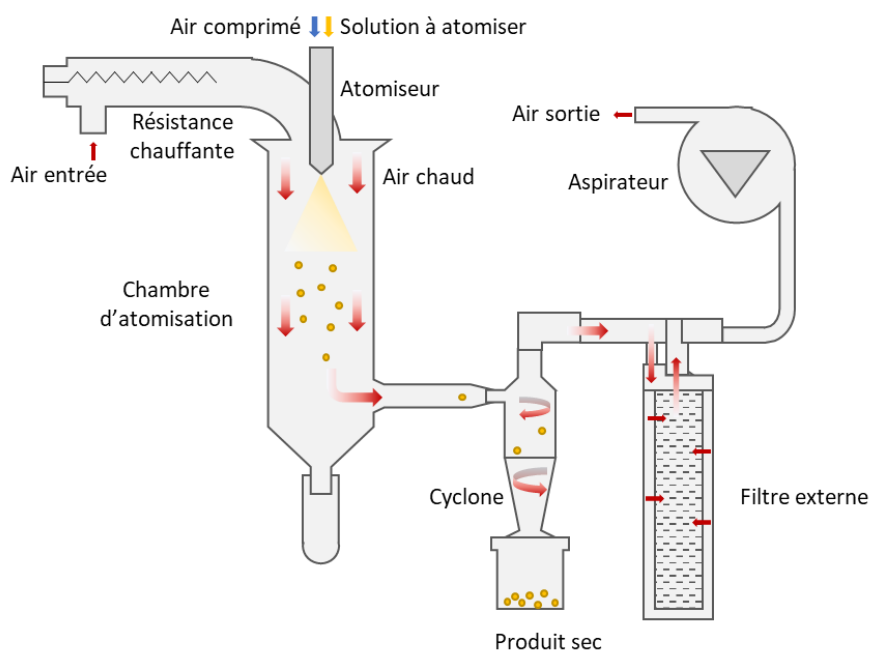


Figure 4: Schéma d'une tour d'atomisation (Inspiré de : Fraunhofer-Gesellschaft).

L'atomisation de la formulation liquide peut être réalisée sous différentes contraintes : l'atomisation par pression (atomiseur pneumatique, buse bi-fluide sous pression), ultrasons, énergie centrifuge (turbine, disque tournant, buse rotative) ou par électronébulisation

(Masters, 1968). L'importance de cette étape est d'augmenter la surface d'échange de chaleur entre l'air sec et le liquide atomisé pour optimiser les transferts de masse et de chaleur. Plus il y a d'énergie apportée au cours de l'atomisation, plus les gouttelettes formées seront fines. Cependant, la nature du liquide à atomiser et sa viscosité influencent également la taille des particules. Pour une nébulisation à énergie équivalente, plus la viscosité et la tension de surface du liquide augmentent, plus la taille des gouttelettes augmente (Gharsallaoui et al., 2007).

Les gouttelettes atomisées entrent ensuite en contact avec l'air chaud dans la chambre d'atomisation. En fonction de la configuration de la tour, le flux d'air chaud peut être établi à co-courant (atomisation suivant le même sens que le flux d'air) ou à contre-courant. Dans le cas d'un séchage à co-courant, les gouttelettes sont exposées à un courant d'air chauffé en amont entre 50 et 200°C et la poudre séchée exposée à des températures entre 50 et 80°C pour éviter toute dégradation thermique. A contre-courant, bien que considéré comme process plus économique en termes de consommation d'énergie, le produit séché est soumis à de hautes températures, limitant l'application aux substances thermosensibles. Dans les deux cas, l'air utilisé est généralement préalablement filtré, chauffé et parfois séché en amont pour améliorer les capacités évaporatoires.

Lors du contact entre les gouttelettes et le fluide chaud, un transfert de chaleur s'effectue de l'air chaud vers le produit, augmentant la température au sein de la goutte. Une évaporation de l'eau s'opère alors de la gouttelette vers le fluide gazeux chaud par différence de pression partielle de vapeur d'eau. Le taux de diffusion d'eau du cœur de la gouttelette est considéré comme constant et équivalent au taux d'évaporation à la surface de la goutte à cette étape. Lorsque la quantité d'eau de la goutte atteint une valeur critique, une croûte se forme à la surface de la gouttelette et la capacité évaporatoire diminue rapidement, devenant dépendante de la diffusion de l'eau au travers de cette couche sèche. Une fois l'évaporation réalisée, la température de la particule est équivalente à la température générale de la chambre d'atomisation.

La séparation entre la particule sèche et le gaz chaud chargé en eau s'effectue majoritairement au moyen d'un cyclone situé à la sortie de la chambre d'atomisation, par différence de densité. Celui-ci permet de réduire la perte de produit dans l'atmosphère. La plupart des tours

d'atomisation sont également équipées de filtres permettant de retenir les particules les plus fines ou certains polluants volatils.

Les particules formées présentent en général une taille de 10µm avec une distribution pouvant varier en fonction de la solution liquide de départ ou des conditions de séchage (spray, température...). Cette technologie, relativement simple, est largement utilisée pour des applications dans le domaine pharmaceutique et alimentaire pour ses coûts de production faibles. Cependant, l'application de hautes températures pendant le séchage est un paramètre à prendre en compte lors de la microencapsulation de substances actives sensibles à la chaleur. D'autre part, l'obtention de particules fines limite certaines applications et nécessite l'addition d'autres procédés comme l'agglomération de la poudre en lit d'air fluidisé pour augmenter la fluidité de la poudre.

1.1.1.3. Spray cooling/chilling / Prilling

Le spray-cooling est une technique basée sur le séchage d'une formulation liquide pulvérisée dans un courant d'air froid permettant la solidification de substances (**Figure 5**) ([Champagne and Fustier, 2007](#)). La solution peut être pulvérisée par atomisation ou au moyen d'une buse vibrante. Cette technologie, contrairement au spray-drying, ne permet pas d'évaporer l'eau contenue dans la solution mais convient plutôt à l'obtention de microsphères d'huiles végétales ou de dérivés (cires, glycérides, corps gras) à haut point de fusion (45-122°C) qui se solidifient, piégeant la substance active ([Desai and Jin Park, 2005](#)). Elle est adaptée pour la mise en forme de particules à partir d'un mélange d'huile végétale à haut point de fusion associée à une substance active hydrophobe ou à une substance hydrophile en suspension dans la matière grasse. Les microsphères obtenues sont insolubles dans l'eau en raison de la présence de la couche lipidique.

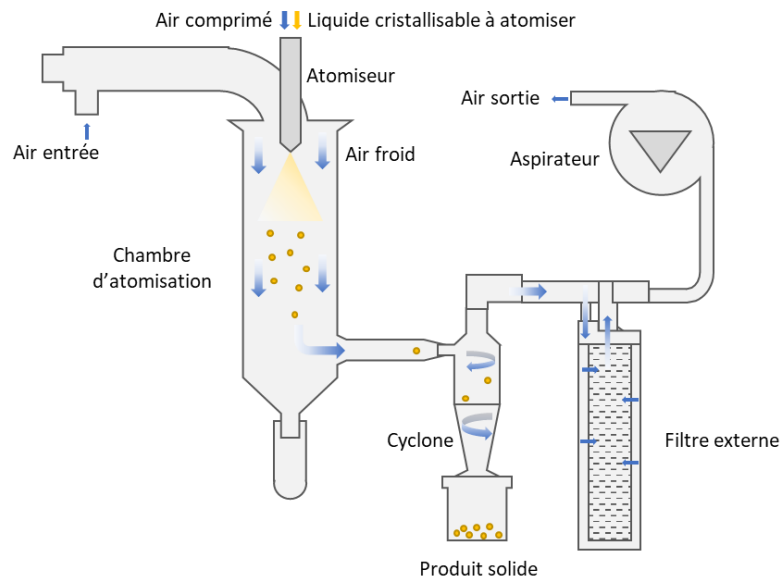


Figure 5: Procédé de spray-cooling.

1.1.1.4. Gélification de gouttes

La gélification de gouttes est basée sur la formulation d'une solution aqueuse, d'une émulsion ou d'une dispersion contenant une substance active et un polymère capable de former un gel sous l'effet de la température, d'une modification du pH ou par l'addition d'ions chélateurs (Silva et al., 2006).

La gélation ionique permet la réticulation de polyélectrolyte en présence d'ions multivalents comme Ca^{2+} . Cette méthode peut être appliquée pour des procédés d'extrusion ou d'émulsification/gélation. Dans le cas de l'extrusion, la méthode consiste à produire des billes d'alginate, par exemple, par extrusion de gouttes de solution d'alginate au moyen d'une buse vibrante dans un bain de chlorure de calcium. Ces gouttes se gélifient pour former des microparticules de gel sphériques (**Figure 6**).

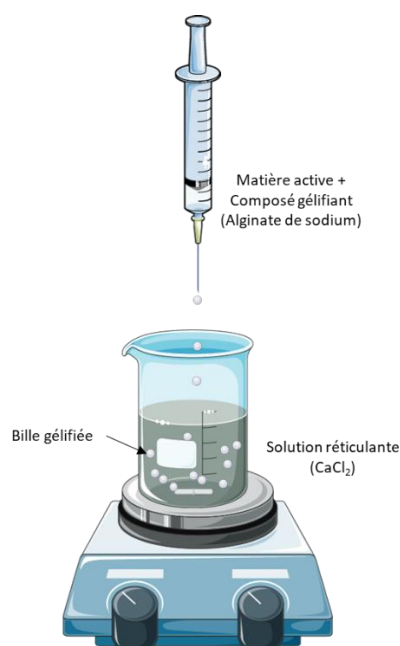


Figure 6: Procédé de gélification de goutte.

La gélification thermique, ou *hot-melt process*, repose sur la fusion du matériau d'enrobage. La matière active à encapsuler est dissoute ou dispersée dans le matériau en fusion. L'ensemble est ensuite émulsionné dans une phase dispersante dont la température est supérieure au point de fusion de la matière encapsulante et ne présentant aucune affinité avec la substance active (solution aqueuse pour un actif lipophile et huile de silicone par exemple pour un composé hydrophile). La solidification des globules/particules est obtenue par refroidissement brutal de la matière enrobante dans le milieu. La thermo-sensibilité des substances actives oblige l'utilisation de matériaux de bas points de fusion pour éviter d'altérer l'actif. Une alternative à ce procédé est l'utilisation de biopolymères hydrosolubles capables de former des gels par auto-organisation sous l'effet du refroidissement. C'est le cas notamment pour la gélatine (Lin and Kang, 2003). Les particules obtenues présentent une structure de microsphère de 30 à 300µm. La teneur en matière active est de l'ordre de 20%. Malgré une faisabilité simple à l'échelle laboratoire, la transposition industrielle nécessite un changement de process pour le spray-cooling.

1.1.1.5. Lyophilisation (freeze drying)

La lyophilisation, connue également sous les termes « Freeze drying » permet de séparer la matière active d'un solvant congelé (généralement à -80°C) par sublimation sous basse pression (Figure 7). La lyophilisation comprend plusieurs étapes : la congélation, la

sublimation (séchage primaire), la désorption (séchage secondaire) et les étapes de stockage. A la fin de l'étape de sublimation, une particule poreuse se forme. La formation de pore est liée principalement à la sublimation des cristaux d'eau pure présents dans la suspension congelée. Le séchage secondaire consiste à évaporer l'eau qui n'a pas pu former de cristaux de glace et donc qui n'a pas pu être sublimée.

Cette technique présente comme avantage de préserver une substance active sensible à la chaleur ou aux phénomènes d'oxydation. De manière générale, la lyophilisation est la technique la plus adaptée pour la déshydratation de la plupart des substances sensibles à la température telles que les arômes, les polyphénols, les huiles naturelles (Gouin, 2004). Les principales limites de la méthode sont la durée prolongée du process (supérieure à 20h) et les coûts d'opération liés aux temps de process. D'autre part, le produit obtenu présente une structure poreuse liée à la sublimation (Abdelwahed et al., 2006). La présence de pores à la surface de la particule expose la molécule active encapsulée à l'environnement extérieur.

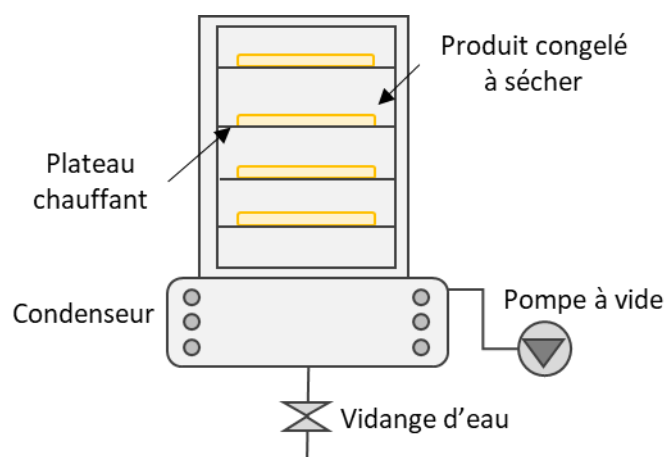


Figure 7: Schéma de lyophilisateur de laboratoire (Fang et al., 2019).

1.1.1.6. Extrusion / Co-extrusion

Cette technologie permet l'élaboration de produits encapsulés de haute densité par mélange d'une matière active au sein d'un polymère thermoplastique (**Figure 8**). La première étape consiste à réaliser le mélange ou la granulation (pulvérisation d'un fluide liquide sur une matière sèche). Le mélange passe ensuite au travers d'une extrudeuse à l'aide d'une vis pour subir différentes étapes : le mélange, le malaxage, la mise sous pression, l'échauffement et enfin la détente. Cette série d'étapes permet de former un produit dans un état intermédiaire

solide/liquide. La dernière étape de l'extrusion consiste à sectionner le produit en microparticules cylindriques au travers d'une matrice. Après extrusion, il est possible de sphéroniser les microparticules produites par friction sur une plaque tournante, formant ainsi des microsphères (Vervaet et al., 1995).

L'avantage de cette technique est l'obtention d'un produit peu poreux qui permet de protéger la substance active de l'oxydation. Cependant, l'étape d'échauffement présente une limite pour l'application de la microencapsulation de substances thermosensibles.

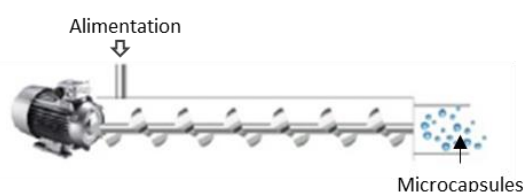


Figure 8: Schéma de procédé d'extrusion (de Souza Simões et al., 2017).

La co-extrusion ou extrusion centrifuge est une technologie d'extrusion utilisée dans la microencapsulation. Elle fait intervenir des buses concentriques ou multi-fluides qui peuvent être stationnaires, rotatives ou vibrantes. Elle permet la formation de microcapsules sphériques produites par gélification interfaciale.

1.1.1.7. Enrobage en lit d'air fluidisé

La microencapsulation par enrobage en lit d'air fluidisé consiste à appliquer un enrobage sur une poudre sèche (poudre, granules, cristaux) sous forme de process continu ou discontinu (batch) (Teunou and Poncelet, 2002). Les particules de substance active sont suspendues dans un courant d'air maintenu à une température donnée et sont enrobées par l'intermédiaire d'un spray de solution enrobante. Une couche homogène se forme alors autour de la particule après plusieurs passages successifs dans les zones de pulvérisation et de séchage. Le procédé comprend trois étapes : la fluidisation des particules, l'enrobage de ces dernières par le matériau d'enrobage, le séchage et la filmification de l'enrobage autour des particules. Il existe différentes méthodes d'enrobage en lit d'air fluidisé dépendant de la position de la buse au sein de la cuve : le « top-spray » (pulvérisation à contre-courant), le « bottom-spray » (pulvérisation à co-courant) et le « tangential-spray » (fluidisation par rotation de la poudre dans le fond de la cuve et position de la buse sur le côté de la cuve) (Figure 9).

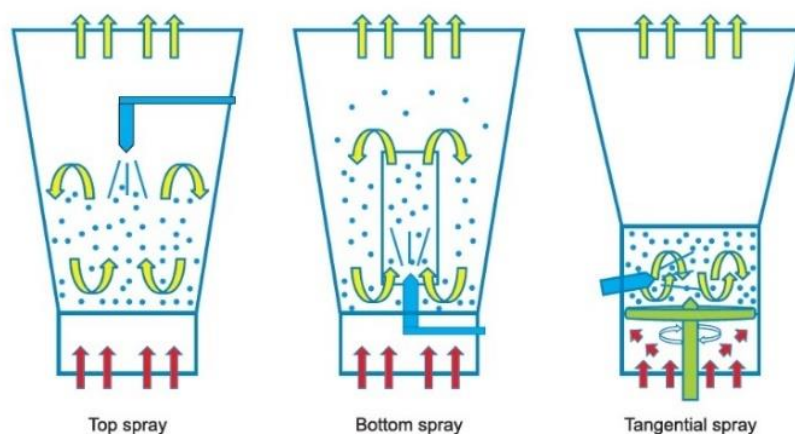


Figure 9: Lit d'air fluidisé en Top-Spray, Bottom Spray, Tangential-Spray (de gauche à droite).

La formation d'un film enrobant à la surface des particules passe par trois étapes successives : le contact entre la microparticule et la gouttelette, le mouillage et l'étalement de la gouttelette sur la particule et enfin le séchage du solvant par évaporation et la pénétration dans la particule dans certains cas.

Le film formé après enrobage présente une épaisseur de 20µm à quelques millimètres. Le taux d'encapsulation pour ce procédé est élevé (60-90%) (Ehlers et al., 2009; Hampel et al., 2013).

Ce procédé présente toutefois des limites. L'actif est en contact direct avec l'air chaud qui le maintient en suspension, l'exposant aux phénomènes de dégradation ou d'oxydation dans le cas de bioactifs sensibles. D'autre part, la taille des particules initiales à enrober doit être supérieure à 100µm afin d'éviter tout phénomène d'agglomération des particules en cours d'enrobage mais également écarter tout phénomène de perte dans les filtres de l'appareil.

1.1.1.8. Séchage par des fluides supercritiques

Un fluide supercritique se définit comme tout fluide soumis à des conditions supérieures à son point critique. A cet état, celui-ci présente des propriétés de viscosité et de diffusivité à l'intermédiaire entre l'état de gaz et de liquide et une tension superficielle nulle. Ces propriétés, modulables en fonction de la température et de la pression, ont permis à ces fluides d'intégrer différents domaines d'applications tels que l'extraction, la chromatographie ou encore l'élaboration de particules (Tabernero et al., 2012). Le procédé consiste à mélanger la substance active et la matrice enrobante dans le fluide supercritique. Le fluide peut être utilisé en tant que solvant (procédé RESS ou expansion rapide de solutions supercritiques), anti-solvant (procédé SAS ou précipitation au sein d'anti-solvant supercritique) ou soluté

(procédé PGSS ou formation de particules à partir d'une solution saturée en gaz). Des procédés dérivés existent pour chacune des trois méthodes citées (Cocero et al., 2009; Debenedetti et al., 1993; Martín et al., 2015).

Parmi les fluides utilisés, le CO₂ supercritique est le plus utilisé dans les process de précipitation (Cocero et al., 2009). Dans le cas de ce fluide, la région supercritique est atteinte pour des valeurs de pression et de température équivalentes à $P_c = 7,38 \text{ MPa}$ et $T_c = 31,1^\circ\text{C}$ respectivement. Ces conditions permettent l'élimination du CO₂ sous forme de gaz dans des conditions proches des conditions ambiantes, évitant l'altération des substances actives thermosensibles. L'avantage de l'utilisation du CO₂ supercritique en microencapsulation est son acceptation en tant que « green solvent » de par ses propriétés critiques acceptables et ses propriétés non-inflammables et non-toxique. D'autre part, il peut être séparé facilement des particules produites par dépressurisation et peut être ainsi recyclé pour les procédés de microencapsulation. Le facteur limitant de ce procédé est la sélection de la méthode en fonction de la solubilité de l'actif et du polymère encapsulant dans le fluide supercritique.

1.1.2. Les procédés chimiques

Les procédés chimiques sont basés sur la formation *in situ* d'une membrane encapsulant la matière active par polycondensation, polymérisation radicalaire ou polyaddition anionique.

La polymérisation traduit une réaction de polycondensation entre deux monomères très réactifs, chacun dissout respectivement dans l'une des deux phases liquides non-miscibles. La polymérisation interfaciale consiste en la formation de couches fonctionnelles à l'interface de deux phases liquides (Raaijmakers and Benes, 2016). Appliquée à l'encapsulation, cette réaction permet de former, à partir d'une émulsion huile/eau contenant des monomères hydrophiles et hydrophobes, une membrane à la surface de la goutte ou la particule à encapsuler par polymérisation de ces monomères. L'avantage de cette technique est qu'elle ne requiert pas de catalyseur et peut s'opérer à basse température. La qualité de la membrane formée peut être modulée par modification des paramètres de process comme la température, la concentration en monomères, l'agitation ou le temps de réaction. Les travaux de polymérisation interfaciale se sont principalement concentrés sur le développement de membranes à partir de polyamides, polyuréthanes, de polyurée ou encore de polyesters. La

capacité de chargement est importante. La membrane formée possède des propriétés chimiques et mécaniques stables.

Le procédé est simple, reproductible, peu cher et facile à transposer. Le facteur limitant l'application est le manque de contrôle sur les caractéristiques de la polymérisation, notamment en termes de qualité et de rendement. De plus, le procédé requiert des étapes intermédiaires de nettoyage pour retirer les monomères non polymérisés, les co-produits, les surfactants ou les solvants organiques. Ces étapes sont limitantes dans la mesure où elles peuvent entraîner une perte d'actif hydrosoluble et les actifs sensibles à l'acide peuvent être altérés par formation de co-produits d'acide chlorhydrique avec le changement de pH. Les conditions parfois extrêmes utilisées (utilisation de monomères toxiques, pH élevé, solvants et produits de réaction) limitent également les applications notamment dans le domaine agro-alimentaire.

1.1.3. Les procédés physico-chimiques

Les procédés physico-chimiques exploitent les variations de conditions de solubilité/précipitation de différentes matières enrobantes par modifications des conditions du milieu (pH, température, force ionique) entraînant un changement d'état de la solution (gélification thermique ou évaporation de solvant). Ces procédés comprennent également l'ajout d'un solvant ou d'un polymère incompatible ou chargé de manière opposée entraînant la précipitation du polymère (coacervation).

1.1.3.1. Inclusion moléculaire

L'inclusion moléculaire consiste à piéger une substance active au sein d'une molécule hôte grâce à des interactions type liaisons hydrogène, forces de Van der Waals ou des interactions hydrophobes. Ces complexes se forment en milieu aqueux ou solide. L'utilisation la plus répandue de l'inclusion moléculaire consiste à piéger une substance active de nature hydrophobe au sein d'une cage moléculaire de cyclodextrines (Choi et al., 2010).

Les cyclodextrines sont utilisées pour leur capacité à former des complexes d'inclusion solides, nommés également complexes hôte-invité, où l'invité est la substance active et l'hôte la molécule piégeant l'invité. La formation du complexe dépend de deux facteurs essentiels : le facteur stérique (taille cyclodextrine/actif, présence de groupements fonctionnels) et les interactions thermodynamiques entre la cyclodextrine, l'actif et le solvant.

L'inclusion moléculaire présente différentes applications : la protection contre l'oxydation, contre les dégradations liées à la chaleur ou à la lumière (domaine visible ou ultra-violet), l'amélioration de la dissolution de composés hydrophobes, le masquage de goût et odeur, l'encapsulation de molécules volatiles.

1.1.3.2. L'évaporation de solvant

Cette méthode repose sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion sous agitation (Poncelet, 2006). Elle est utilisée principalement dans le domaine pharmaceutique pour la production et la libération contrôlée de médicaments. Le matériau d'enrobage est constitué d'un polymère hydrophobe dissout dans un solvant organique volatil. La substance active est dissoute ou dispersée dans le solvant avec le polymère formant la matrice (**Figure 10**). Les polymères généralement utilisés sont l'acide poly(lactique-co-glycolique), le poly(éthylène glycol), l'éthylcellulose ou l'acide polylactique (Munin and Edwards-Lévy, 2011). Ce procédé permet un taux d'encapsulation de 30 à 40% avec une efficacité d'encapsulation proche de 100%. Les microparticules obtenues présentent une structure matricielle. La taille des particules obtenues est de l'ordre de 0,5-200µm.

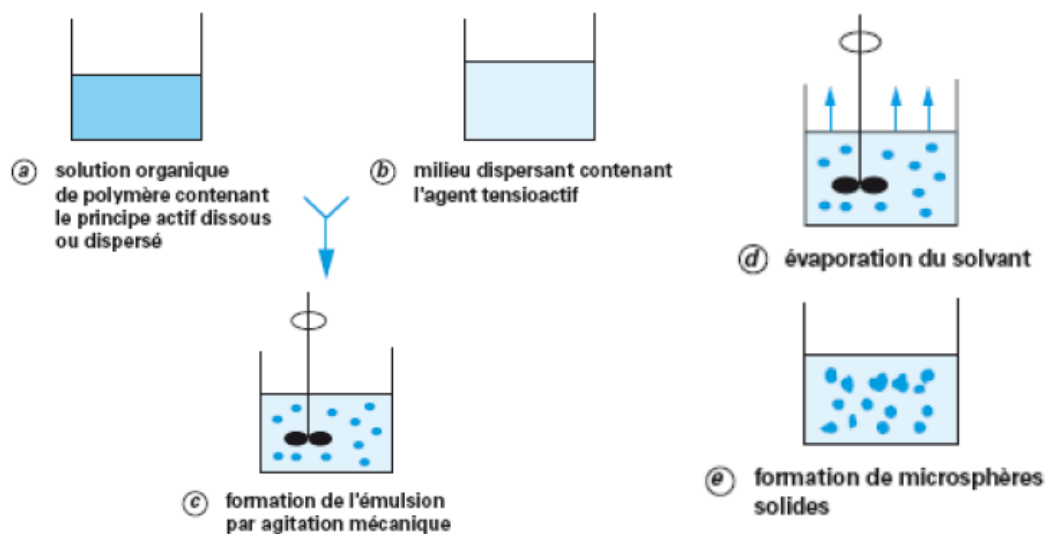


Figure 10: Procédé de microencapsulation par évaporation de solvant (Richard and Benoit, 2000).

Cette technique présente des limites : la présence de traces de solvants organiques après évaporation et le recyclage difficile des solvants d'un point de vue industriel.

1.1.3.3. Les hydrogels

Les hydrogels sont décrits comme des réseaux tridimensionnels polymériques hydrophiles pouvant s'associer entre eux par des interactions covalentes ou non covalentes. Cette structure permet de retenir une quantité importante d'eau ([de Souza Simões et al., 2017](#)).

La préparation des hydrogels implique les mécanismes de gélification. Au cours de ce processus, les chaînes polymériques s'agrègent entre elles par des liaisons intermoléculaires formant la structure du réseau : ce procédé est nommé « sol ». La polymérisation du réseau entraîne une diminution de sa solubilité. La transition entre l'agrégation des polymères et la réticulation est appelée transition « sol-gel » et le point critique de formation du gel « le point de gel » ([Ramos et al., 2014](#)).

La texture, l'apparence, la réactivité et la capacité de rétention d'eau des hydrogels varient en fonction de la structure du polymère et de la présence de groupements hydrophiles ([Tiwari and Takhistov, 2012](#)). Les hydrogels sont généralement utilisés pour l'administration d'actifs par voie orale. Pour les hydrogels polycationiques, le gonflement est minimal à pH neutre, minimisant la libération d'actifs. Les hydrogels polycationiques sont également utilisés pour la libération dans l'estomac. Les hydrogels polyanioniques réticulés ont été développés pour une libération dans le colon. Le gonflement de l'hydrogel est minimal dans l'estomac, limitant la libération. Dans le cas de polysaccharides anioniques, le gonflement augmente lorsque l'hydrogel passe le tractus intestinal avec l'augmentation du pH entraînant l'ionisation des groupements carboxyliques. Les cinétiques de dégradation et les motifs de dégradation peuvent être contrôlés via la densité de réticulation.

La limite des hydrogels est l'utilisation de polymères pH-sensibles synthétiques non biodégradables. Les polypeptides synthétiques sont également utilisés pour la synthèse d'hydrogels biodégradables pour leur arrangement plus régulier, leurs résidus d'acides aminés moins versatiles que les dérivés issus de la nature. Parmi ces polypeptides synthétiques, on retrouve la poly(L-lysine), le poly(hydroxyl-L-glutamate), le poly(acide aspartique), etc...

1.1.3.4. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules fermées constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques composées généralement de phospholipides. Ces derniers se caractérisent par une tête hydrophile et une chaîne carbonée hydrophobe. Ces phospholipides peuvent se réorganiser

sous forme de couches lamellaires lors de leur dispersion dans l'eau. La formation des liposomes est basée sur des interactions hydrophiles/hydrophobes entre les phospholipides et les molécules dans la solution. Un actif peut être piégé dans le compartiment interne hydrophile des liposomes ou au sein de la membrane. En termes de procédé, la formation des vésicules peut être réalisée par homogénéisation à haute pression, ultrasonication, électroformation, évaporation de solvant.

Leurs propriétés fonctionnelles leur permettent d'encapsuler une large gamme d'actifs, aussi bien, hydrophobes, hydrosolubles qu'amphiphiles. Les vésicules produites présentent une grande biocompatibilité, biodisponibilité, biodégradabilité et une importante perméabilité membranaire. Toutefois, cette technologie présente des limites : une faible stabilité physique et chimique au stockage, une distribution granulométrique large, une oxydation lipidique et la nécessité d'étapes additionnelles de traitement post-production.

1.1.3.5. La coacervation (simple et complexe)

La coacervation, terme introduit en 1929 par Bungenberg de Jong et Kruyt ([Bungenberg De Jong and Kruyt, 1929](#)), se définit comme un phénomène de désolvatation de macromolécules entraînant une séparation entre deux phases liquides dans une solution colloïdale. L'une des phases est enrichie en polymère (phase coacervat) tandis que la seconde n'en contient pas (phase d'équilibre). Appliquée à la microencapsulation, la coacervation permet de piéger la matière active au sein de la matière enrobante précipitée par séparation de phase. Deux types de coacervations sont distinguées : la simple, ne contenant qu'un polymère formant l'enveloppe autour de l'actif et la complexe impliquant l'interaction de deux polymères présentant des charges opposées. La coacervation complexe fera l'objet du chapitre suivant.

La **coacervation simple** implique le processus de désolvatation d'un seul polymère en fonction d'un ou plusieurs facteurs : la température, l'addition d'un non-solvant, l'addition d'électrolytes. La réaction peut s'effectuer en milieux aqueux ou inorganique. Le cas de coacervation simple le plus fréquent consiste à disperser un biopolymère dans l'eau comme la gélatine et le mélanger à un solvant incompatible comme l'éthanol ou le polyéthylène glycol, entraînant une séparation instantanée. Cette déshydratation sélective du système biopolymère/solvant induit une séparation de phase liquide/liquide à cause de la négativité de la valeur d'énergie libre de l'hydratation. Cette méthode permet l'utilisation de polymères

hydrophiles comme hydrophobes car le coacervat peut se former en milieu organique ou aqueux.

1.2. Etat des connaissances sur la coacervation complexe

Au cours de ce projet de recherche, ce procédé a été choisi comme modèle d'étude. Ce procédé est présenté plus explicitement dans la suite de ce chapitre.

La **coacervation complexe** consiste en une séparation de phase liquide/liquide dans un système colloïdal qui se déroule lors de l'interaction électrostatique entre des biopolymères portant des charges opposées dans des conditions particulières. Le modèle de coacervation le plus étudié est l'interaction protéines/polysaccharides, où les auteurs ont cherché à faire varier les biopolymères et optimiser les conditions permettant une coacervation complexe (Kaushik et al., 2016; Shaddel et al., 2018). La formation de coacervats complexes fait intervenir différents types d'interactions : des interactions électrostatiques, des interactions faibles (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes).

1.2.1. Diagramme de phases

Le mélange de solutions aqueuses de protéines et de polysaccharides entraîne la formation d'un système monophasique ou biphasique, en fonction de la composition de la solution et des conditions environnementales (McClements, 2006). L'interaction attractive ou répulsive des deux biopolymères entraîne la formation de ces systèmes. Dans un solvant tel que l'eau, le mélange peut conduire à la formation de complexes solubles, la coacervation ou la précipitation, l'incompatibilité thermodynamique ou la co-solubilité.

Dans un système monophasique, les biopolymères sont présents sous la forme de molécules individuelles par co-solubilité en présence d'interactions répulsives ou de complexes solubles dans le cas d'interactions attractives répartis uniformément dans le système.

Par contre, si le poids moléculaire et la concentration en biopolymère augmentent, la co-solubilité au sein du système diminue entraînant la formation de deux phases distinctes se différenciant par leur concentration en biopolymères. Deux types de séparation sont rencontrées : la séparation de phase ségrégative et la séparation de phase attractive. La séparation de phase ségrégative intervient lors de la répulsion entre la protéine et le polysaccharide : c'est le phénomène d'incompatibilité thermodynamique. Au cours de ce phénomène, deux phases sont distinguées : l'une riche en protéines et l'autre riche en

polysaccharides. La séparation de phase associative, ou coacervation complexe intervient au cours de l'interaction électrostatique entre la protéine et le polysaccharide chargés de manière opposée. Des complexes macromoléculaires solubles sont formés, formant des agrégats électriquement neutres, puis des précipités qui sédimentent pour former la phase coacervée contenant les deux polymères. La seconde phase est pauvre en polymères (McClements, 2006).

La construction d'un diagramme de phase permet de mettre en évidence les conditions pour lesquelles un système de ségrégation entre les biopolymères est obtenu (**Figure 11**). Ce même diagramme permet également de déterminer les concentrations optimales en biopolymères dans les deux phases et les conditions pour lesquelles la concentration maximale de co-solubilité entre les biopolymères est atteinte (Nayak and Singh, 2019). La coacervation complexe et la séparation de phase sont dépendantes de la force ionique dans la solution et de la concentration totale en polymères. Une concentration totale en polymères est suffisante pour induire la suppression du phénomène de la coacervation complexe (Timilsena et al., 2019).

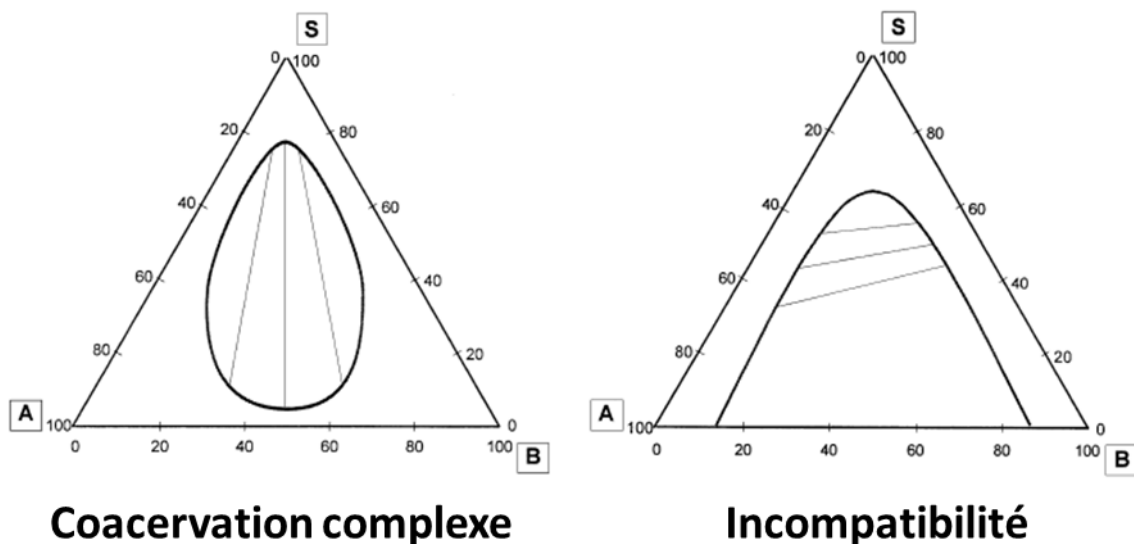


Figure 11: Diagramme de phase d'un système ternaire (solvant S + polymère A + polymère B). Chaque point du triangle représente un mélange du système ternaire. Les régions monophasiques et biphasiques sont séparées par la ligne binodale, les phases d'équilibre sont connectées deux à deux par les lignes droites. La forme typique de la région bi-phasique dans les systèmes de coacervation complexe (A) et d'incompatibilité (b) sont présentés (Syrbe et al., 1998).

1.2.2. *Modèles théoriques de la coacervation complexe*

La théorie de Overbeek et Voorn est la première théorie proposée pour expliquer le phénomène de coacervation complexe par des aspects thermodynamiques (Overbeek and Voorn, 1957). Reposant sur les résultats obtenus par Bungenberg de Jong dans l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et la gomme d'acacia, la coacervation complexe est considérée comme un phénomène spontané entre deux biopolymères chargés de manière opposée (Bungenberg de Jong, 1949). Ce phénomène repose sur la compétition entre les forces électrostatiques attractives (effets enthalpiques) tendant à rapprocher les polymères et les effets entropiques les éloignant. L'association par interaction électrostatique des chaînes des polymères conduisant à la formation du coacervat, est un phénomène réversible en milieu liquide. La théorie proposée pose les postulats suivants : la composition des macromolécules d'une chaîne désordonnée non perturbée, l'homogénéité de la distribution des charges dans le mélange, l'absence d'association spécifique entre les molécules et enfin l'équivalence des interactions solvant/soluté pour chaque macromolécule au cours de la coacervation. Le traitement théorique a recours aux équations de Debye et Hückel pour rendre compte des interactions électrostatiques et la théorie de Flory-Huggins pour les effets entropiques. D'après la théorie, dans le cas d'un système binaire composé d'un solvant et d'un biopolymère, les conditions critiques de compatibilité sont atteintes lorsque $\sigma r^3 \geq 0,53$, où σ correspondant à la densité de charge moléculaire et r au rapport de volume molaire entre le soluté et le solvant (r étant proportionnel au poids moléculaire des polyions) sont suffisamment élevées (Burgess, 1994).

La théorie de Veis et Aranyi se base sur le modèle de coacervation entre deux types de gélatines chargées de manière opposée dans des conditions de faible densité de charge ($\sigma r^3 < 0,53$) (Veis and Aranyi, 1960). La théorie explicitée précédemment n'est donc pas applicable. Dans cette théorie, la coacervation s'effectue en deux étapes : l'agrégation de la gélatine par interactions électrostatiques formant des agrégats neutres de faible entropie et ensuite le réarrangement lent formant la phase coacervée. Le moteur de la réaction réside dans l'augmentation de l'entropie liée à la formation de coacervat par interaction aléatoire des agrégats et la dilution de cette phase. Le terme électrostatique appliqué dans la théorie de Overbeek et Voorn est remplacé par un terme dépendant de la concentration et de la densité de charge des polymères.

La théorie de Nakajima et Sato ([Nakajima and Sato, 1972](#)) propose une amélioration à la théorie de Overbeek et Voorn en étudiant comme modèle les alcools polyvinyliques (PVA) modifiés (PVA sulfatés ou aminoacétylés) présentant des charges opposées avec une densité de charge élevée. L'amélioration consiste en l'introduction du terme d'interaction de Flory-Huggins entre les deux macromolécules. Malgré l'obtention d'un terme électrostatique plus faible que pour la théorie de Overbeek et Voorn, les auteurs s'accordent sur l'hypothèse d'une répartition uniforme des charges entre la phase diluée et concentrée.

La théorie de Tainaka se base sur le modèle de Veis et Aranyi, où les agrégats formés par interaction électrostatique interagissent pour former le coacervat ([Tainaka, 1979, 1980](#)). Selon cette théorie, le moteur de la séparation de phase réside dans les interactions électrostatiques attractives favorisées par l'augmentation de la masse moléculaire des macromolécules et l'augmentation de leur densité de charge. Cette théorie explique également le phénomène de suppression de la coacervation complexe à forte concentration en biopolymères. La théorie de Tainaka s'applique aux systèmes à densité de charge faible comme élevée et permet la description de la majorité des systèmes de coacervation complexe.

1.2.3. Influence des paramètres sur la coacervation complexe

Différents paramètres influent sur la coacervation complexe : le pH, la force ionique, la concentration en biopolymère, le ratio entre les deux biopolymères, leur poids moléculaire, la température et l'homogénéisation ([Eratte et al., 2018](#)). Ces facteurs, intrinsèques ou extrinsèques, conditionnent la formation des complexes en influençant les interactions mises en jeu, mais également la structure des complexes, leurs propriétés et leur stabilité.

Les facteurs intrinsèques :

La **densité de charges** des polymères et leur nature est un facteur essentiel de la formation des coacervats complexes. L'excès de charges d'un polymère rend les complexes solubles. En présence de composés chargés de manière opposée et égale, une neutralisation des charges permet la formation de complexes insolubles ([Li and Huang, 2015](#)). Les interactions électrostatiques permettant la formation des coacervats peuvent ne pas intervenir si la densité de charge du mélange est trop faible. Dans le cas d'une interaction entre protéines et polysaccharides anioniques, la formation de coacervats complexes est possible à condition

que le pH du milieu soit inférieur au pI de la protéine et supérieur au pKa du polysaccharide, condition favorisant la présence de charges positives sur la protéine et de charges négatives sur le polysaccharide. En présence d'un polysaccharide chargé positivement comme le chitosan, la formation des coacervats est favorisée pour des valeurs de pH supérieures au pI de la protéine (chargée négativement) et inférieures au pKa du polysaccharide (chargé positivement).

La nature du biopolymère joue également un rôle dans la formation de coacervats complexes (longueur des chaînes, ramifications, charges, flexibilité et hydrophobicité) (McClements, 2006). Une augmentation du **poids moléculaire** des polysaccharides augmente le volume hydrodynamique du biopolymère, le rendant plus accessible pour interagir avec le polymère chargé de manière opposée, favorisant le phénomène de séparation de phase. Toutefois, si les poids moléculaires sont trop élevées, la précipitation est favorisée par rapport à la coacervation complexe (Frugier and Audebert, 1994). Enfin, la faible **solubilité** de polymères de haut poids moléculaire facilite la formation de large complexes insolubles.

Les facteurs extrinsèques :

- Le pH du milieu

Le pH est considéré comme un facteur significatif de la complexation entre les biopolymères dans la mesure où une complexation optimale s'opère pour des valeurs de pH où les charges des biopolymères sont opposées. La plupart des polysaccharides présentent un caractère anionique (présence de charges négatives liées aux groupements carboxyliques en général) pour un large spectre de pH. Les protéines présentent des charges différentes en fonction du pH, avec des charges positives pour des valeurs de pH inférieures au point isoélectrique de la protéine, et des charges négatives pour des valeurs supérieures. Le pH agit ainsi sur le degré d'ionisation des groupements portés par les biopolymères mais également influe sur les transitions structurales de ces derniers.

Dans le cas d'interactions protéines/polysaccharides, la formation de coacervats complexes se décompose en plusieurs étapes, dépendantes du pH (**Figure 12**).

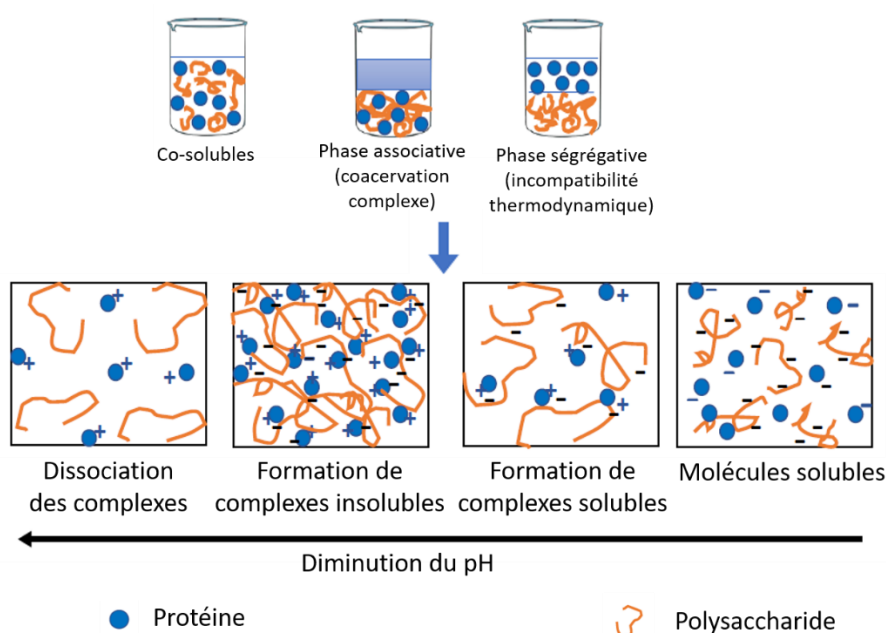


Figure 12: Formation des complexes solubles et insolubles entre les protéines et les polysaccharides avec un comportement de phase associative (Warnakulasuriya and Nickerson, 2018).

Les interactions associatives de complexes protéiques aux chaînes de polysaccharides conduisent à la formation de complexes solubles à une première valeur de pH dite critique (pH_c) (**Figure 13**). La valeur de pH_c est proche de la valeur du point isoélectrique d'une protéine. Ce premier point critique est dépendant de la force ionique plutôt que de la concentration en polymères chargés ou du poids moléculaire de ces polyélectrolytes. Ces complexes s'agrègent ensuite entre eux par murissement d'Ostwald sous forme de complexes microscopiques insolubles à une seconde valeur de pH critique ($pH_{\phi 1}$). A un pH optimal (pH_{opt}), l'équivalence électrique entre les différentes charges des polymères est atteinte, entraînant la formation de gros complexes neutres. Une séparation de phase s'opère entre la phase diluée et la phase concentrée en coacervats. La diminution du pH à une valeur inférieure au pH_{opt} entraîne une diminution des forces attractives au sein des coacervats complexes, du fait de la diminution de charges négatives au sein du complexe. Dans le cas d'interactions protéines-polysaccharides notamment, le polysaccharide ne présente plus de charges négatives à cette étape, entraînant une dissociation du complexe. Cette dernière étape est notée $pH_{\phi 2}$. Ces différentes valeurs de pH peuvent être déterminées par suivi de la turbidimétrie en fonction du pH.

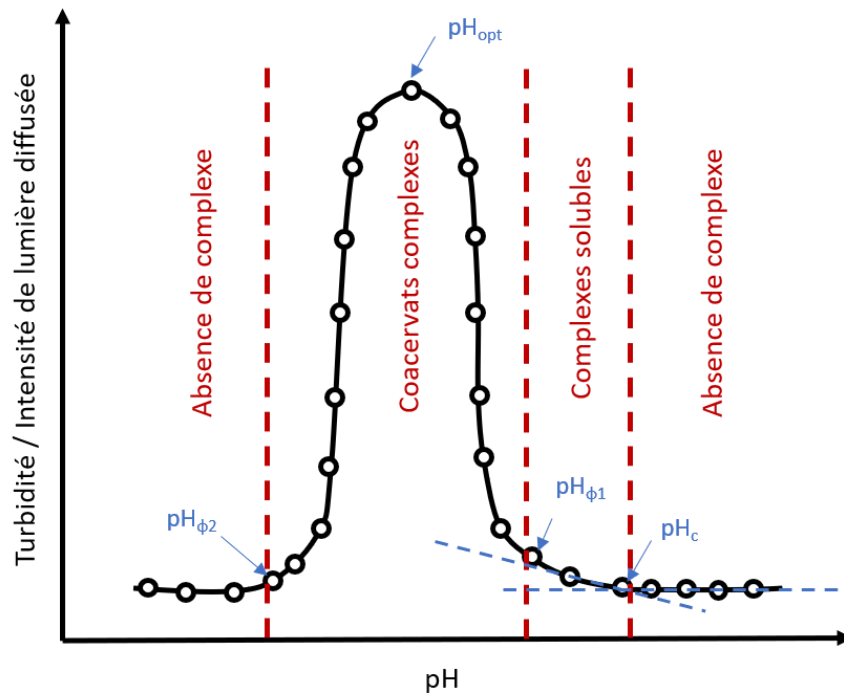


Figure 13: Diagramme de transitions induites par le pH après titration acide dans des systèmes de biopolymères formant des coacervats (inspiré de Moschakis and Biliaderis, 2017).

Pour un modèle chitosan/gomme arabique (**Figure 14**), il a pu être démontré un maximum de coacervation pour des valeurs comprises entre 3,5 et 5,0, valeurs pour lesquelles les densités de charges des biopolymères de signes opposés semblent être stoechiométriquement en équilibre (Espinosa-Andrews et al., 2007). Pour des valeurs de pH inférieures, une diminution du rendement de coacervation est observée et s'explique par la protonation des groupements acides carboxyliques de la gomme arabique et la contraction de la structure moléculaire. Pour des valeurs supérieures à pH 5,0, le pH est proche du pKa du chitosan (6,3-7) et par conséquent le degré d'ionisation et la solubilité du chitosan diminuent.

- La force ionique

La force ionique affecte la charge des polymères. Une force ionique très faible ou trop élevée entraîne la suppression des interactions électrostatiques entre les biopolymères. L'addition d'une quantité suffisante de sels peut supprimer tout phénomène de coacervation en affectant la diffusion des charges à la surface des polymères, réduisant l'attraction entre les deux polymères. Elle peut également entraîner la diminution du gain entropique du mélange en entrant en compétition avec les contre-ions présents avec les macromolécules, supprimant également le phénomène de coacervation complexe. Dans ces conditions, les contre-ions

présents sur les macromolécules ne peuvent pas être libérés lors de l'hydratation des polymères. Les travaux de d'Espinosa-Andrews ([Espinosa-Andrews et al., 2007](#)) sur le système chitosan-gomme arabique ont mis en évidence une diminution du rendement de coacervation avec l'augmentation de la concentration en NaCl, avec une diminution drastique de la coacervation pour une concentration de 150 mM dans le cas de ce modèle (**Figure 14**). De même, il a été observé dans un système protéines de lait / gomme arabique qu'une concentration en sel supérieure à 54 mM empêchait la complexation ([Weinbreck et al., 2003](#)).

La force ionique peut également influencer d'autres interactions. La contribution des interactions hydrophobes a été rapportée comme plus importante en augmentant la force ionique du milieu ([Dong et al., 2015](#)). L'augmentation de la force ionique peut également diminuer l'hydratation des deux polymères par modification de la qualité du solvant, favorisant les interactions par liaisons hydrogènes intermoléculaires entre les polymères ([Wang et al., 2015](#))

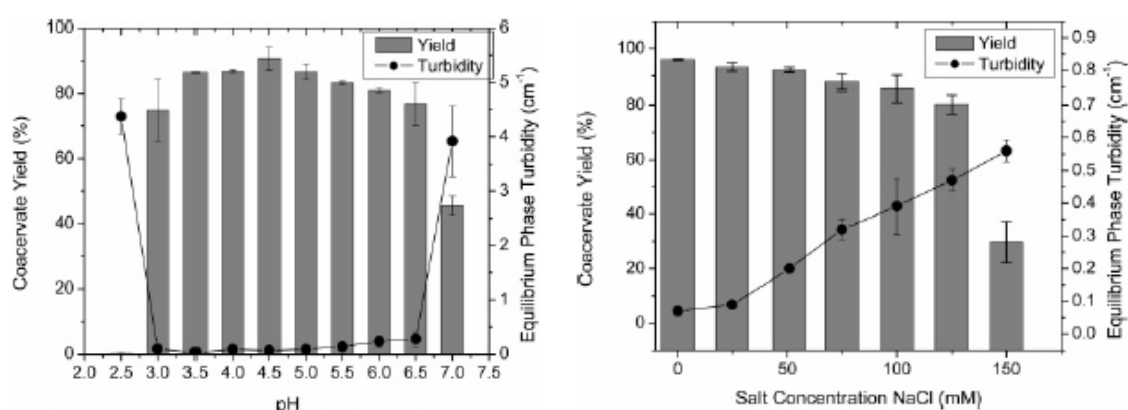


Figure 14: Influence du pH (figure de gauche) et de la force ionique (figure de droite) sur le rendement de coacervation complexe gomme arabique-chitosan et de la turbidité en fonction de la concentration en sel, pour un ratio de 5 et concentration totale en biopolymères de 6% m/m après 72h ([Espinosa-Andrews et al., 2007](#)).

- Le ratio polyélectrolyte cationique/anionique

Le ratio polyélectrolyte cationique/anionique influence également le phénomène de séparation de phase par coacervation complexe. Ce dernier permet de contrôler l'équilibre de charges entre les deux polymères chargés et le ratio polyélectrolyte cationique /anionique optimal à la formation de coacervats complexes dans des conditions de pH et de force ionique données. Pour ce ratio optimal, le rendement de coacervats obtenus est maximal ([Weinbreck](#)

et al., 2004). Dans le cas d'un modèle stœchiométrique, permettant une neutralisation de la densité des charges pour un ratio 1:1, tout ratio supérieur ou inférieur entraîne une diminution de la formation de coacervats et une augmentation de la formation de complexes solubles par la présence de charges non-neutralisées. En considérant un mélange protéines polysaccharides, l'excès de protéines chargées positivement permet de neutraliser les charges négatives de polysaccharides et inhiber l'agrégation des complexes (Li and Huang, 2015). A l'inverse, une concentration en excès en polysaccharide permet de former une couche autour des protéines assurant une stabilité électrostatique et stérique. Toutefois, la présence de charges négatives non-neutralisées réduit la formation de complexes.

- **La température**

La température influe sur la formation de coacervats, et plus particulièrement une température basse favorise les interactions associatives. A température élevée, les fluctuations thermiques réduisent la stabilité des complexes. Cependant, il a également été constaté qu'un traitement thermique du mélange après complexation peut améliorer la stabilité des complexes par formation de nouvelles jonctions (Li and Huang, 2015). La température peut influencer la conformation des biopolymères mais également les interactions non-Coulombiennes s'exerçant entre eux. Ainsi, la formation des liaisons hydrogènes est favorisée à basse température. En augmentant la température, les interactions électrostatiques ne sont plus majoritaires et les interactions covalentes et hydrophobes dominent (Dickinson, 1998). Plus spécifiquement dans le cas d'interactions protéines-polysaccharides, le changement de température peut améliorer l'interaction entre les polymères.

- **La concentration totale en polymères**

La **concentration en polymères** peut également intervenir dans le rendement de formation de coacervats. Les fortes concentrations en biopolymères ont un effet négatif sur la coacervation car elles peuvent empêcher le mouvement libre des polymères au sein du mélange, réduisant le gain d'énergie au cours de la coacervation (Weinbreck et al., 2003). Ces mouvements restreignent ainsi les interactions entre les molécules. A une concentration élevée, l'agrégation des complexes domine, favorisant la formation de gels selon la nature des interactions entre les particules de complexes neutralisés. Selon Tolstoguzov, il existe une

concentration totale en biopolymère maximale équivalente à 4% (m/m) pour laquelle le phénomène de coacervation complexe est supprimé (Tolstoguzov, 1986). Une concentration critique équivalente à 4,5% (m/m) a pu être identifiée dans le cas du couple β -lactoglobuline-gomme acacia à pH 4,2 avant suppression du phénomène de coacervation complexe (Schmitt, 2000). En présence de protéines de lactosérum et de gomme arabique, des coacervats complexes ont été observés jusque 15% (m/m) à pH 3,5 (Weinbreck et al., 2003). Cette différence est expliquée par un gain entropique électrostatique. Une libération des contre-ions dans la solution peut expliquer le phénomène de suppression de la coacervation complexe, masquant les charges portées par les biopolymères et favorisant la solubilité des complexes (Weinbreck et al., 2003). Au-delà d'une valeur critique de concentration, le système est soumis à une incompatibilité thermodynamique, ou séparation de phase dite ségrégative, plutôt qu'à une séparation de phase associative en raison de la compétition des macromolécules pour le solvant.

1.2.4. La coacervation complexe appliquée à la microencapsulation

La microencapsulation par coacervation complexe trouve des applications dans des domaines variés : pharmaceutique, alimentaire, cosmétique, textile, phytosanitaire (Chang et al., 2006; Jun-xia et al., 2011; Kong et al., 2009; Miró Specos et al., 2010). Elle implique un processus triphasique constitué d'un solvant, de la matière active et de deux polymères chargés de manière opposée. Ce procédé consiste à former un coacervat à partir de deux biopolymères chargés de manière opposée à la surface de l'actif. Le procédé de coacervation complexe est principalement utilisé pour l'encapsulation de composés hydrophobes. L'encapsulation de composés hydrophiles est plus difficile dès lors que le système d'encapsulation est également hydrophile, mais des alternatives existent, notamment par ajout d'une étape de double encapsulation avant le processus de coacervation (Mendanha et al., 2009).

Les microcapsules produites par coacervation complexe présentent un diamètre de l'ordre de 1-1000 μm . L'avantage de ces capsules est leur non-toxicité, biodégradabilité, biocompatibilité et leur capacité de libération contrôlée. La formation de coacervats appliquée à l'encapsulation est limitée par leur sensibilité au pH et à la force ionique du milieu.

Quatre étapes interviennent principalement dans le procédé de microencapsulation par coacervation complexe. La première étape consiste à élaborer une émulsion ou une

dispersion. Au cours de cette étape, la substance active, ou phase dispersée, est mélangée aux matériaux encapsulants (également nommée phase continue). La séparation de phase constituant l'étape de formation de coacervation est induite par une modification du milieu, principalement par changement du pH. Les coacervats se disposent autour de l'actif dispersé afin de l'encapsuler. Une étape additionnelle de modification du milieu par la température (étape de gélification) peut également être envisagée dans le cas d'hydrocolloïdes tels que la gélatine se gélifiant à basse température. Enfin, l'enveloppe formée autour de l'actif peut être solidifiée par l'ajout d'agents réticulants chimiques (glutaraldéhyde, formaldéhyde) ou enzymatiques (transglutaminase).

La formation des capsules s'établit selon deux mécanismes : l'inclusion d'une ou plusieurs gouttes d'actif au sein d'une goutte de coacervat et le phénomène d'adsorption/coalescence de plusieurs gouttes de coacervats autour d'une gouttelette d'actif ([Madan et al., 1972](#)).

En fonction des paramètres de procédés appliqués, trois types de microcapsules peuvent être formées : les capsules mononucléées, les capsules polynucléées et les agrégats de capsules mononucléées ([Lemetter et al., 2009](#)). La formation de capsules mononucléées dépend de la taille des gouttelettes d'actifs dispersées et de l'épaisseur de l'enveloppe formée par le coacervat. Les capsules polynucléées se forment lorsque la vitesse d'agitation au cours de l'étape de coacervation n'est pas assez rapide. La formation d'agrégats de capsules mononucléées est influencée par la température et la durée d'étape de gélification (température pas suffisamment basse).

1.2.4.1. Paramètres influençant les propriétés des capsules de coacervats complexes

La formation et les propriétés finales de la microcapsule dépendent des paramètres physico-chimiques du milieu mais également des paramètres de formulation des coacervats (taille des gouttelettes ou des particules à encapsuler, pH, température, concentration, ratios, etc...) (**Figure 15**).

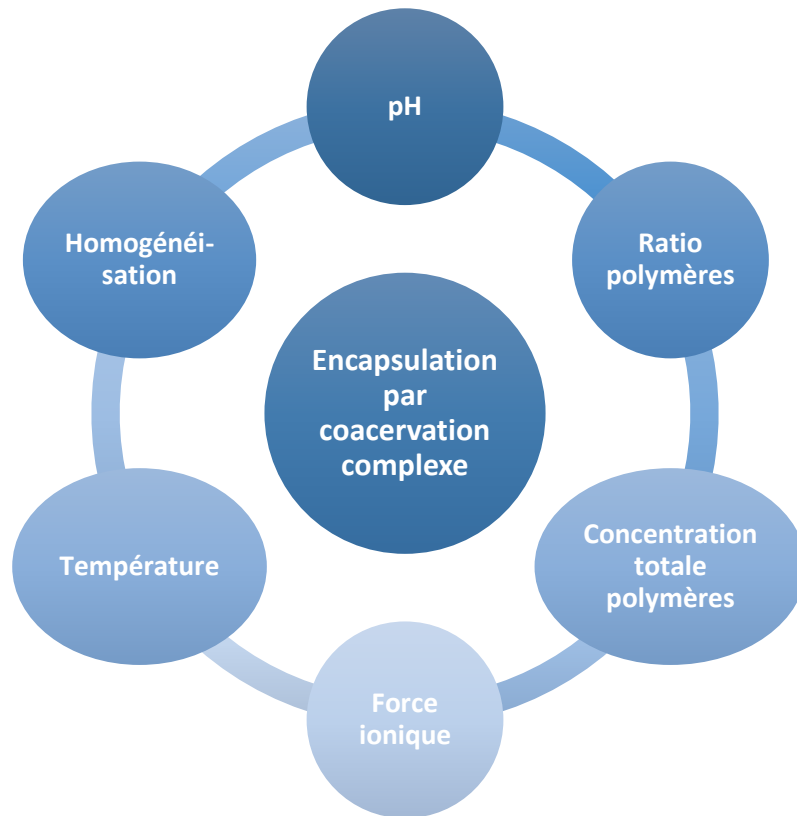


Figure 15: Paramètres influençant les propriétés des microcapsules de coacervats complexes.

La **taille des gouttes** formées au cours du process d'émulsion ou des particules dispersées à encapsuler a une influence sur la formation des capsules ([Weinbreck et al., 2004](#)). Selon leur étude, les petites gouttes (5-50µm) sont encapsulées dans une matrice de coacervats tandis que les grosses gouttes (50-200µm) sont encapsulées par une fine couche de coacervats. Ce phénomène est attribué au fait que l'encapsulation des grosses gouttes nécessite l'agrégation et la coalescence partielle d'un grand nombre de gouttelettes de coacervat, tandis que l'encapsulation d'une petite goutte d'huile peut se faire par piégeage dans une goutte de coacervat. La taille des gouttes est directement dépendante des conditions d'émulsification/dispersion. Les études de Lamprecht et Lemetter ont mis en évidence que l'utilisation d'un système d'agitation rotor-stator permettait la formation de microcapsules de taille contrôlée et d'obtenir les meilleurs taux d'encapsulation ([Lamprecht et al., 2001](#); [Lemetter et al., 2009](#)).

Le **pH**, comme décrit précédemment, joue un rôle important dans la formation de coacervats complexes. Celui-ci influence le rendement de formation des coacervats mais également le rendement d'encapsulation ([Siow, 2012](#)).

La **concentration en polymères** affecte le diamètre des capsules. D'après les travaux de Weinbreck sur le modèle protéines de lait / gomme arabique, l'encapsulation de 5% d'huile est possible pour une concentration en polymère comprise entre 0,5 et 1% (Weinbreck et al., 2004). Les travaux de Yeo *et al.* ont également mis en évidence qu'à concentration faible en polymère, l'épaisseur de la paroi encapsulante est plus fine et la taille des agrégats de capsules augmente (Yeo et al., 2005).

Il existe également un équilibre du **ratio matière active / matière enrobante**. Si le ratio matière active/matériaux enrobant est insuffisant, le rendement d'encapsulation est faible car les polymères en excès restent en solution. Il existe un équilibre. A contrario, l'augmentation de ce ratio affecte également la morphologie, la taille et la charge des microcapsules. Une augmentation de charge entraîne une diminution de l'épaisseur de la membrane, augmentant la vitesse de libération de la matière encapsulée (Dong et al., 2011).

La **vitesse d'agitation** au cours de la coacervation influence la formation des microcapsules. Différentes études ont mis en évidence que le diamètre moyen des coacervats était inversement proportionnel à la vitesse d'agitation (Sanchez et al., 2001). L'influence de la vitesse d'agitation résiderait ainsi dans la fragmentation des gouttelettes de coacervats formées. Ainsi, une vitesse minimale d'agitation permet de limiter les phénomènes de polynucléation. Une vitesse d'agitation maximale existe pour laquelle la formation de mousse est écartée. Ces vitesses sont dépendantes du système d'agitation utilisé et de la géométrie de la cuve (Lemetter et al., 2009). Les microcapsules mononucléaires sont formées à faible homogénéisation, tandis que les microcapsules multinucléaires sont formées à forte homogénéisation (Dong et al., 2011).

La **présence d'agents tensioactifs** a été étudiée pour le cas de l'encapsulation de composés hydrophobes. L'utilisation de SDS en tant que tensioactif anionique permet d'améliorer le rendement d'encapsulation. Celui-ci se comporte comme un polymère anionique avec lequel peut interagir un polymère cationique d'un couple polycationique/polyanionique. Une capsule se forme dans ce cas avec une membrane multi-couche (SDS-polymère cationique-polymère anionique). Dans l'étude de Guo, il a pu être montré que le contrôle de la concentration en SDS et de la vitesse d'agitation permettait de diminuer et centraliser la taille des capsules et d'accélérer le dépôt du coacervat gélatine/gomme arabique (Guo and Zhao,

2008). Dans son modèle, la microcapsule est formée d'une bi-couche, la première couche constituée par le SDS et la seconde couche le coacervat gélatine/gomme arabique. Les auteurs précisent tout de même que la concentration utilisée pour l'étude ne suffit pas à permettre une coacervation SDS/gélatine.

1.2.4.2. Le rôle de la réticulation dans le procédé de coacervation complexe

Les **agents réticulants** sont utilisés pour obtenir des microcapsules avec des propriétés thermo-mécaniques améliorées. Les agents réticulants de nature chimique comme les aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde), le glyoxal, le diisocyanate, l'épichlorohydrine et les polyamines sont traditionnellement utilisés comme agents réticulants. Les aldéhydes, notamment, se fixent de manière covalente aux groupements aminés libres déprotonés des protéines (réaction de base de Schiff) formant un réseau insoluble (Hernández-Muñoz et al., 2004). Ce réseau renforce la paroi de la microcapsule et facilite par conséquent leur séchage et augmente leur stabilité au stockage. Bien qu'efficaces dans les étapes de réticulations, ces agents de nature chimique tels que le glutaraldéhyde ou le formaldéhyde sont décrits comme toxiques pour le corps humain et considérés comme des réactifs non-alimentaires. Dans cette dynamique, des agents réticulants alternatifs d'origine naturelle, moins toxiques, biocompatibles et adaptés au domaine alimentaire sont recherchés. Parmi ces agents, la génipine, l'acide citrique, l'acide tannique et les composés phénoliques issus de plantes ont été largement étudiés. La génipine est un aglycone obtenu à partir de géniposide, un glycoside irridoïde extrait de fruits de *Guardenia jasminoides Ellis*. L'agent réagit spontanément avec les acides aminés ou les protéines (Liang et al., 2004). Les réactions de réticulation à partir de composés polyphénoliques conduisent à la formation de structures moléculaires rigides par réaction entre les orthoquinones et les protéines (Strauss and Gibson, 2004).

La **transglutaminase** est une enzyme non-toxique qui catalyse les réticulations intra- et intermoléculaires (ϵ -(λ -glutamyl)-lysyl) entre les protéines. La réaction enzymatique s'effectue dans des conditions douces. Les conditions optimales d'utilisation de l'enzyme comprennent une température de 20°C, un pH à 5,0 et un temps de réaction compris entre 15 et 24H (Tello et al., 2016). La transglutaminase permet de créer une liaison covalente entre un amide de résidu glutamique et une amine primaire de résidu lysine ou d'extrémités de chaîne, avec libération d'ammoniac. L'action de l'enzyme permet de transformer des protéines hydrosolubles en des composés de haut poids moléculaire peu solubles. Dans l'étude de Tello,

la transglutaminase a été utilisée comme réticulant au cours du process de coacervation complexe du système gélatine/gomme arabique (Tello et al., 2016). Il a pu être montré que la libération de l'actif était inversement proportionnelle à la concentration de transglutaminase utilisée et qu'elle permettait de maintenir l'intégrité de la paroi de la capsule en conditions gastriques simulées. L'auteur s'accorde toutefois à dire que la réticulation par la transglutaminase n'était pas aussi efficace que par réticulation chimique avec l'emploi de glutaraldéhyde.

1.2.4.3. Le séchage de coacervats complexes

Différentes méthodes permettent d'isoler les coacervats complexes du milieu réactionnel : une filtration simple, la déshydratation dans l'alcool ou en présence de silice, le séchage sous étuve, le séchage sous vide, la lyophilisation et le séchage par atomisation. Ces deux dernières méthodes sont les plus couramment utilisées.

Le séchage par atomisation permet d'obtenir des microparticules sphériques de granulométrie de 5 à 50µm, tandis que la lyophilisation produit des particules de formes et tailles irrégulières.

La lyophilisation permet de sécher des microcapsules avec des températures basses. Cette technique est pleinement adaptée aux actifs thermosensibles.

La morphologie particulière des particules obtenues par lyophilisation constitue un facteur limitant. Une masse solide de microparticules est formée au cours du procédé de lyophilisation, qui requiert une étape supplémentaire de broyage pour faciliter son utilisation. Toutefois, l'action mécanique à laquelle sont soumises les particules entraîne la dégradation de ces dernières et une libération immédiate de l'actif, exposé à l'environnement extérieur. Ce phénomène a notamment été mis en évidence au cours de l'encapsulation d'une huile essentielle d'orange par coacervation complexe entre des protéines de lait et trois polysaccharides différents (la carboxyméthylcellulose, l'alginate de sodium et le chitosan) (Rojas-Moreno et al., 2018). Les auteurs s'accordent sur une meilleure efficacité d'encapsulation par la lyophilisation, mais par souci de praticité, favorisent le séchage par atomisation en raison de l'étape de broyage à appliquer pour la lyophilisation favorisant une libération non souhaitée d'actif. Kaushik et al. ont également comparé l'efficacité des deux procédés pour l'encapsulation d'huile de lin par les protéines et gommex extraites de la même

graine. Les microcapsules séchées par atomisation présentait une meilleure efficacité d'encapsulation d'huile, une plus faible teneur en huile à la surface des particules et une stabilité plus importante à l'oxydation que les particules lyophilisées (Kaushik et al., 2016).

Le séchage par atomisation constitue ainsi une alternative compétitive à la lyophilisation par sa facilité de changement d'échelle et son faible coût pour des matières actives peu sensibles à la température.

1.2.4.4. Avantages et limites de la technique

La coacervation complexe appliquée à la microencapsulation se caractérise par une efficacité importante d'encapsulation et permet le développement d'un process à température ambiante. Pour cela, le choix de cette technique est favorisé pour la vectorisation de composés actifs thermosensibles. D'autre part, la matrice formée par les coacervats permet de piéger l'actif contre les stress provenant du milieu extérieur (lumière, oxydation, humidité). Cependant, la méthode est limitée par sa sensibilité au pH et à la force ionique. Dans le cas d'un coacervat formulé à partir de protéines, le pH doit être inférieur au point isoélectrique de la protéine, facteur limitant pour des actifs sensibles au pH acide. D'autre part, le changement de concentration en sel dans le milieu peut déstabiliser le système et entraîner une dissociation du complexe. L'obtention de coacervats moins sensibles est, par conséquent, nécessaire en augmentant la stabilité de la membrane formée autour de l'actif par réticulation des coacervats.

2. Biopolymères végétaux pour l'encapsulation d'un actif lipophile : l' α -tocophérol

2.1. Les biopolymères aux propriétés encapsulantes

2.1.1. Protéines de pois

Les protéines sont des biopolymères azotés composés d'un enchainement linéaire d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Cet enchainement, pouvant atteindre plusieurs milliers à plusieurs millions de daltons, possède une organisation tridimensionnelle particulière. Les protéines peuvent être distinguées en fonction de leur origine animale ou végétale. Les protéines animales sont décrites pour leurs qualités nutritionnelles, en principe, plus importantes que les protéines végétales, mais également pour leur coût élevé ([Alla Nesterenko, 2012](#)).

La source des protéines végétales est diversifiée, allant des graines protéagineuses aux céréales, en passant par les algues. Ces protéines présentent l'avantage d'être disponibles sur le marché à un coût abordable, en grandes quantités, renouvelables, biocompatibles et biodégradables ([Barac et al., 2010](#)). Récemment, elles ont été étudiées comme alternative aux protéines animales. Le principal modèle étudié est la protéine de soja pour sa richesse en éléments nutritionnels et sa disponibilité en volume produit et échangé. Avec une teneur en protéines équivalente à 40%, le soja constitue une source protéique potentielle dans le domaine de la nutrition ([Mujoo et al., 2003](#)). Les différentes applications développées dans le domaine agroalimentaire pour cette matière en font un composé de choix pour l'alimentation humaine, parfois au détriment d'autres sources de protéines végétales potentiellement intéressantes.

Cependant, la recherche évolue progressivement dans la valorisation des légumineuses, catégorie regroupant communément les fèves, haricots secs, lentilles ou encore le pois (*Pisum sativum*). Leur richesse en fibres, amidon, protéines, vitamines et minéraux en font une source alternative dans l'élaboration d'intermédiaires riches en protéines ([de Almeida Costa et al., 2006](#)). Les protéines de pois présentent notamment l'avantage d'être non-allergènes, et à haute valeur nutritive ([Gharsallaoui et al., 2012](#)) et présentent des propriétés émulsifiantes similaires aux protéines de soja ([Aluko et al., 2009](#)). Dans une logique de choix de matière première non-OGM d'origine européenne, la protéine de pois constitue un modèle d'étude intéressant dans l'élaboration d'une matrice encapsulante.

Les protéines de pois, extraites des graines de pois, peuvent être divisées en deux composantes majeures : les globulines (60 à 70%) et les albumines (20 à 30%). L'obtention de ces protéines implique des étapes d'extraction dans des conditions optimales de solubilité (pH, température), de purification (dialyse, précipitation, ultrafiltration, ...) et de séchage (par atomisation, lyophilisation, ...). Ces étapes affectent la qualité des protéines et déterminent leurs propriétés fonctionnelles.

Parmi les deux composantes majeures, les protéines globulaires (globulines) forment des structures oligomériques correspondant aux fractions 7S et 11S ([Fukushima, 1991](#)). Ces fractions se composent de légumine, dans le cas de la fraction 11S, et de vicilines et convicilines pour la fraction 7S ([Gueguen, 1983](#)). L'étude de plusieurs génotypes de pois a permis de mettre en évidence un rapport vicilline/légumine variant entre 2 et 4 ([Tzitzikas et al., 2006](#)). Les légumine 11S, présentant une structure hexamérique comprise entre 360 et 400 kDa et riche en feuillets β ([Tzitzikas et al., 2006](#)). La fraction 7S se caractérise par des glycoprotéines de structure trimérique et de poids moléculaire équivalent à 150 kDa. Les vicilines 7S présentent une structure trimérique comprenant trois sous-unités de 50 kDa et leur liaison ne fait pas intervenir de ponts disulfures. Ces sous-unités proviennent d'un même précurseur de 50 kDa ([Gatehouse et al., 1985](#)). Les convicilines 7S, dont la composition en acides aminés est proche des vicilines, consistent en un assemblage tétramérique et possèdent un poids moléculaire équivalent à 290 kDa dans leur forme native ([Croy et al., 1980](#)).

Le **Tableau 1** présente les compositions moyennes en acides aminés des différentes fractions des protéines de pois.

Les protéines de pois sont utilisées à des fins fonctionnelles principalement pour leurs propriétés émulsifiantes, dans le domaine des émulsions et de l'encapsulation d'actif. Pour former et stabiliser une émulsion, la protéine doit posséder des propriétés particulières telles que la diffusion rapide et l'adsorption à la phase nouvellement formée pendant l'homogénéisation ([Damodaran, 2006](#)).

L'équipe de Gharsallaoui s'est intéressée à l'encapsulation d'actifs liposolubles par des protéines de pois, en présence de maltodextrine comme support de séchage. La

maltodextrine est décrite comme un agent permettant de préserver les fonctionnalités de la protéine de pois durant le séchage ([Gharsallaoui et al., 2007](#)).

Les travaux d'Aberkane ont permis, quant à eux, d'utiliser des isolats de protéines de pois associés à de la pectine dans la microencapsulation d'une huile riche en acides gras polyinsaturés dans l'optique de minimiser l'oxydation lipidique ([Aberkane et al., 2014](#)).

Enfin, l'équipe de Tamm a étudié les propriétés émulsifiantes d'hydrolysats de protéines de pois en vue d'une encapsulation d'huiles nutritionnelles via un séchage par atomisation ([Tamm et al., 2016](#)).

Tableau 1: Composition en acides aminés des protéines de pois (Leterme et al., 1990).

	Farine de pois (%)	Albumines (%)	Globulines (%)
Acides aminés essentiels			
Arginine	6,84	4,09	8,08
Histidine	2,52	2,87	2,23
Isoleucine	3,33	4,43	4,74
Leucine	6,58	5,22	8,94
Lysine	6,84	10,33	7,01
Méthionine	1,03	0,97	0,61
Phénylalanine	4,19	4,55	5,49
Thréonine	3,59	4,52	3,24
Tryptophane	0,94	1,23	0,97
Valine	3,89	5,21	4,86
Acides aminés non essentiels			
Alanine	4,27	5,19	4,00
Acide aspartique	10,68	11,40	11,96
Cystéine	1,55	3,13	1,18
Acide glutamique	16,92	16,61	16,94
Glycine	4,32	6,41	3,84
Proline	3,76	5,38	4,47
Sérine	4,79	4,11	4,87
Tyrosine	3,16	4,32	3,40
TOTAL	89,20	99,97	96,83

Les interactions polysaccharides - protéines permettent également l'amélioration des propriétés moussantes et émulsifiantes de la protéine par interaction électrostatique, autrement dit sans modification chimique ([Liu et al., 2010](#)). La coacervation complexe,

impliquant ces interactions de nature électrostatiques, a été étudiée à partir de protéines de pois associées à des polysaccharides chargés de manière opposée.

Etude de la coacervation complexe à partir de protéines de pois

Le tableau suivant résume les différentes études réalisées sur la coacervation complexe de protéines de pois avec des polysaccharides (**Tableau 2**).

Tableau 2: Application de la coacervation complexe aux mélanges protéines de pois - polysaccharides.

Protéine	Polysaccharide	Ratio	Gamme pH	Ratio optimal	pH optimal	Référence
Globulines de protéines de pois	Gomme arabique	1 :9 – 9 :1	2.5 - 4.0	1 :1	3.5	(Ducel et al., 2004)
Isolat de protéines de pois	Gomme arabique	2 :1	2.40 - 4.30	2 :1	3.60	(Liu et al., 2010)
Isolat de protéines de pois	Chitosan	1 :1 - 20 :1	2.9 – 9.0	15 :1	5.7	(Elmer et al., 2011)
Isolat de protéines de pois	Alginate de sodium	1 :1-20 :1	1.5 - 7.00	4 :1	~ 2.7	(Klemmer et al., 2012)
Isolat de protéines de pois	Alginate propylène glycol	1 :1-5 :1	2 .0 - 8.0	3 :1	4.0	(Guo et al., 2019)
Isolat de protéines de pois	Pectine	1:1 – 15 :1	1.5 – 8.0	4 :1	3.4 – 3.5	(Warnakulasuriya et al., 2018)
Protéines de pois	Gomme mesquite	5 :1 – 1 :5	3.0 – 7.0	1 :3	5.0	(Cuevas-Bernardino et al., 2018)

Liu *et al.* ont permis de montrer, sur le modèle protéines de pois/gomme arabique, que les transitions critiques de formations de complexes solubles/insolubles n'étaient pas affectées par la présence de sel pour des concentrations inférieures à 7,5mM (Liu et al., 2009). Pour des concentrations supérieures (7,5-50mM), les phénomènes d'agrégation protéines-protéines prédominent sur les interactions protéines-polysaccharides.

Klemmer *et al.* ont étudié le couple protéines de pois/alginate de sodium et n'ont constaté aucun changement dans la structure secondaire des protéines de pois au cours de la complexation avec l'alginate de sodium (Klemmer et al., 2012).

En présence de polysaccharides cationiques comme le chitosan, Elmer *et al.* ont montré un décalage des événements de formation de structures solubles et insolubles avec l'augmentation du pH, tendant à obtenir les propriétés de la protéine de pois seule (Elmer *et al.*, 2011). La complexation du couple implique une interaction entre les chaînes de chitosan et les molécules de protéines de pois individuelles ou sous forme de petits clusters entraînant une modification de la conformation tertiaire des protéines de pois.

Ces différentes études exploratoires sur l'interaction entre les protéines de pois et les polysaccharides ont permis d'aboutir à des applications des complexes formés pour la microencapsulation d'actifs.

Application de la microencapsulation par coacervation complexe à partir de protéines de pois

Le tableau suivant décrit différents exemples d'étude de coacervation complexe entre la protéine de pois et des polysaccharides pour des applications de microencapsulation d'actifs (**Tableau 3**).

Tableau 3: Application de la coacervation complexe à base de protéines de pois à la microencapsulation.

Protéine	Polysaccharide	Actif	Ratio Protéine-polysaccharide	pH optimal	Ratio actif/enrobant	Référence
Globulines de pois	Gomme arabique	Triglycérides	1 :1	3,5	30 :70	(Ducel <i>et al.</i> , 2004)
Protéines de pois	Alginate	Probiotique	4 :0,6	7,0	-	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Protéines de pois	Alginate avec ou sans enrobage chitosan	Probiotique	2 :0.5	7,0	2,5 :2	(Varankovich <i>et al.</i> , 2017)
			2 :0.5 :0,4	-	2,9 :2	
Protéines de pois	Pectine	Huile de graines de chanvre	5 :1	3,5	1 :2	(Lan <i>et al.</i> , 2020a)

L'interaction électrostatique entre les protéines de pois et des polysaccharides chargés négativement a été principalement appliquée à la microencapsulation d'actifs de nature lipophile. Les capacités émulsifiantes des protéines de pois permettent d'encapsuler l'actif lipophile sous forme d'une émulsion. Le polysaccharide est ensuite ajouté et le pH ajusté,

favorisant la coacervation complexe entre les deux biopolymères. Les travaux de Duce *et al.* ont comparé la capacité des protéines de pois à former des coacervats complexes avec différents polysaccharides (gomme arabique, alginate de sodium, carboxyméthylcellulose) à une protéine extraite de blé : l' α -gliadine (Duce *et al.*, 2004). L'étude a permis de mettre en évidence que les protéines de pois étaient capables de former des coacervats complexes tout comme l' α -gliadine avec les différents polysaccharides. Elle présente selon l'auteur l'avantage d'être non-allergène par rapport à la protéine de blé. L'association protéines de pois-gomme arabique permettait de former des coacervats complexes avec un rendement optimal, tout en préservant la capacité émulsifiante des protéines de pois pour l'encapsulation de triglycérides.

Plus récemment, des études ont permis d'encapsuler des actifs de nature lipophile en associant la protéine de pois avec la pectine (Lan *et al.*, 2020). L'étude a notamment permis de mettre en évidence la stabilité à l'oxydation de l'huile de graines de chanvre en présence des coacervats.

La formulation de protéines de pois en présence d'alginate de sodium a été étudiée pour encapsuler des bactéries sensibles aux milieux à pH acide en vue de les protéger de la phase supérieure du tractus digestif, à savoir du pH acide de l'estomac, et de les libérer dans l'intestin (Varankovich *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Les microcapsules formulées pour des applications d'encapsulation de probiotiques sont produites principalement par extrusion – réticulation en présence de chlorure de calcium. Dans l'étude de Varankovich, les microcapsules de protéines de pois – alginate, enrobées de chitosan, ont permis de préserver une quantité importante de cellules viables issues des souches *L. rhamnosus* et *L. helveticus* dans des conditions de stockage réfrigéré, d'améliorer la viabilité de ces cellules soumises aux conditions du tractus digestif (Varankovich *et al.*, 2017).

D'autres sources végétales de protéines ont également été explorées dans le cadre de l'étude de la coacervation complexe en interaction avec des polysaccharides.

Autres exemples de couples de source végétale

La protéine de soja est la source végétale la plus utilisée en coacervation tandis que les protéines de pois, canola et de graines de lin ont une utilisation plus limitée. Parmi les différentes applications, des coacervats à base de protéines de soja associées à la pectine ont

permis d'encapsuler un hydrolysate de caséine en vue de diminuer l'hygroscopicité et atténuer l'amertume de l'hydrolysate ([Mendanha et al., 2009](#)). Un extrait de propolis a également été encapsulé par le couple protéines de soja - pectine dans le but de préserver l'activité antioxydante des composés phénoliques et flavonoïdes présents ([Nori et al., 2011](#)). Dans d'autres études, les protéines de soja ont été complexées par interactions électrostatiques avec la gomme arabique pour encapsuler de l'huile essentielle d'orange ([Jun-xia et al., 2011](#)) ou de PUFA ([de Conto et al., 2013](#)). Enfin, des coacervats protéines de soja – chitosan ont permis d'encapsuler de l'huile extraite d'algue en vue d'améliorer la stabilité de l'actif à l'oxydation. La structure du coacervat a été décrite comme un réseau interconnecté similaire à un gel formant une barrière à l'oxygène après coacervation et réticulation. Les microcapsules présentaient une meilleure efficacité d'encapsulation, une polydispersité plus faible et une meilleure stabilité à l'oxydation que des microcapsules à base de protéines de soja seules. Des protéines de blé, plus précisément l' α -gliadine, ont été utilisées pour former des coacervats avec de la gomme arabique en vue d'encapsuler des triglycérides ([Ducel et al., 2004](#)). Des protéines de lin ont été complexées avec de la gomme extraite de lin par coacervation complexe pour encapsuler de l'huile de lin ([Kaushik et al., 2016](#)). Dans cette étude, les microcapsules séchées par atomisation présentent une meilleure efficacité de microencapsulation d'huile, une morphologie de surface plus lisse et une meilleure stabilité d'oxydation que les microcapsules lyophilisées. De même, des coacervats issus d'isolats de protéines de graines de chia et de gomme de graines de chia ont permis d'améliorer la stabilité à l'oxydation d'huile de graine de chia encapsulée ([Timilsena et al., 2016](#)). Le tableau suivant résume les conditions optimales de formation des coacervats complexes ainsi que le point isoélectrique de chaque protéine utilisée (**Tableau 4**).

Tableau 4: Application de la coacervation complexe à partir de biopolymères d'origine végétale à la microencapsulation d'actifs hydrosolubles ou liposolubles

Couple	Actif encapsulé	Ratio Protéine-polysaccharide	pH	Point isoélectrique protéine	Référence
Protéines de soja et pectine	Hydrolysate de caséine	1 :1	4,4	4,20*	(Mendanha et al., 2009)
Protéines de soja et pectine	Extrait de propolis	1 :1	4,0	4,20*	(Nori et al., 2011)

Protéines de soja et gomme arabique	Huiles essentielles d'orange	1 :1	4,0	4,20*	(Jun-xia et al., 2011)
Protéines de soja et gomme arabique	Esters éthyliques d'acides Oméga 3	1,8 :1	4,0	4,20*	(de Conto et al., 2013)
α-gliadine et gomme arabique	Miglyol 812N	1 :1	3,0	6,45	(Ducel et al., 2004)
Protéines et gommes extraites de graines de lin	Huile de lin	3 :1	3,1	4,2	(Kaushik et al., 2016)
Protéines et gommes extraites de graines de chia	Huile extraite de graines de chia	6 :1	2,7	3,0	(Timilsena et al., 2016)

*Valeur de point isoélectrique de protéines de soja obtenue de l'équipe de Csonka (Csonka et al., 1926)

Comparativement aux différentes protéines végétales, la protéine de pois présente un point isoélectrique proche de la protéine de soja (pH 4,5 et 4,2 respectivement).

L'étude de Claessens *et al.* a permis d'identifier le profil en acide aminé d'hydrolysats des protéines végétales (Claessens et al., 2009) (**Tableau 5**).

D'après ces profils, la différence de point isoélectrique est dépendante de la composition en acide aminés chargés positivement ou négativement. La composition légèrement supérieure en lysine de la protéine de pois en fait une source intéressante pour l'établissement d'interactions électrostatiques avec les charges négatives des polysaccharides en solution.

Ces similitudes de propriétés avec la protéine de soja en font de la protéine de pois une alternative de choix pour l'étude de coacervation complexe en association avec des polysaccharides chargés négativement de par ses propriétés non-allergènes et son origine non-OGM.

Tableau 5: Profil des acides aminés d'hydrolysats de protéines végétales

Acides aminés	Pois	Soja	Gluten (blé)
Acide aspartique + asparagine	11.7	12.1	2.5
Sérine	5.7	5.2	5.2
Acide glutamique + glutamine	19.9	19.7	38.4
Histidine	2.4	2.5	1.9
Glycine	4.0	4.3	3.3
Thréonine	4.0	3.9	2.4
Arginine	9.8	7.4	2.6
Alanine	5.4	4.4	2.2
Tyrosine	3.7	3.1	3.0
Valine	3.9	3.9	3.6
Méthionine	0.9	1.2	1.3
Isoleucine	3.4	3.7	3.1
Phénylalanine	4.6	4.9	5.7
Tryptophane	0.4	1.3	1.2
Leucine	7.3	7.5	6.7
Lysine	8.4	6.6	1.2
Proline	4.0	6.4	14.7
Cystéine	0.6	2.2	1.1

2.1.2. Les gommes naturelles et polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères complexes consistant en l'enchaînement d'unités monosaccharidiques liées entre elles formant des chaînes linéaires ou ramifiées. Parmi les polysaccharides, les gommes naturelles constituent des matériaux abondants dans la nature. Ces hydrocolloïdes, d'origine végétale ou microbienne, sont peu coûteux, non-toxiques, abondants et biodégradables. En fonction de la source, les gommes peuvent être classées en tant que gommes microbiennes, gommes issues d'exsudats ou de graines de plantes.

Les gommes sont largement utilisées en tant qu'agents épaississants. Elles présentent pour la plupart des propriétés gélifiantes.

Structurellement, les gommes naturelles sont constituées d'un mélange de chaînes de tailles variables et sont considérées, à ce titre, comme des matières premières non-standard. Les chaînes de polysides sont linéaires (amylose, agar, alginate, carraghénanes) ou ramifiées (pectines, gomme guar, gomme arabique, gomme adragante), plus ou moins flexibles, et avec un poids moléculaire important. Ces chaînes peuvent être constituées d'un seul ou plusieurs

types de monomères, chargés ou neutres. Les charges généralement portées sont de type sulfaté $-\text{OSO}_3^-$ (carraghénanes) ou carboxylate $-\text{COO}^-$ (alginate, pectine, gomme arabique, ...).

2.1.2.1. Alginate de sodium

Les alginates proviennent principalement de deux sources : les algues et les bactéries. Les alginates disponibles dans le commerce sont extraits d'algues brunes, incluant *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* et *Macrocystis pyrifera*. Les alginates isolés de bactéries comme *Azobacter* et *Pseudomonas* ne sont pas économiquement viables pour des applications commerciales et leurs applications se concentrent principalement à l'échelle du laboratoire à destination de la recherche (Cote and Krull, 1988; Rehm and Valla, 1997). Les productions d'algues en vue de leur commercialisation impliquent des extractions alcalines. Brièvement, les algues brunes sont collectées, séchées et soumises à différents traitements chimiques pour éliminer les impuretés (métaux lourds, endotoxines, protéines, polyphénols et autres sucres). Le produit fini est ensuite commercialisé en poudre sous sa forme acide ou saline.

L'alginate est un copolymère linéaire extrait d'algues brunes. Sa structure se caractérise par un enchaînement de résidus d'acides α -L-guluroniques (bloc G) et β -D-mannuroniques (bloc M) liés entre eux par des liaisons glycosidiques 1 $\rightarrow$ 4 (Gåserød et al., 1998). Ces résidus, présentant des arrangements structuraux distincts, forment trois formes différentes de segments : des segments d'homopolymères MM et GG pouvant être alternés avec des segments aux structures alternées MG (**Figure 16**). Le nombre de ces unités varie de 100 à 3000. La composition de la chaîne, le poids moléculaire et le nombre de séquences déterminent les propriétés physico-chimiques de l'alginate. Les alginates de bas ou haut poids moléculaire disponibles dans le commerce présentent un poids moléculaire variant entre 32 kDa et 400 kDa (Venkatesan et al., 2015). La présence de groupements acides carboxyliques au sein de sa structure fournit à l'alginate des charges négatives pour une large gamme de pH. Les constantes de dissociation (pKa) des acides guluroniques et mannuroniques sont respectivement de 3,65 et 3,38. Les groupements acides carboxyliques présents le long de la chaîne confèrent à l'alginate une densité de charge différente en fonction du pH. L'alginate de sodium se dissout dans l'eau en formant une solution avec une viscosité élevée en raison de la présence des charges et du volume hydrodynamique des chaînes. La viscosité de la solution est influencée par les conditions opératoires (pH, température et force ionique) ainsi que par

la structure de l'alginate (masse moléculaire). La viscosité de la suspension d'alginate diminue avec l'acidification du milieu en raison de la réduction de la dissociation ionique entre les groupements acides carboxyliques.

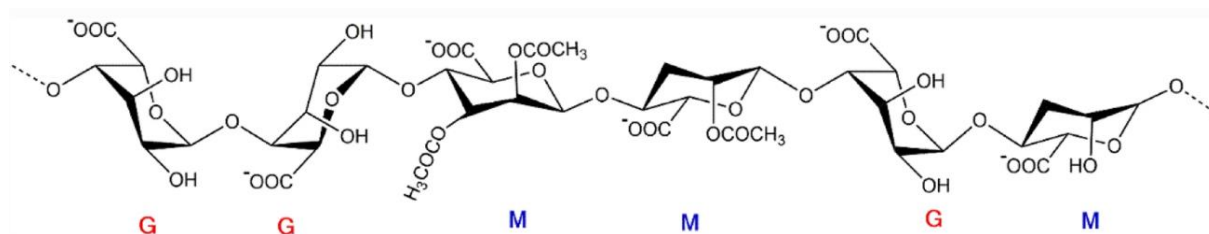


Figure 16: Structure chimique de l'acide alginique et des monomères qui la compose (blocs G, M et GM) (Abasalizadeh et al., 2020).

2.1.2.2. Gomme arabique

La gomme arabique, ou gomme d'acacia, est un exsudat extrait de l'arbre *Acacia Senegal* ou *Acacia seyal*. Cet arabinogalactane comprend des arrangements fortement ramifiés de D-galactose, d'acide D-glucuronique, de L-rhamnose et de L-arabinose. La chaîne principale et les chaînes ramifiées sont constituées d'unités (1-3) β -D-galactopyranosyle liées à la chaîne principale par des liaisons (1-6) (**Figure 17**). Cet exsudat présente une faible quantité en protéines (de l'ordre de 2%) (Dickinson, 2003), variant en fonction de la source, des conditions géographiques et de l'âge de l'arbre (Idris et al., 1998). L'étude d'Idris et al. (1998) met notamment en évidence que la gomme arabique est composée de 39-42% de galactose, 24-27% d'arabinose, 12-16% rhamnose, 15-16% d'acide glucuronique (Idris et al., 1998).

La gomme arabique peut être séparée en trois fractions nommées respectivement AG pour la fraction arabinogalactane, AGP pour la fraction arabinogalactane-protéique et GP pour la fraction glycoprotéique (Randall et al., 1989).

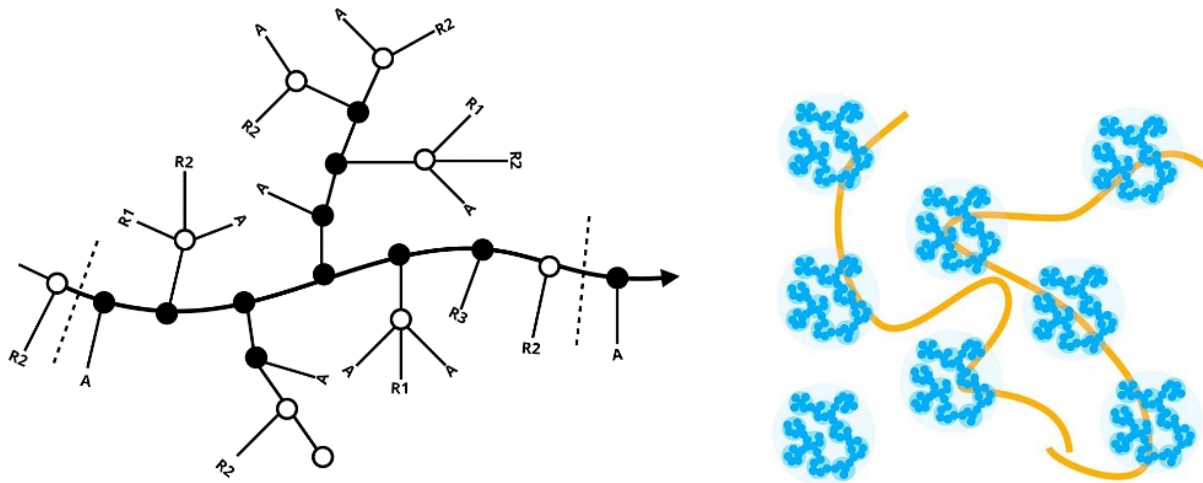


Figure 17: Structure chimique de la gomme arabique (à gauche) et de la structure "wattle-blossom" (à droite) (Atgié et al., 2019; Islam et al., 1997). Légende de la structure chimique de la gomme arabique : A – Arabinosyle ; R1 – Rhamnose-Acide glucuronique ; R2 – Rhamnose-galactose-3-arabinose ; R3 – Arabinose-3-Arabinose-3-Arabinose ; ● – galactose lié en 3- ; ○ – Galactose lié en 6- (galactose ou acide glucuronique).

La fraction AG constitue 80-85% de la masse totale de la gomme arabique et présente un poids moléculaire de 200-300 kDa. Sa teneur en protéines ne représente que 0.35% du total de la gomme. C'est une fraction polysaccharidique très ramifiée en blocs compacts.

La fraction AGP représente moins de 15% de la masse totale de la gomme arabique. Elle présente un poids moléculaire élevé : 1500-2000kDa. Elle contient 12% de la teneur totale en protéines. Cette fraction a été décrite comme présentant une structure globulaire dite « wattle-blossom » : un assemblage d'une chaîne polypeptidique de plus de 1600 acides aminés sur laquelle sont reliés 5 résidus glucidiques de 180 à 280 kDa (**Figure 17**). La structure polysaccharidique est liée de manière covalente aux résidus proline et sérine (Fincher et al., 1983; Mahendran et al., 2008). Cette structure complexe inclue différentes structures secondaires (structures polyproline II, feuillets β , coudes β et des structures non-ordonnées) (Renard et al., 2006).

La fraction GP, représentant moins d'1% de la masse totale de la gomme arabique, contient 50% de la teneur en protéines. Les résidus galactose de cette fraction sont liés à la sérine des protéines.

La gomme arabique est connue pour ses propriétés stabilisantes (Gavlighi et al., 2013), filmogènes, et présente de nombreuses applications dans les domaines agroalimentaires et pharmaceutiques (Comunian and Favaro-Trindade, 2016).

2.1.2.3. Gomme tara

La gomme tara, ou caroube péruvienne, est obtenue des graines de *Caesalpinia spinosa*, arbre de la famille des fabacées. La fraction majeure est composée de polysaccharides de type galactomannane, constitués d'une chaîne linéaire d'unités β -(1-4) D-mannopyranose ramifiée avec des chaînes d'unités α -(1-6) D-galactopyranose (Rutz et al., 2013) (Figure 18). La gomme tara est similaire à la gomme guar et la gomme caroube en termes de structure et de fonctionnalités. Elles se différencient toutefois par leur ratio mannose/galactose équivalent respectivement à 3 :1, 2 :1 et 4 :1 (Wu et al., 2017).

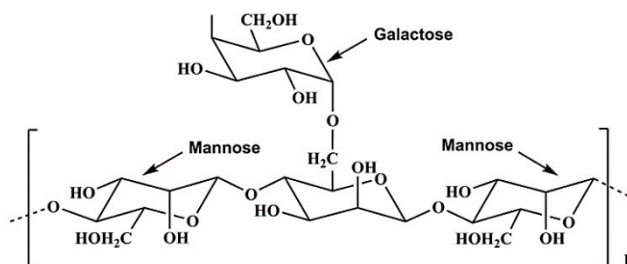


Figure 18: Structure chimique de la gomme tara (Wu et al., 2018).

L'utilisation de cette gomme permet l'élaboration de solutions visqueuses avec des propriétés filmogènes, gélifiantes et stabilisantes permettant d'écarter tout phénomène de synérèse (Santos et al., 2019). Ces similarités font de cet exsudat une alternative à la gomme guar et à la gomme caroube (Dakia et al., 2008). Le faible ratio en galactose au sein de sa structure entraîne des limitations pour des fonctions de barrière mécanique et d'humidité (Antoniou et al., 2015). Pour ses raisons, elle est souvent associée à d'autres biopolymères comme le chitosan.

2.1.2.4. Gomme adragante

La gomme adragante est une gomme anionique d'origine iranienne extraite de la sève des branches de différentes espèces d'*Astragalus* (Nur and Vasiljevic, 2017). Elle est composée d'une fraction insoluble appelée bassorine (60-70% de la gomme), et d'une fraction hydrosoluble appelée tragacanthine (20-30% de la gomme). Ce galactane hétérogène et fortement ramifié est composé de D-galactose, d'acide D-glucuronique, de D-xylose, de L-

fucose et de L-arabinose. La proportion en sucre varie en fonction des gommages obtenues des différentes espèces d'*Astragalus* (Balaghi et al., 2011).

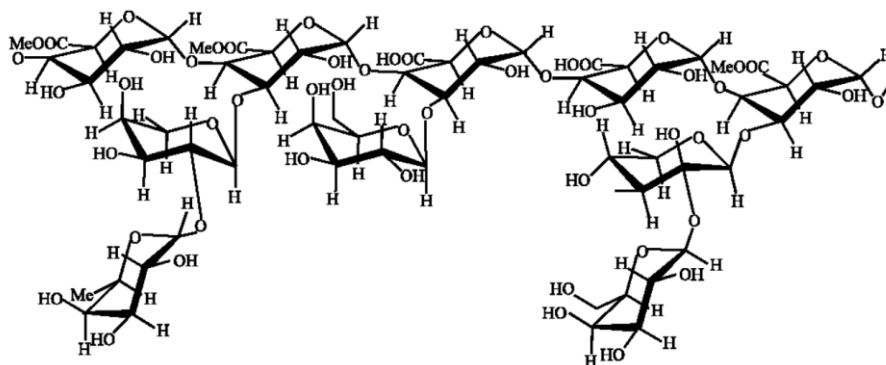


Figure 19: Structure chimique de l'acide tragacanthique (Khajavi et al., 2007).

La tragacanthine (composée d'acide uronique et d'arabinose) correspond à la fraction soluble de la gomme (**Figure 19**). La bassorine, un arabinogalactane, correspond à la fraction neutre de la gomme adragante et se caractérise principalement par la présence d'ester méthylique d'acide D-galacturonique à la place des résidus acides (Mayes, 2009).

Au cours de l'hydratation de la gomme adragante, la tragacanthine, soluble dans l'eau, forme un hydrolat colloïdal visqueux tandis que la bassorine (fraction insoluble) gonfle pour former un gel. La viscosité de la bassorine est plus importante que celle de la tragacanthine dans les mêmes conditions.

La gomme adragante, considérée comme un matériau pseudo-plastique, présente un comportement de fluide non-newtonien (Gavlighi et al., 2013).

Etant donné la quantité importante de groupements acides carboxyliques, la viscosité du matériau varie en fonction de la force ionique et du pH, avec une viscosité importante entre pH 5 et 6. La viscosité de la gomme adragante diminue avec l'acidification du milieu en raison de la réduction de la dissociation ionique entre les groupements acides carboxyliques (Silva et al., 2017).

La gomme adragante est décrite comme très résistante à l'acide (López-Franco et al., 2009) et possède des propriétés mucoadhésives (Nur et al., 2016). Le polymère est capable de former un gel en présence d'acide et permet donc de vectoriser un principe actif et de le protéger contre le système gastrique. Elle est également décrite comme stable au pH et aux attaques

microbiennes. La gomme adragante présente différentes applications dans le domaine de l'alimentation (Jafari et al., 2018), pharmaceutique (Ranjbar-Mohammadi and Bahrami, 2016) ou encore en cosmétique en tant qu'émulsifiant, stabilisant et épaississant (Farzi et al., 2013; Saffari et al., 2013). La gomme adragante peut également être appliquée au domaine médical avec la cicatrisation des plaies étant donné ses propriétés de gels et l'absence d'effets toxiques, allergènes, tératogènes et carcinogènes sur le corps humain (Fayazzadeh et al., 2014; Ghayempour et al., 2016).

La gomme adragante est reconnue comme sûre (Generally Recognized As Safe) par la Food and Drug Administration (FDA), conformément aux bonnes pratiques de fabrication ou d'alimentation. Elle est également classée GRAS à une proportion de 0,2 à 1,3% dans les denrées alimentaires aux États-Unis depuis 1961 et incluse dans la liste des additifs approuvés par le comité scientifique de l'alimentation de la Communauté européenne (Anderson and Bridgeman, 1985).

2.2. La vitamine E en tant qu'actif lipophile

Une vitamine est un composé organique essentiel aux fonctions physiologiques normales d'un organisme. Elle est nécessaire en faible concentration puisqu'elle ne peut être synthétisée ou pas suffisamment par l'organisme. Une carence en vitamine peut entraîner la mort de ce dernier.

Structure chimique

Les tocochromanols, désignés plus couramment comme vitamine E, comprennent huit molécules composées d'un groupement aromatique chromanolol et d'une chaîne latérale phytol. Parmi ces molécules, se distinguent quatre tocophérols (α , β , γ , δ) et quatre tocotriénols (α , β , γ , δ) par la présence d'une chaîne latérale saturée pour le premier groupe tandis que le second possède trois doubles liaisons(**Figure 20**). Les quatre formes α , β , γ , δ se différencient chimiquement par le nombre et la position des groupements méthyles du noyau aromatique. La structure se caractérise également par la présence de trois carbones asymétriques, permettant ainsi la formation de 8 stéréoisomères. La forme RRR- α -tocophérol est la plus répandue dans la nature et possède la plus haute activité biologique. Pour les autres formes de tocophérols, β et γ présentent une activité réduite (15-30%) et δ est pratiquement

inactive. Parmi les tocotriénols, seules les formes α et β présentent une activité significative (Reboul, 2017).

La structure chimique de la vitamine E, particulièrement l' α -tocophérol, facilite la protection des lipides membranaires contre l'oxydation en piégeant deux radicaux peroxy impliqués dans l'initiation de l'oxydation des lipides. La réaction génère des hydroperoxides, désactivables par des enzymes, et un radical tocophéryl qui peut être régénéré par la vitamine C ou la coenzyme Q10.

Les tocols estérifiés semblent plus stables contre l'oxydation que les formes non estérifiées de la vitamine E. Différentes formes d'ester de vitamine E sont disponibles sur le marché tels que l'acétate de vitamine E, le succinate de vitamine E ou encore le polyéthylène glycol-1000 succinate de vitamine E (TPGS₁₀₀₀)

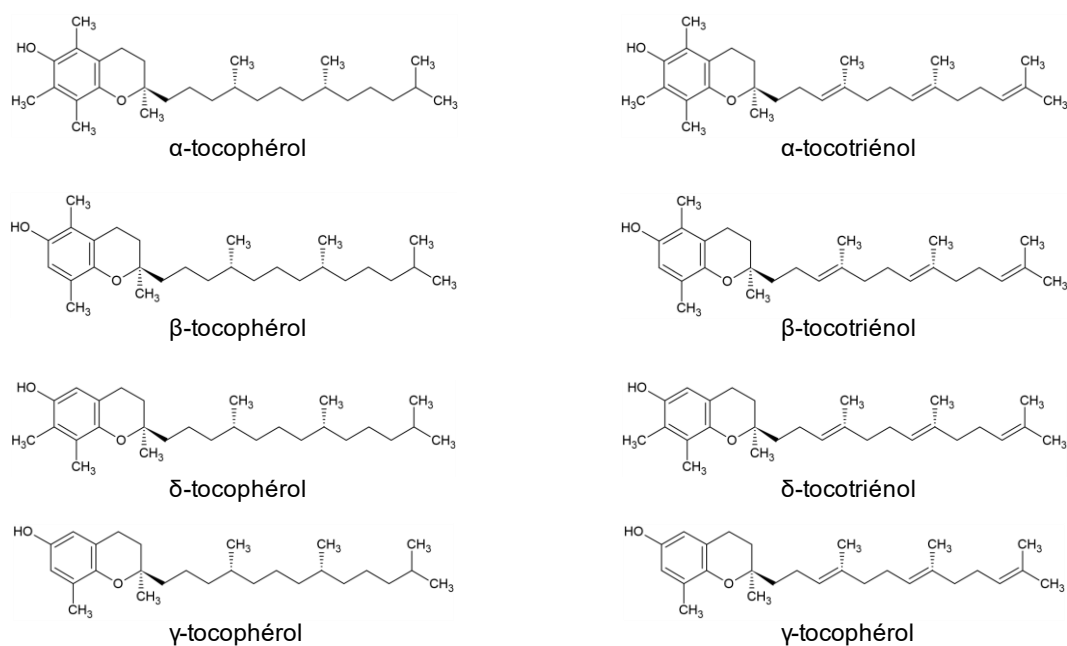


Figure 20: Structure chimique des vitamines de vitamine E.

Sources

Ces antioxydants de nature lipophile sont synthétisés majoritairement par les organismes photosynthétiques, et particulièrement par les feuilles des plantes. L' α -tocophérol pur naturel est produit à partir d'extraits de cultures oléagineuses.

Historique

Les premiers travaux d'une équipe de chercheurs de l'Université de Californie ont permis en 1922 de découvrir l'implication de la vitamine E en tant que facteur diététique essentiel à la reproduction des rats. La vitamine E a été isolée en 1936 de germes de blé par la même équipe et sa structure élucidée quelques années après. Le terme tocophérol provient du grec *tokos*, signifiant progéniture/naissance et du terme *pherein*, signifiant porter/supporter ([Saldeen and Saldeen, 2005](#)).

Activité physiologique

La vitamine E présente de nombreuses fonctions incluant des effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-thrombolytiques, anti-cancéreux.

Son effet anti-inflammatoire est basé sur l'inhibition de la lipoxygénase, responsable de la formation de leukotriènes causant des inflammations. Elle peut être utile pour le traitement de l'asthme ou encore de l'arthrite.

Apport nutritionnel

Aux Etats-Unis, l'apport nutritionnel recommandé est de 15mg de vitamine E chez l'adulte, tandis qu'en Europe, elle est de 11 mg pour les femmes et 13 mg pour les hommes ([Medicine, I.O., 2000](#)).

Application des techniques de microencapsulation de la vitamine E

La vitamine E et plus spécifiquement l' α -tocophérol est un antioxydant liposoluble majeur dans le corps, permettant la protection des membranes cellulaires et autres lipides contre l'oxydation. Elle permet de réduire la formation d'hydroperoxydes et retarde la phase initiale du phénomène d'oxydation ([Atkinson et al., 2008](#)). Toutefois, l'incorporation de vitamine E au sein d'aliments de nature aqueuse, tout en conservant son activité, présente des contraintes, d'autant plus que la molécule est facilement oxydable par l'air. Cette réaction est catalysée par la lumière ou la chaleur en présence de métaux comme l'argent ou le fer. La microencapsulation de l' α -tocophérol représente une alternative possible pour le transport, le stockage et son utilisation dans des procédés industriels ([Gamboa et al., 2011](#)). Le tableau

suivant résumé des exemples d'applications des différents procédés de microencapsulation de l' α -tocophérol dans la littérature (**Tableau 6**) :

Tableau 6: Procédés de microencapsulation de l' α -tocophérol

Matière encapsulante	Actif	Procédé	Ratio matière encapsulante / actif	Références
Protéines de soja (acylée)	α -tocophérol	Emulsion / Séchage par atomisation	2 :1	(Nesterenko et al., 2012)
Protéines de tournesol	α -tocophérol	Emulsion / Séchage par atomisation	2 :1	(Nesterenko et al., 2013)
Galactomannane / gomme arabique	Vitamine E	Emulsion / Séchage par atomisation	85 :15	(Tarigan et al., 2018)
Maltodextrine / gomme arabique	α -tocophérol	Emulsion / Séchage par atomisation	3 :1	(Quintanilla-Carvajal et al., 2014)
Zéine de maïs / β -cyclodextrine	α -tocophérol	Séchage par atomisation	9 :1	(Saldanha do Carmo et al., 2017)
Gliadine de blé	α -tocophérol	Désolvatation / Lyophilisation	9 :1	(Duclairoir et al., 2002)
Pectine / Alginate de sodium	α -tocophérol	Gélification ionique	4,5 :1	(Singh et al., 2018)
Zéine de maïs / chitosan	α -tocophérol	Désolvatation / Lyophilisation	10 :1	(Luo et al., 2011)
Amidon octényle succinate	Vitamine E	Nano-émulsion / Séchage par atomisation	2 :3	(Hategekimana et al., 2015)
Maltodextrine / Caséinate de sodium	Vitamine E	Emulsion / Lyophilisation	2 :1	(Lazim N.A.M. and Muhamad I.I., 2017)
Maltodextrine / Caséinate de sodium	Palm Vitamine E	Emulsion / séchage par atomisation	1 :1	(Selamat et al., 2018)

Huile de soja hydrogénée / Huile de soja	α -tocophérol	Spray-chilling	9 :1	(Gamboa et al., 2011)
Protéines de lait	α -tocophérol	Nano émulsion / Spray freeze- drying	3 :1	(Parthasarathi and Anandharamakrishnan, 2016)
Acide poly-L- lactique	Vitamine E	Emulsion / évaporation de solvant	3 :1	(Chaiyasat et al., 2013)

3. Application des microcapsules pour la libération contrôlée d'actifs par voie orale

Un principe actif peut être administré par différentes voies : locale (transmucosale), entérale (orale, rectale, sublinguale) ou parentérale (injectable). La voie orale constitue une voie d'administration de choix pour la vectorisation de compléments alimentaires, de par sa simplicité et son confort d'utilisation (facilité d'emploi, absence de douleur au cours de la prise et réduction du risque infectieux). Le vecteur transportant la substance active doit néanmoins répondre à certaines exigences, notamment la solubilisation du principe actif dans le tube digestif, son absorption au travers de la barrière gastro-intestinale et sa distribution à travers l'organisme jusqu'à sa cible. Cette partie fera l'objet d'une présentation du modèle de digestion gastro-intestinal monogastrique en prenant comme exemple le cas de l'humain.

3.1. Parcours digestif d'un principe actif chez les monogastriques

Le tractus gastro intestinal (TGI) (**Figure 21**) a pour rôle la dégradation des aliments en nutriments assimilables par l'organisme par l'action de divers enzymes.

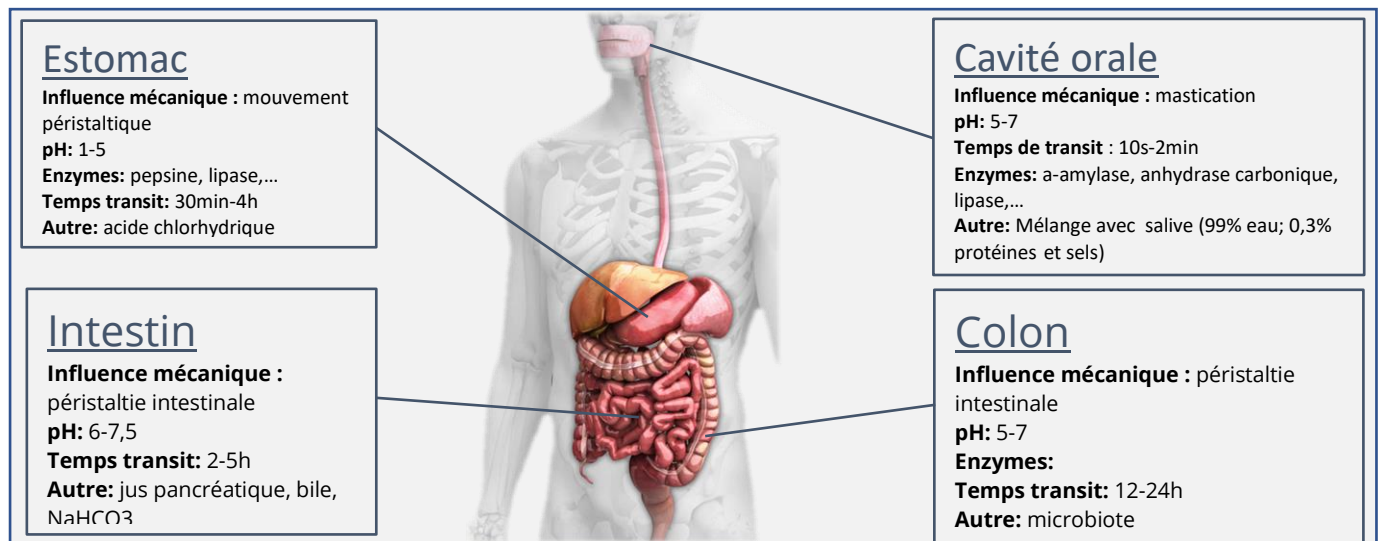


Figure 21: Système gastro-intestinal chez les monogastriques.

3.1.1. La digestion buccale

La digestion débute par la mastication et le broyage des aliments via les dents et la langue, l'imprégnation et le début de l'hydrolyse du bol alimentaire par la salive. Sécrétée par les glandes salivaires, la salive humaine est un fluide complexe composée majoritairement d'eau, combinée à des électrolytes, des minéraux, des protéines et glycoprotéines ([Malallah et al.,](#)

2018; Sudhakar et al., 2006). La salive contient des enzymes comme l' α -amylase chargée de l'hydrolyse des liaisons glycosidiques 1-4 de l'amidon, les lysozymes qui ont un rôle de protection par la digestion de la paroi cellulaire bactérienne, et des lipases permettant l'hydrolyse lipidique. Le pH normal de la salive varie entre 5,6 et 7 (Sudhakar et al., 2006). Le produit de ces dégradations mécaniques et enzymatiques est ensuite transporté dans l'œsophage par des mécanismes péristaltiques avant d'atteindre l'estomac.

3.1.2. La digestion gastrique

La digestion gastrique est modulée par les sécrétions et l'action mécanique des parois de l'estomac. Dans la partie proximale de l'estomac, le bol alimentaire entre en contact avec le jus gastrique. Ces sécrétions sont composées d'acide chlorhydrique produit par les cellules pariétales, rendant le milieu très acide et favorisant l'hydrolyse protéique. Des enzymes sont également présentes comme la pepsine (produite à partir de sécrétion de pepsinogène, un précurseur sécrété par les cellules peptiques), ou encore les lipases permettant l'hydrolyse lipidique. Le mucus, recouvrant les parois de l'estomac et chargé en bicarbonate, permet de protéger l'organe de ces conditions agressives. Au niveau des parois de l'estomac, le pH est équivalent à 7. Les mouvements péristaltiques de la partie distale permettent de réduire la taille des gros fragments du bol alimentaire par broyage (Guerra et al., 2012). Les petits fragments du bol produits par l'hydrolyse acide et enzymatique, appelés également le chyme, sont ensuite conduits vers le duodénum.

3.1.3. La digestion entérique

Le chyme provenant de l'estomac est ensuite conduit dans le petit intestin. Celui-ci est compartimenté en trois segments : le duodénum qui est la petite section par laquelle transitent les sécrétions du foie et du pancréas, et deux plus grandes sections : le jujenum et l'ileum. Le petit intestin permet la dégradation des macromolécules et l'absorption de l'eau et des nutriments.

Le bol alimentaire est mélangé au jus pancréatique, à la bile et aux différentes sécrétions cellulaires le long du petit intestin. Ces sécrétions comprennent notamment le mucus, qui permet de lubrifier et de protéger l'épithélium, et différentes enzymes qui hydrolysent les peptides et les disaccharides (McDonald and MacFarlane, 2018).

Les sels biliaires sont des surfactants biologiques qui ont pour rôle de faciliter la digestion et l'absorption des nutriments, notamment des lipides, sous forme de micelles vers la muqueuse intestinale, mais également l'excrétion des déchets provenant du sang. Ils sont synthétisés à partir du cholestérol dans le foie et sont stockés dans les vésicules biliaires ([Maldonado-Valderrama et al., 2011](#)). La présence de lipides dans l'intestin stimule la sécrétion d'une hormone, la cholécystokinine, qui a pour rôle d'agir sur la libération des sels biliaires. Les sels pancréatiques sont composés de fluides séreux (concentrés en trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, ribonucléase et désoxyribonucléase) et de fluides hydrominéaux. Les enzymes sont sécrétées sous forme de proenzymes par la cholécystokinine au passage du chyme dans la lumière. Le fluide hydrominéral est, quant à lui, sécrété par la sécrétine, neutralisant l'acidité du chyme ([Adler, 1997](#)). Le pH équivaut alors à 6-7 ([McDonald and MacFarlane, 2018](#)).

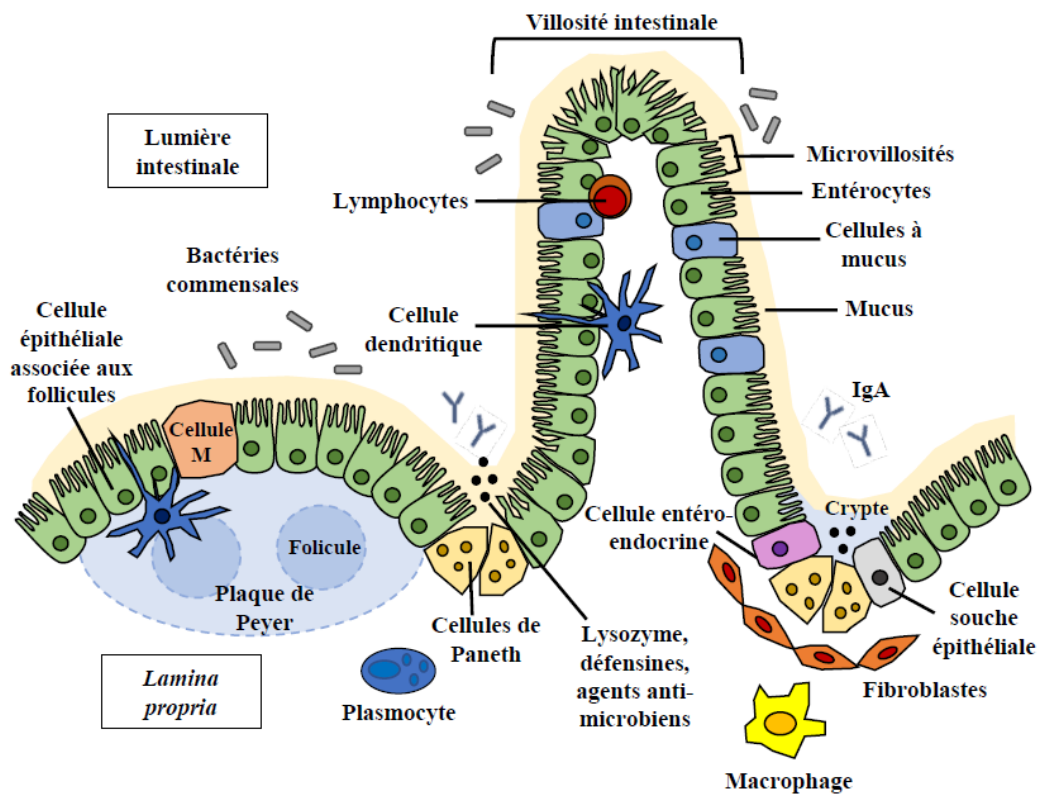


Figure 22: Barrière physique de la muqueuse intestinale (Dussert, 2020).

Le petit intestin présente des vili qui sont des projections tissulaires formant une structure en brosse recouvrant toute la surface luminale. Ces projections augmentent la surface d'absorption jusqu'à 200m² ([McDonald and MacFarlane, 2018](#)). Les vili sont vascularisés

(alimentation sanguine avec une artériole et une veine et une alimentation lactéale vers le système lymphatique). Ce sont ces caractéristiques de surface et de vascularisation qui font de l'intestin le site majoritaire d'absorption des nutriments. L'épithélium est constitué d'une monocouche continue d'entérocytes, de cellules de Goblet et de cellules M liés entre eux par des jonctions serrées qui uniformisent la surface épithéliale (**Figure 22**). Les cellules M recouvrant les régions lymphoïdes, ou zones de Peyers, sont spécialisées dans la détection d'antigènes. Leur rôle est principalement immunitaire. Différentes jonctions intercellulaires existent entre ces cellules. Les jonctions étanches, ou jonctions serrées, limitent la perméabilité de l'épithélium intestinal. Les jonctions d'ancrage permettent l'attachement mécanique des cellules entre elles. Enfin, les jonctions communicantes, ou jonctions de type gap, permettent le passage des signaux chimiques ou électriques entre les cellules. Les propriétés d'absorption de l'épithélium sont contrebalancées par la présence d'une barrière physiologique : le mucus. Ce dernier a pour rôle de protéger les parties exposées des cellules épithéliales dans la lumière de l'intestin, en captant et éliminant les pathogènes. Il a aussi pour rôle la lubrification du tractus digestif ([Ensign et al., 2012](#)).

Le mucus est un gel hydraté composé d'une glycoprotéine, la mucine ([Lai et al., 2009](#)). Deux familles de mucines sont distinguées : les mucines ancrées aux cellules présentant un domaine transmembranaire les reliant à la membrane des cellules épithéliales et les mucines sécrétées. Ces deux familles forment une structure bi-couche de mucus avec une couche adhérente aux cellules et une seconde « éphémère » en surface.

3.1.4. Absorption intestinale d'actifs encapsulés

L'absorption est un mécanisme complexe combinant des processus simples de diffusion ainsi que de transport facilité et transport actif. Le passage des particules de substances actives au travers de l'épithélium intestinal s'effectue selon trois voies : la voie paracellulaire (phénomène de diffusion dans les jonctions de deux cellules épithéliales adjacentes), la voie transcellulaire (absorption par les entérocytes) ou la voie lymphatique (capture par les cellules de type M situées dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (**Figure 23**)).

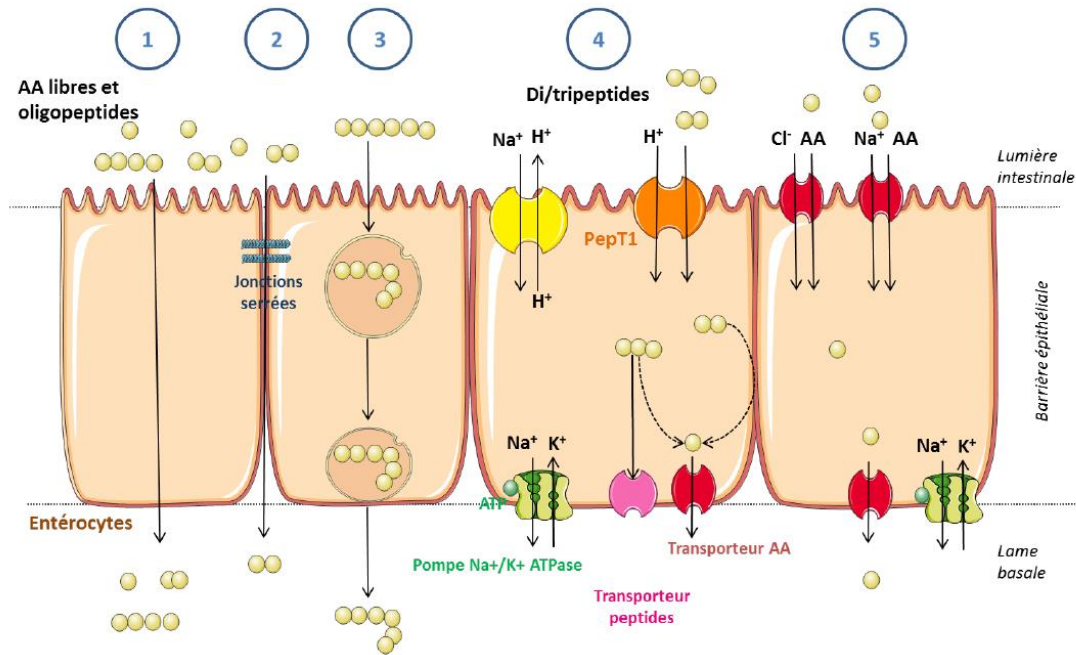


Figure 23: Voie de transport des molécules au niveau de la barrière intestinale. 1) Diffusion passive ; 2) Voie paracellulaire ; 3) Endocytose ; 4) Transport actif par le biais de transporteur ; 5) Transport actif des acides aminés (Dussert, 2020).

Le mécanisme de diffusion traduit le mouvement à travers des canaux protéiques (diffusion simple) ou en liaison avec des protéines de transfert (diffusion facilitée). Le transport actif nécessite l'apport d'énergie pour le mouvement d'ions et de molécules en liaison avec des protéines de transfert. Les pompes sont des systèmes associant transporteurs et ATP. Enfin, la pinocytose est un mécanisme d'absorption par lequel un volume du contenu intestinal est englobé par la membrane épithéliale, facilitant l'intégration de grosses molécules (protéines).

Cas d'absorption des molécules liposolubles

L'absorption des lipides fait intervenir des mécanismes complexes. L'entrée des lipides et de composés liposolubles dans le duodénum stimule la libération d'entogastrone, une hormone qui inhibe la sécrétion et la motricité gastrique et donc ralentit la vidange gastrique, donc la délivrance des graisses vers le duodénum. La vidange gastrique d'un repas riche en lipide peut prendre 4 à 6 h chez un individu normal.

Chez les monogastriques, la majeure partie de la digestion des composés liposolubles s'effectue dans l'intestin grêle. La digestion repose sur l'action lipolytique de la lipase pancréatique qui se trouve déversée par l'arrivée des lipides dans l'intestin grêle avec une

sécrétion accrue de suc pancréatique (1 l/j chez l'homme, 7 à 8 l/j chez le porc par exemple). Les sécrétions pancréatiques ont une teneur en matière sèche variant de 1 à 10 % et son pH est légèrement alcalin, qui favorise la lipolyse qui ne peut s'effectuer qu'à un pH relativement alcalin (entre 6 et 8) ([Singh et al., 2002](#)).

La sécrétion pancréatique contient différentes enzymes lipolytiques dont la plus importante est la lipase. Il s'agit d'une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 45 000 Da. Le second facteur impliqué dans la digestion des lipides est la bile. Secrétés par le foie, les éléments essentiels pour la digestion des lipides sont les acides biliaires émulsifiants. Ils sont synthétisés par les hépatocytes à partir du cholestérol. Ils sont constitués en parties égales d'acides choliques et d'acide chénodésoxycholique qui sont conjugués soit à la glycine, soit à la taurine, pour donner des acides glyco- et taurocholiques qui sont sécrétés dans le duodénum.

Chez l'homme, le foie fabrique environ 0.5 g de sels biliaires par jour. Au pH de l'intestin grêle, ils sont sous formes ionisées, donc sous forme de sel de sodium. Les acides biliaires, ou sels biliaires ont pour rôle principal l'émulsification des lipides grâce à leurs propriétés amphiphiles ([Golding et al. 2010](#)).

La quasi-totalité des sels biliaires est réabsorbée de façon active par l'iléon. Il y a donc un cycle entérohépatique des sels biliaires, une molécule faisant en moyenne une vingtaine de cycles avant d'être éliminée par les fèces.

La formation de micelles grâce aux propriétés émulsifiantes des sels biliaires permet l'absorption des acides gras, des monoglycérides issus de la lipolyse des triglycérides. Cette absorption se fait par diffusion au niveau des membranes des entérocytes où les acides gras à longue chaîne et les monoglycérides sont réestérifiés en triglycérides et ensuite combinés avec des protéines, des phospholipides et du cholestérol pour former des chylomicrons.

Suite à cela, les chylomicrons pénètrent dans les lymphatiques intestinaux par le canal thoracique et, enfin, dans la circulation périphérique. Les acides gras à chaîne moyenne peuvent être absorbés dans les entérocytes sans être hydrolysés. Ils sont transportés directement dans la veine porte.

Les vitamines liposolubles (A, D, E, K) suivent ces mêmes mécanismes ([Cuillierier and Marteau, 2002](#)).

Cas d'absorption des molécules hydrosolubles

La digestion des glucides intervient principalement dans l'intestin grêle, principalement au niveau du duodenum. L'amylase pancréatique rompt les molécules d'amidon en dextrines et maltoses. La maltase sécrétée par les cellules muqueuses hydrolyse le maltose en glucose dans la bordure en brosse, à la surface des cellules épithéliales couvrant l'intestin. Les membranes externes des cellules contiennent de nombreuses enzymes : invertase, lactase, isomaltase, qui agissent respectivement sur le saccharose, le lactose, le maltose et l'isomaltose. Les monosaccharides résultant de la digestion (glucose, galactose et fructose) passent vers le sang à travers les cellules muqueuses et les capillaires. Ils sont transportés par la veine porte jusqu'au foie. Le glucose et le galactose sont absorbés par transport actif sodium-dépendant. Le fructose utilise un transport par diffusion facilitée. L'homme ne peut pas digérer tous les hydrates de carbone. La cellulose, l'hémicellulose et d'autres fibres sont excrétées sans modifications majeures dans les selles.

Les vitamines hydrosolubles sont absorbées dans le duodénum et le jéjunum à l'exception de la vitamine B12, celle-ci étant absorbée grâce à un récepteur spécifique présent dans l'iléon (Cuillierier and Marteau, 2002).

Dans le cas des polyphénols, et notamment des anthocyanines, le site majeur d'absorption est le petit intestin, mais les auteurs s'accordent également sur une phase d'absorption initiale au niveau de l'estomac (Chai et al., 2018). L'absorption des anthocyanines est principalement affectée par la barrière physique et physiologique de l'épithélium intestinal. Les anthocyanines traversent la barrière du mucus et sont absorbés à la surface des entérocytes par transport actif ou diffusion passive. La diffusion passive constitue le mécanisme majeur d'absorption des anthocyanines et est provoquée par la pression osmotique en empruntant le passage paracellulaire ou transcellulaire (Hu et al., 2017). Après absorption par le petit intestin, les anthocyanines sont sujets à des biotransformations au niveau des entérocytes. Ils sont ensuite transportés aux hépatocytes pour générer une série de conjugués rapidement libérés vers le système circulatoire pour être distribués aux différents organes ou excrétés dans l'urine (Braga et al., 2018). Les anthocyanines non absorbés atteignent le colon et

subissent des dégradations en présence du microbiote local sous forme d'acides phénoliques pour une absorption ultérieure ([Morais et al., 2016](#)).

Cas d'absorption des protéines

Dans l'intestin grêle, le contact du chyme avec la muqueuse intestinale stimule la libération d'entérokinase, une enzyme qui transforme le trypsinogène pancréatique inactif en trypsine, activant les autres enzymes protéolytiques : la trypsine, la chymotrypsine et les carboxypeptidases pancréatiques. Ces enzymes poursuivent la digestion débutée dans l'estomac et libèrent des acides aminés et des oligopeptides. Dans la bordure en brosse, les peptidases protéolytiques transforment les polypeptides en acides aminés, dipeptides et tripeptides. Finalement, l'hydrolyse terminale a lieu dans la bordure en brosse lorsque les di- et tripeptides sont hydrolysés en acides aminés. Enfin, certaines petites protéines peuvent être absorbées sans digestion préalable.

L'absorption des acides aminés se fait par 4 systèmes distincts de transport actif : celui pour les acides aminés basiques, neutres ou acides et celui pour la proline et l'hydroxyproline. Les transporteurs utilisent un co-transport avec le sodium comparable à celui utilisé pour le glucose ([Gardner, 1988](#)).

Au total, la plus grande partie des protéines ingérées est absorbée dans l'intestin grêle, puisqu'il reste moins de 1% de ces protéines dans le matériel fécal.

Cas des vecteurs particuliers

L'administration par voie orale de vecteurs particuliers, présentant en particulier une taille nanométrique, permet son adsorption dans la circulation systémique. Les particules nanométriques peuvent traverser l'épithélium intestinal par diffusion au travers des cellules (passage transcellulaire). Toutefois, les particules doivent adhérer au mucus et traverser la première couche de muqueuse ([Jafari et al., 2017](#)). Les nanoparticules nécessitent de présenter des propriétés mucoadhésives pour passer cette couche. La mucoadhésion est une forme de bio-adhésion impliquant comme substrat le mucus ([Gu et al., 1988](#)). Elle se réfère plus spécifiquement à l'adhésion des polymères à la muqueuse ainsi qu'à la propriété de certains polymères à devenir adhésif en condition hydratée. Le mécanisme d'adhésion peut être expliqué par la combinaison de différentes théories.

3.2. Mécanismes de libération d'un principe actif

Bien que le principal objectif de la microencapsulation est de protéger la substance active de l'environnement extérieur, les mécanismes de libération de la substance dans la zone et au temps souhaité doivent être considérés.

3.2.1. Mécanismes de libération

La libération d'une substance active microencapsulée dépend de différents facteurs tels que l'interaction entre l'actif et la matrice encapsulante, la volatilité de l'actif, le ratio actif/encapsulant, la taille des particules et la viscosité de la paroi encapsulante (Ganza-González et al., 1999). La libération d'un actif est considérée comme contrôlée dès lors que ce dernier est libéré dans le site cible aux temps et taux de relargage souhaités. L'établissement du profil de libération d'un actif encapsulé dans une microcapsule permet de décrire la combinaison des mécanismes de libération impliqués ainsi que la cinétique de libération (**Figure 24**) (Singh et al., 2010).

Le phénomène de **diffusion** est impliqué lorsque la paroi de la microcapsule est intacte. Le fluide de dissolution dissout le noyau en pénétrant le matériau de la paroi, entraînant une fuite à travers les pores ou les canaux interstitiels (Gunder et al., 1995). Les premiers travaux ont suggéré que la libération finale repose sur le taux de pénétration de la microcapsule par le fluide de dissolution, le taux de dissolution du noyau dans le fluide de dissolution et le taux de fuite et de dispersion du noyau (Higuchi, 1963). L'actif peut être libéré avec ou sans gonflement de la paroi encapsulante (Shahidi and Han, 1993). Dans la pratique, le taux de diffusion est également influencé par la nature de l'actif et l'encapsulant, le type, la taille et la forme de la microcapsule (Siepmann and Siepmann, 2012).

La libération de l'actif peut également se dérouler par **dissolution** de la matière encapsulante. Dans ce cas-ci, la vitesse de libération est déterminée par la vitesse de dissolution (Gunder et al., 1995), qui est influencée par l'épaisseur du revêtement et sa solubilité dans le fluide de dissolution. Un exemple de ce mécanisme est la libération d'arômes de café microencapsulés au contact de l'eau, tandis que l'arôme peut être protégé de la chaleur, de la lumière et de l'oxydation à l'état sec (Frascareli et al., 2012).

Dans le cas d'une libération par **effet osmotique**, la matrice encapsulante présente des propriétés de semi-perméabilité (Singh et al., 2010). La libération de l'actif par osmose est basée sur le mouvement des molécules d'eau vers le bas du gradient de concentration au

travers de la paroi semiperméable des microcapsules jusqu'à atteindre l'équilibre entre les deux côtés de la paroi. La différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la microcapsule entraîne par la même occasion la libération de l'actif, ou osmolyte, à travers les pores de la paroi encapsulante.

Pour un mécanisme de libération par **biodégradation** ou **érosion**, des enzymes telles que des protéases et des lipases hydrolysent respectivement des protéines ou des lipides, conduisant à la libération de l'actif. Dans ce système, l'actif est mélangé de manière homogène au sein de la matrice de polymère. L'érosion ou la dégradation de la paroi encapsulante diminue la distance entre l'actif et la surface de la microcapsule, conduisant à la libération de l'actif sans transport. Toutefois, étant donné que le procédé d'hydratation est plus rapide que l'érosion ou la dégradation du polymère, il entraîne une diffusion et une libération de l'actif au travers de micropores des microcapsules (Gunder et al., 1995). L'érosion ou la dégradation de la matrice polymérique peut être induite par le pH ou une hydrolyse enzymatique. Ainsi, la libération de l'acide 5-aminosalicylique encapsulé au sein de microcapsules chitosan- cellulose sulfonate de sodium-polyphosphate de sodium réticulées a été rapportée dans un milieu de digestion colonique simulé contenant une enzyme (la glucangluconohydrolyase) (Wu and Yao, 2013). Des micropores ont notamment été mis en évidence à la surface des microcapsules, en lien avec l'activité hydrolytique de l'enzyme.

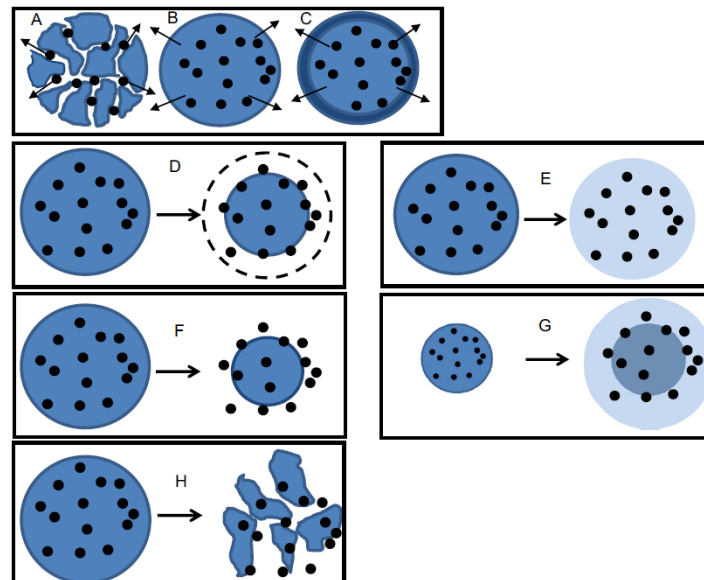


Figure 24: Mécanismes de libération: mécanismes de diffusion (pores remplis d'eau (A), diffusion matricielle homogène (B), diffusion matricielle réservoir (C)), mécanisme d'érosion hétérogène et homogène (D et E), rétrécissement particulière (F), Gonflement particulière (G), fragmentation (H) (Fathi et al., 2018).

Les mécanismes de libération impliquent également les paramètres du milieu extérieur (pH, température, pression). Ces paramètres peuvent être considérés comme des mécanismes individuels car ils peuvent être contrôlés indépendamment les uns des autres (Dhakal and He, 2020).

La libération d'un actif en fonction du **pH** consiste à modifier la solubilité du matériau de la paroi en modifiant le pH de l'environnement. Par exemple, la microencapsulation de la riboflavine en présence de galactomannanes et d'un copolymère pluronic® F127 permet une rétention de l'actif en milieu acide et une libération en milieu neutre (de Farias et al., 2018).

La modification de la **température** du milieu permet la libération de l'actif. Ce mécanisme repose sur deux concepts : la libération sensible à la température et la libération activée par fusion. Le premier est basé sur l'expansion ou la dégradation du matériau de la paroi à une température dite critique, tandis que le second est basé sur la fusion du matériau de la paroi lorsque la température augmente (Silva et al., 2014).

La libération d'un actif peut également être déclenchée lorsqu'une **pression** est appliquée sur le matériau encapsulant. La libération des saveurs de la gomme à mâcher pendant la mastication est un exemple illustrant ce mécanisme (Wong et al., 2009).

3.2.2. Les systèmes de libération

Les microparticules peuvent être classées en deux catégories : les microréacteurs contenant des enzymes ou des bactéries et dont le principe consiste à conserver leur contenu, et celles qui sont formulées de façon à libérer la matière active encapsulée (**Figure 25**). Dans ce dernier cas, il faut distinguer les systèmes à libération déclenchée des systèmes à libération prolongée.

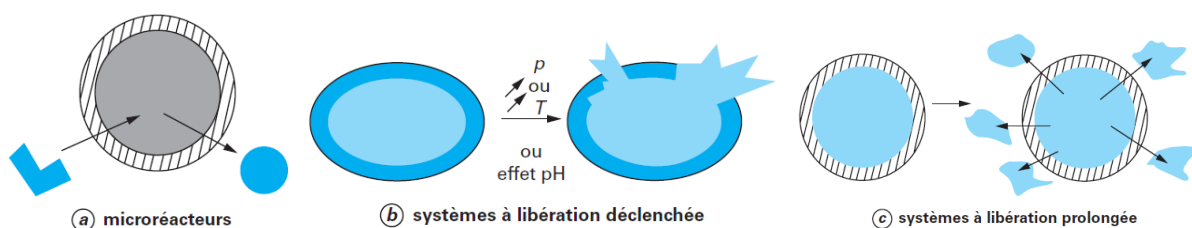


Figure 25: Systèmes de libération d'actifs : microréacteur, libération déclenchée, libération prolongée (Richard and Benoit, 2000).

Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane étanche, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ou par fusion sous l'effet de la température. La

libération accélérée permet alors une absorption sans délai du principe actif pour une action pharmacologique rapide. Il s'agit de comprimés effervescents, solubles, dispersibles ou orodispersibles. Les formulations à libération accélérée facilitent la prise médicamenteuse et permettent d'augmenter la biodisponibilité par voie sublinguale.

Les systèmes à libération prolongée se distinguent les uns des autres par les mécanismes de libération mis en jeu (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant, échange d'ions...) et par leur structure (microcapsule ou microsphère) qui va directement influencer sur la cinétique de libération résultante.

Dans le cas des microsphères, où l'actif est dispersé au sein d'un réseau de polymère, deux cas de figures sont considérés. Dans le cas d'une molécule de taille assez réduite, cette dernière peut diffuser à travers le réseau et se libère de façon continue jusqu'à épuisement. Dans le second cas, où la molécule est de taille trop importante pour être libérée vers le milieu extérieur, une déstructuration de la matrice est nécessaire pour provoquer le relargage. Cette déstructuration peut être due à un changement d'état de la matrice, provoqué par exemple par un changement de pH du milieu. La libération est alors rapide et immédiate. Mais si la déstructuration est due à une érosion lente de la matrice, par exemple par une hydrolyse enzymatique, alors c'est un relargage pouvant se rapprocher d'une diffusion qui est visible dans le temps. La libération prolongée présente un profil cinétique d'ordre zéro, indépendant du temps et des variables biologiques de l'environnement. Elle est basée sur des phénomènes physiques constants.

Différentes équations permettent de décrire les profils de libération de substances microencapsulées (**Tableau 7**). L'équation de Hixson-Crowell et de Kopcha sont appliquées respectivement pour la libération de composés pharmaceutiques et pour la production de données de lots optimisés ([Marisa Ribeiro et al., 2019](#)). Dans un système idéal, le profil de libération doit suivre une cinétique d'ordre zéro dans le cas d'un actif pur, d'ordre intermédiaire pour une particule matricielle ou de premier ordre dans le cas d'une solution ([Estevinho et al., 2013](#)). Toutefois, les études expérimentales tendent à l'établissement de modèles mathématiques plus complexes comme les équations d'Higuchi et de Korsmeyer-Peppas. Cette dernière équation intègre par exemple une constante (K_k) relative aux caractéristiques structurelles et géométriques de la forme de libération et l'exposant n

définissant le mécanisme de libération (Estevinho et al., 2013). Ce modèle implique que la libération contrôlée de composés actifs peut résulter de l'interaction de divers phénomènes. Enfin, dans l'équation de Weibull, le paramètre τ_d correspond au temps pour lequel la libération de la substance active atteint 63,2% (Salama et al., 2008). Ces modèles mathématiques peuvent être appliqués à différentes situations, en fonction de l'actif encapsulé, de la technique utilisée et de l'application souhaitée. Chaque système de libération étant unique, il existe plusieurs paramètres et conditions pouvant être impliqués et affectant la libération de l'agent actif.

Tableau 7: Modèles mathématiques de libération contrôlée de substances actives (Estevinho et al., 2013).

Equation	Légende
Ordre zéro $Q_t = Q_0 + K_0 t$	A – Terme diffusion B – Terme érosion K ₀ – Constante de libération d'ordre zéro
Premier ordre $Q_t = Q_0 e^{-K_1 t}$	K ₁ – Constante de libération de premier ordre K _H – Constante de dissolution d'Higuchi K _K – Constante de Korsmeyer
Higuchi $Q_t = K_H \sqrt{t}$	K _S – Constante incorporant la relation entre l'aire et le volume de la forme de la dose pharmaceutique
Korsmeyer – Peppas $\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_K t^n$	M – Pourcentage d'actif libéré à un temps t n – Exposant de libération (diffusionnel), un paramètre définissant le mécanisme de libération
Hixson – Crowell $Q_0^{\frac{1}{3}} - Q_t^{\frac{1}{3}} = K_S t$	Q ₀ – Taux initial en solution (normalement Q ₀ = 0)
Kopcha $M = A_t^{\frac{1}{2}} + B_t$	Q _t /Q _∞ - Fraction de composés actifs libérés à un temps t t – Temps
Weibull $\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - e^{\left(\frac{t-t_0}{\tau_D}\right)^\beta}$	t ₀ – Temps initial T _D – Temps de dissolution moyen (temps pour lequel 63,2% de la matière a été libéré) β – Facteur de forme

3.2.3. *Polymères stimuli-sensibles*

Les polymères **stimuli-sensibles** se définissent par leur capacité à subir des modifications notables de propriétés physiques ou structurales en réponse à de très petits stimuli environnementaux. Ces polymères sont également qualifiés de polymères **intelligents** en raison de leur capacité à se modifier en présence d'un déclencheur externe jusqu'à un point critique, et retourner à leur forme originelle en l'absence de ce dernier. Les transitions sont réversibles et peuvent influencer des changements de l'état physique, de la forme et la solubilité, les interactions avec le solvant, sur la conductivité ou encore la balance hydrophile/lipophile (HLB). Appliqués à la libération contrôlée de substances actives, des systèmes de vectorisation peuvent être développés à partir de polymères intelligents sensibles à différents stimuli tels que la température, le pH, la lumière, le courant électrique ou encore les ultrasons. L'avantage de ces systèmes est de réduire la fréquence de dosage du principe actif, la facilité de préparation, assurer la concentration thérapeutique désirée avec une seule dose, la libération prolongée d'une substance active incorporée, réduire les effets secondaires et améliorer la stabilité.

Les réponses de ces polymères peuvent être de différentes natures. La réactivité d'une solution polymérique aux stimuli chimiques et physiques se limite à la formation/disparition de forces secondaires comme les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals, les forces hydrophobes et les interactions électrostatiques ou à leur rupture (en présence de lumière ou d'ultrasons).

Les **polymères pH-sensibles**, en particulier, présentent au sein de leur structure des groupements acides ou basiques capables de capter ou libérer un proton en réponse à des changements de pH dans l'environnement. Les polymères disposant d'une large répartition de groupements ionisables sont dits polyélectrolytes. Ces derniers sont classés selon deux catégories : les polyacides faibles (composés de groupements acides carboxyliques ou sulfoniques) et les polybases faibles (groupements amines, imidazoles ou pyridines). Par protonation ou déprotonation de ces groupements chimiques, le degré d'ionisation et la charge nette du polymère se voient modifiés, pouvant modifier leur conformation, leur volume hydrodynamique et leur solubilité. Le pH, pour lequel ces changements sont induits, est dit pH de transition ou pH critique (noté pH^*) et est dépendant de la valeur de pK_a des

groupements présents. Le pKa d'un polyélectrolyte est défini comme le pH pour lequel la moitié de ses groupes ionisables sont ionisés. Ainsi, le choix d'un polymère présentant une valeur de pH^* dans la gamme de pH souhaitée est le facteur principal dans la préparation d'un système de vectorisation sensible au pH. Une modulation du pH^* du polymère peut être réalisée via différentes stratégies pour une adaptation précise du vecteur. Parmi ces stratégies, une copolymérisation d'un polymère peut être réalisée avec d'autres polyélectrolytes ou en incorporant une fraction hydrophobe au sein de la chaîne polymérique.

4. Conclusion

Ce chapitre bibliographique se décompose en trois chapitres.

Le premier chapitre traite de la microencapsulation et fait état, par une brève description des différents procédés de microencapsulation permettant d'obtenir des microparticules individualisées chargées en substance active. Une attention particulière a été accordée aux phénomènes de coacervation complexe dans le second chapitre en décrivant notamment les facteurs influençant le phénomène. Cette description a permis de mettre en évidence le caractère pH-sensible du phénomène de coacervation complexe et son application pour l'élaboration de systèmes d'encapsulation à libération contrôlée. Les techniques de microencapsulation par émulsion et atomisation décrites également dans ce chapitre seront mises à contribution dans ce travail de thèse car elles sont adaptées à la formulation de microsphères d'actifs liposolubles. Le procédé de séchage par atomisation, notamment, permet l'obtention des microsphères avec une mise en œuvre simple, rapide et économique.

Le second chapitre présente les caractéristiques des biopolymères végétaux utilisés au cours de ces travaux de thèse : la protéine de pois et différents polysaccharides se différenciant par leur structure : la gomme adragante, la gomme arabique et l'alginate de sodium (trois polysaccharides chargés négativement) et la gomme tara (polysaccharide neutre). Dans un contexte de développement durable, l'utilisation de ces biopolymères d'origine végétale représentent une alternative intéressante aux polymères issus de la pétrochimie et aux protéines d'origine animale. Ces biopolymères hydrosolubles et biocompatibles présentent une diversité de propriétés physico-chimiques et fonctionnelles permettant leur utilisation dans le domaine de la microencapsulation.

Le dernier chapitre décrit les phénomènes de libération contrôlée en prenant notamment comme exemple la libération d'un composé dans un organisme monogastrique. Cette étude a permis notamment d'identifier les propriétés indispensables d'une microsphère pour une application en voie orale : cette dernière passe par deux phases de digestion présentant des conditions de pH et d'enzyme différents : la digestion gastrique (pH acide en présence de protéases) et la digestion entérique (pH relativement neutre et présence de sels biliaires et enzymes digestives). Cette partie décrit également le site spécifique d'absorption des

composés liposolubles comme étant l'intestin grêle. Ainsi, les microsphères développées devront présenter des propriétés de libération contrôlée notamment en fonction du pH. Enfin, ce chapitre fait état des différents mécanismes et modèles d'interprétation du profil de relargage d'un actif encapsulé.

En se basant sur cette étude bibliographique, nous avons décidé d'élaborer des coacervats complexes à partir de l'interaction électrostatique entre des protéines végétales (les protéines de pois) et des polysaccharides d'origine végétale. Parmi les polysaccharides utilisés, trois polysaccharides chargés sont étudiés (gomme adragante, gomme arabique, alginate de sodium) comparativement à un polysaccharide non chargé (la gomme tara). L'étude bibliographique a permis de mettre en évidence l'importance de l'étude des différents facteurs influençant le phénomène de coacervation complexe pour l'encapsulation d'un actif. A l'issue de cette étude, les coacervats complexes seront appliqués à la microencapsulation d'un actif modèle liposoluble en incluant les procédés d'émulsion et de séchage par atomisation.

Résultats et discussion

Chapitre 1 : Etude comparative de l'interaction
entre les protéines de pois et différents
polysaccharides

Chapitre 1 : Etude comparative de l'interaction entre les protéines de pois et différents polysaccharides

Enjeux :

Dans cette partie présentée sous forme d'article, on se propose de caractériser l'association entre des protéines végétales d'origine commerciale, les protéines de pois Nutralys F85M (Roquette), et quatre modèles de polysaccharides commerciaux : la gomme adragante, la gomme arabique, l'alginate de sodium et la gomme tara. Cet article présente deux enjeux : une première analyse qui constitue une analyse physico-chimique permettant de déterminer les conditions favorisant l'interaction électrostatique entre les protéines et les polysaccharides sélectionnés, et un second enjeu mettant en évidence l'aptitude au séchage de ces complexes en vue de la formation de microparticules.

L'analyse du système protéine de pois-polysaccharide a été effectuée à une concentration totale fixe de 0,3% m/v en faisant varier le ratio protéine/polysaccharide et le pH dans le milieu. Le choix de cette concentration permet d'étudier à faible concentration les mécanismes impliqués dans la formation des complexes à partir des quatre modèles de polysaccharides sélectionnés (la gomme arabique, l'alginate de sodium, la gomme adragante et la gomme tara) et de les comparer aux éléments de la littérature.

Le choix des polysaccharides a été réalisé de la manière suivante. La gomme arabique et l'alginate de sodium sont deux polysaccharides anioniques connus pour former des coacervats complexes par interactions électrostatiques avec les protéines, et notamment avec des isolats de protéines de pois. La gomme adragante, également anionique, est connue pour former des interactions électrostatiques avec les protéines d'origine animale mais aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur les protéines végétales. L'enjeu de cet article est de caractériser la formation de coacervats complexes entre les protéines de pois et la gomme adragante en fonction du ratio protéines/polysaccharides et du pH du milieu et de comparer le couple aux modèles connus. Enfin, la gomme tara, constituée d'un galactomannane, biopolymère présentant un caractère non-ionique, est également comparée aux polysaccharides anioniques et constitue le contrôle négatif de cette étude.

La formation de ces mêmes coacervats a ensuite été étudiée avec une concentration totale en biopolymères plus importante (jusqu'à 5% m/v). L'enjeu de cette étude est de caractériser le rendement de coacervation pour les quatre modèles présentés à une concentration totale plus importante et d'étudier la capacité de ces complexes à former des microparticules par séchage par atomisation. Cette étude a pour perspectives l'élaboration de microsphères à partir de coacervats complexes.

Résumé :

Dans ces travaux, la capacité des protéines de pois à former des coacervats complexes avec la gomme adragante a été étudiée. La formation de coacervats a été comparée structurellement à trois autres modèles de polysaccharides pour former des interactions protéines de pois-polysaccharides : la gomme arabique et l'alginate de sodium (connus tous deux pour former des interactions avec la protéine de pois), et la gomme tara, un galactomannane. Au cours de cette étude, les effets du pH et du ratio protéines/polysaccharides ont été étudiés par mesure de la turbidité et du potentiel zêta. Ces mesures ont permis de mettre en évidence que la valeur de pH favorisant la formation des coacervats complexes augmente avec l'augmentation du ratio protéines/polysaccharide. Les observations par MEB ont mis en évidence la capacité du procédé de séchage par atomisation à former des particules sphériques de complexes protéines de pois-polysaccharides. La spécificité de la surface des microparticules observées semble dépendante de la protéine et pourrait moduler la libération de composés encapsulés. Les analyses FTIR des coacervats ont mis en évidence la présence d'interactions électrostatiques entre la protéine de pois et les polysaccharides. Les résultats ont montré que la gomme adragante pourrait être utilisée en tant qu'alternative à la gomme arabique pour former des coacervats complexes avec la protéine de pois.

L'ensemble des résultats est regroupé dans un article intitulé « Complex coacervation of pea protein isolate and tragacanth gum : comparative study with commercial polysaccharides. » et publié en février 2021 dans la revue « Innovative Food Science and Emerging Technologies » (IF 4,48).

Complex coacervation of pea protein isolate and tragacanth gum: comparative study with commercial polysaccharides.

Jérémy CARPENTIER ^{a,c}, Egle CONFORTO ^b, Carine CHAIGNEAU ^c, Jean-Eudes VENDEVILLE ^c,
Thierry MAUGARD ^a

^a Université de La Rochelle, UMR CNRS 7266, LIENSs, UFR Sciences, Avenue Michel Crépeau,
17042 La Rochelle, FRANCE

^b Université de La Rochelle, UMR CNRS 7356, LaSIE, UFR Sciences, Avenue Michel Crépeau,
17042 La Rochelle, FRANCE

^c IDCAPS, filiale R&D INNOV'IA, 4 rue Samuel Champlain, Z.I. Chef de Baie, 17000 La Rochelle,
FRANCE

*Author to who correspondence should be addressed

E-mail: thierry.maugard@univ-lr.fr

Phone : +33 5 16 49 82 77

Abstract

The ability of pea protein isolates (PPI) to form complex coacervates with tragacanth gum was investigated. The coacervate formation was structurally compared to three other PPI-polysaccharide interaction models: arabic gum and sodium alginate (known to form coacervates with PPI) and tara gum, a galactomannan. The effects of the pH and protein/polysaccharide ratio were mainly investigated using turbidity and zeta potential measurements. Regarding the pH of soluble complex formation, the pH of complex coacervates increased with the increase in protein-anionic polysaccharide mixture ratio. SEM images revealed the ability of the spray-drying process to form spherical particles of pea protein-polysaccharide complexes. The specificity of the microparticle surface was protein-dependent. FTIR analyses of coacervates showed the electrostatic interaction between the PPI and the polysaccharides. The results showed that tragacanth gum could be used as an alternative to gum arabic to form complex coacervates with PPI based on zeta potential measurements and coacervation yield studies.

Key Words

Pea Protein Isolate, Tragacanth gum, Complex coacervates, Protein-polysaccharide interaction, Zeta potential, Solubility

1. Introduction

For a few years, plant proteins were of a growing interest for ingredient industry as an alternative to animal sources (gelatin, whey, casein) due to safety concerns (Toews and Wang, 2013). Among plant proteins, yellow pea (*Pisum sativum* L.) protein isolates (PPI) represent attractive hydrocolloids in food and nutraceutical applications due to their health benefits, their allergen and gluten-free properties, a wide availability and low price. The composition of pea proteins is mainly comprised of albumin (10-20% of total proteins) and of two major globulin proteins (70-80% of the total proteins): legumin (11S; 350—400kDa), vicilin and convicilin (7S; 150 and 290kDa respectively) (Adebiyi and Aluko, 2011). Pea protein contains a wide range of charged amino acids, especially lysine ($\approx 6\%$), aspartic acid ($\approx 11\%$), glutamic acid ($\approx 17\%$), arginine ($\approx 7\%$), leucine ($\approx 7\%$) in its polypeptide chains exhibiting the polyelectrolyte nature of pea proteins (Boye et al., 2010).

The establishment of interaction between proteins and polysaccharides leads to the formation of complexes that can improve the functionalities of proteins to stabilize emulsions and foams (Tamnak et al., 2016), control the structure and texture of foods and biomaterials (Turgeon et al., 2003), or to design carrier vehicles in the protection and delivery of active compounds to targeted sites and improve their bioavailability (Jain et al., 2016). The complex coacervation, also known as an associative phase separation, is characterized by an electrical balance between two oppositely charged polyelectrolytes (such as a protein, polysaccharide) in aqueous media. Two phases are thus obtained: a biopolymer rich phase and a solvent rich phase. This phenomenon depends on the conditions such as the pH, charge density and molecular weight of the related polymers, the colloid concentration, temperature and ionic strength of media, etc. (Turgeon et al., 2003; Weinbreck et al., 2003). Not all polyelectrolytes are subject to this phenomenon. Complex coacervation is a thermodynamic phenomenon that can be driven enthalpically or entropically by driving forces such as electrostatic interactions or counterion release, with contributions from hydrogen bonding and hydrophobic interactions (Kayitmazer, 2017).

Three critical structure-forming events (pHC, pH ϕ 1, pH ϕ 2) have been defined based on the changes in turbidity curves during the titration from alkaline to acidic pH (Liu et al., 2009). These events correspond to four different phase behaviors: the co-solubility of biopolymers

($\text{pH} > \text{pH}_c$), the formation of soluble complexes ($\text{pH}_c > \text{pH} > \text{pH}\phi_1$), the formation of complex coacervates inducing a strong increase in turbidity ($\text{pH} \phi_1 > \text{pH} > \text{pH}\phi_2$), and the dissolution of complexes due to the protonation of reactive groups on the polysaccharide backbone ($\text{pH} < \text{pH}\phi_2$). A maximum optical density (OD), also called pH_{opt} , takes place between $\text{pH}\phi_1$ and $\text{pH}\phi_2$, corresponding to the maximum amount of coacervates produced at the electrical equivalence of the relevant biopolymer. It has been described that from $\text{pH}\phi_1$ to pH_{opt} the electrostatic attractive forces become stronger, reaching the maximum electrostatic interaction. This event is a key factor for microencapsulation applications (de Vries et al., 2003; Turgeon et al., 2003; Weinbreck et al., 2003). Controlled protein-polysaccharide interactions through complex coacervation improve their functional role as ingredients, without chemical modification (Nesterenko et al., 2012).

Many studies have been focused on the phase behavior of pea protein-polysaccharide complexes, including pea protein - alginate (Klemmer et al., 2012), pea protein - pectin (Tamnak et al., 2016) or pea protein - arabic gum (Liu et al., 2009). To the best of our knowledge, no study has assessed on the formation of complex coacervates of pea proteins and tragacanth gum as an alternative to arabic gum. Tragacanth gum is an exudate of Asian species of *Astragalus* and consists of two fractions: the water-soluble fraction (composed of tragacanthin) and the water-insoluble fraction (bassorin) and contains a small amount of protein (>4% w/w) (Anderson and Bridgeman, 1985). Tragacanthin, an anionic component, is composed of a chain of α -(1–4)-linked D-galacturonic acid units, some of which being replaced at O-3 by β -D-xylopyranosyl units and some of them being terminated with D-Galactose or L-Fucose. The galacturonic acid content varies from 10 to 30% per weight in dry matter depending on the species (Balaghi et al., 2010). The gum may be used in numerous applications in food, pharmaceutical and cosmetic industries due to its anionic properties making it highly resistant to acid environments (Nazarzadeh Zare et al., 2019). Tragacanth gum, described as a bifunctional emulsifier, showed efficient acidic oil-in-water emulsions properties (Balaghi et al., 2010; Farzi et al., 2013), gelling abilities and high mucoadhesive properties (Nur et al., 2016). Largely studied in biomedical field, tragacanth gum was identified as non-toxic, non-teratogenic, non-carcinogenic and non-mutagenic, and can be suitable in wound dressing (Ghayempour et al., 2016). It has been reported to be “generally recognized as safe” by the US Food and Drug Administration (FDA) since 1961. Using gum tragacanth as a

food additive in food preparations is permitted by the FDA Code of Federal Regulations at the concentration of 0.2-1.3%wt. The Scientific committee for Food of the European Community has approved the tragacanth gum as the food additive E-number E413 (Nazarzadeh Zare et al., 2019).

The aim of this study was to investigate the effect of the nature of marketed polysaccharides, especially gum tragacanth, on the mechanisms determining complex coacervation with the total fraction of a marketed PPI and the resulting complexation-induced changes in protein conformation under optimal coacervation conditions. However, identifying the pH range for the formation of complex coacervates in concentrated biopolymer systems in order to understand their phase transition, structural aspects and functional properties depending on the polysaccharide structure is challenging. Research work has mainly been focused on coacervate formation at concentrations less than 0.3% w/v. Studying the formation of complex coacervates at higher protein concentrations promoted the use of pea protein in food products.

In this study, particles of complex coacervates were assembled by preparing mixtures of PPI and different polysaccharides: arabic gum, sodium alginate, tragacanth gum, known as anionic polysaccharides and tara gum, a non-ionic polysaccharide. This work is structured around two axes of the study. The primary objective was to investigate the influence of factors such as the pH and biopolymer ratios on the phase behavior of PPI-polysaccharide complex coacervates, especially pea protein-tragacanth gum, in order to evaluate the physicochemical properties of these coacervates at a concentration of 0.3% (w/v) by turbidimetric analysis, zeta potential measurements and protein solubility determination. The second objective was to study the coacervation yield of concentrated coacervates (concentration of biopolymers > 1% w/v) in order to study the adaptability of the process in the field of microencapsulation. Finally, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM) were used to determine the structure of dried coacervate particles. The ultimate goal of this study would be to develop microcapsule systems of plant origins from the complex coacervates studied.

2. Material and methods

2.1. Materials and chemicals

Pea protein is dominated by two types of globulin storage proteins: legumin (350-400 kDa) and vicilin (150 kDa). Commercially available pea protein isolate (PPI, 80% protein content) in powder form was purchased from Roquette (Nutralys F85M, Lestrem, FRANCE). The product composition was described as: 7% of relative humidity, 80% of proteins, 3% of carbohydrates, 6% of total fat and 4% of ashes. Arabic gum was kindly supplied by CNI (Rouen, FRANCE). Tragacanth gum CEROTRAG 887 was purchased from C.E. Roeper GmbH (Hamburg, GERMANY). Tara gum is a galactomannan extracted from the endosperm of the seed of tara shrub *Caesalpinia spinosa*. Tara gum was purchased from Starlight Products (Rouen, FRANCE). The gum obtained consisted of $\geq 80\%$ of galactomannan. Alginate presents a linear structure consisting of (β -1,4)-linked mannuronic and α -guluronic acids, and the proportions depend on the source. Sodium alginate (MANUCOL LD) was kindly supplied by FMC Biopolymer (Philadelphia, USA). All chemicals used in this study were sold as reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

2.2. Preparation of complex coacervates and turbidimetric acid pH titration

Biopolymer stock solutions were prepared by dispersing PPI, sodium alginate (ALG), arabic gum (GAC), tara gum (TARA) and tragacanth gum (TRAG) powders in Milli-Q™ water, followed by stirring at 500 rpm for 2 hours at room temperature (RT:21-22°C). The total fraction of the protein was used for the study. No treatment was applied to separate the fractions. For ALG, TARA and TRAG, the solution was maintained at 45°C to reduce its viscosity and ensure the complete dissolution of the polysaccharide. All solutions were kept overnight at 4°C to facilitate protein solubility and fully hydrate the polysaccharides. All solutions were prepared at a concentration of 0.5% (w/v).

2.3. Turbidimetric analysis

Turbidimetric acid pH titrations of homogeneous and mixed PPI and polysaccharide systems were performed using Liu et al. (2009) methods with several modifications to identify critical structure-forming events (pH_c , $\text{pH}_{\phi 1}$, pH_{opt} , $\text{pH}_{\phi 2}$) and biopolymer and pH conditions under which the associative phase separation took place.

Turbidity measurements were performed at different ratios (protein-polysaccharide mixture ratios of 1:1, 2:1, 5:1 and 10:1) with a pH range of 7.0-1.5 using a Fluostar Omega microplate reader (BMG Labtech, FRANCE) at 600 nm in 96 well microplates. Measurements were made at room temperature at a total biopolymer concentration of 0.3% (w/v). Briefly, biopolymer mixtures were mixed from stock solutions to achieve the expected total biopolymer concentration (0.3% w/v) (Ghorbani Gorji et al., 2014) and PPI/polysaccharide ratio (1:1, 2:1, 5:1 and 10:1). Turbidimetric titration upon acidification was achieved via the dropwise addition of HCl (with a gradient HCl concentration of 0.05M > pH 3.5; 0.5M > pH 2.5; 1M > pH 2.0). For a 10mL solution of mixture, the maximal volume of HCl added was 2,0mL. The conductimetry didn't exceed 20mS.cm⁻¹. If necessary, a dropwise addition of NaOH 0.5M was achieved to reach pH 7.0. Dilution effects and changes in solution conductivity were considered minimal. Structure-forming transitions were measured graphically from the curve according to (Weinbreck et al., 2003), whereas pH_{opt} corresponded to the maximum OD at 600 nm. All measurements were made in triplicate. A homogeneous solution of PPI or polysaccharides (GAC, TRAG, ALG and TARA) were used under the same solvent conditions and at a biopolymer concentration of 0.3% (w/v) to compare the profiles with mixed solutions.

2.4. Protein solubility determination

The pH-dependence of the percentage of protein solubility of the mixture and homogeneous PPI solutions was tested using the Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific). Briefly, 20 µL of standard or a sample from the center of the supernatant of the mixture preparation were added to 200 µL of BCA working reagent in a 96 well microplate. After a 30-second agitation on a plate shaker, the plate was incubated at 37°C for 30 minutes. Then, the plate was cooled to room temperature and the absorbance was measured at 562nm using a Fluostar Omega microplate reader (BMG Labtech, FRANCE). The protein solubility was estimated as:

$$PS = \frac{\text{Protein concentration of supernatant}}{\text{Protein concentration of initial solution}} \times 100$$

2.5. Electrophoretic mobility

The electrophoretic mobility of PPI-GAC, PPI-ALG, PPI-TRAG, PPI-TARA mixtures and homogeneous biopolymer solutions was investigated according to the pH (range: 7.0 - 1.5) using a Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Westborough, MA). The solution pH was

decreased by 0.5 pH unit increments through the dropwise addition of hydrochloric acid (0.05M > pH7.0; 0.5M > pH 2.5). Samples were prepared as described in the section above to a final biopolymer concentration of 0.3% (w/v). Using the Henry equation, the electrophoretic mobility was used to estimate the zeta potential:

$$UE = \frac{2\varepsilon \times \xi \times f(\kappa\alpha)}{3\eta}$$

Where η is the dispersion viscosity, ε is the permittivity, $f(\kappa\alpha)$ is a function related to the ratio of particle radius (α) and the Debye length (κ). Using the Smoluchowski approximation, $f(\kappa\alpha)$ was equal to 1.5. All measurements were equilibrated at 25°C for 60s and analysed in triplicate.

2.6. Coacervation yield of concentrated mixtures

Mixed solutions were prepared as for the turbidimetric analysis at a total biopolymer concentration of 5.0% (w/v), except for PPI-TRAG and PPI-TARA mixtures at a ratio of 2:1 that were diluted respectively to 2% and 1% (w/v) due to the viscosity of the polysaccharide solutions (Table 1). The pH was adjusted between 2.5 and 4.5 with 0.5M HCl.

Table 8: Total biopolymer concentration of the various mixed Protein-polysaccharides solutions tested.

Ratio	PPI-TRAG	PPI-GAC	PPI-ALG	PPI-TARA
2:1	2% w/v	5% w/v	5% w/v	1% w/v
5:1	5% w/v	5% w/v	5% w/v	5% w/v
10:1	5% w/v	5% w/v	5% w/v	5% w/v

Briefly, the mixture was left for 60 minutes at room temperature, followed by centrifugation at 1,000 g for 10 minutes. The volume of supernatant was recovered, and the weight of the resulting pellet after drying at 105°C in oven and supernatant was recorded. The coacervate yield was calculated as:

$$CY = \frac{\text{Dry weight of coacervates}}{\text{Total weight of protein, polysaccharides used in the preparation}} \times 100$$

The protein solubility of the mixtures was also determined using the same procedure as described above.

2.7. Preparation of particles

The spray-drying technology was used to prepare microparticles from feed solutions, composed of pea protein – polysaccharide complex coacervates. The solutions were prepared as follows: an amount of PPI and polysaccharide (arabic gum, sodium alginate, tragacanth gum and tara gum) powders was dissolved separately in distilled water by stirring at 500 rpm for 2 hours at room temperature. For ALG, TARA and TRAG, the solution was maintained at 45°C to reduce the viscosity of solution and ensure the complete dissolution of the polysaccharide.

Then the solutions of proteins and polysaccharides were mixed at a protein/polysaccharide ratio of 5:1, and the pH was adjusted to the previously determined optimal value. The feed solutions were dried in a Mini Spray Dryer Büchi 190 (Büchi Laboratory Equipment, Switzerland), inlet air temperature at 140°C and outlet at 80°C, nozzle of 0.7 mm, and 0,4 Lh⁻¹ feed rate. The feed solution was kept under low magnetic stirring at 300 rpm during the drying step. The microparticles were collected from the container, closed hermetically in an opaque packaging and stored at 4°C.

2.8. Fourier transformation infrared (FTIR) spectroscopy study

FTIR spectra of spray-dried complexes and biopolymer powders were recorded using a Spectrum 100 FT-IR spectrometer (Perkin Elmer). Transmission spectra were obtained within a range of 4,000-650cm⁻¹ using 32 scans at a resolution of 4 cm⁻¹. The scattering correction procedure was used to correct spectra for the baseline. Mean spectra were calculated from triplicate of independent measurements.

2.9. ESEM morphological observations

The surface morphology of the samples was monitored using an environmental scanning electron microscope (ESEM) (QUANTA 200 Environmental Field Effect Gun apparatus, FEI, FRANCE). The observations were made according to Conforto et al. (2015) with several changes. The particles were deposited on conductive carbon double-faced adhesive tape on aluminum SEM stubs. As described by the author, no coating was applied to the samples before the observation in order to avoid any alteration of the particle surface. The analyses were performed in environmental mode under water vapor pressure with a beam current

between 0.1 and 2 nA and an accelerating voltage in the 11-20 kV range. Secondary electron (SE) images were obtained using a Large-Field (LFD) detector. Details of the surface morphology were obtained by varying the water vapor pressure within the 1.20-1.30 mbar range as well as the accelerating voltage of the primary beam.

2.10. Statistical analysis

All measurements were carried out at least in triplicate using freshly prepared samples and data were reported as mean and standard deviation.

3. Results and discussion

3.1. Investigation of the protein-polysaccharide interaction by optical density measurement

The effect of the pH 7.00-1.50) and biopolymer mixture ratio (1:1 – 10:1) on the complex formation were investigated in admixtures of PPI and separately four different polysaccharides (ALG, GAC, TRAG and TARA) at a constant total biopolymer concentration of 0.3% (w/v) by OD measurements. A comparative study was shown in **figure 26A** for the 2:1 ratio of each PPI-polysaccharide mixture. OD curves of the mixture supernatant compared to the OD of the homogeneous protein solution are shown in **Figure 32 (supplemental data)**.

The homogeneous PPI system has been described in the literature as a bell-shaped turbidity curve according to the pH, where OD starts to increase at a pH of about 6.50 and reaches a maximum OD between pH 3.30 and 4.30, where a flattening of the curve top occurs, related to protein self-aggregation. OD decreases at pH 1.70 (Klemmer et al., 2012). (**Figure 26A**).

The absorbance of PPI-TRAG mixtures revealed a different profile from that of PPI and TRAG homogeneous solutions alone, suggesting an interaction between the protein and the polysaccharide. (**Figure 32A**). The turbidity of a homogeneous tragacanth gum solution did not change as a function of pH as confirmed by the literature (Ghorbani Gorji et al., 2014; Jain et al., 2016). Mixed PPI-TRAG complexes at a ratio of 2:1 formed at pH 5.54 (referred to as pH_c), leading to a slight increase in OD under acidification (**Figure 26A**). Interactions between PPI and TRAG are assumed to take place between the negative charges of the carboxylic acid groups of TRAG chains and the positively charged patches on PPI surface. The presence of TRAG caused a shift in turbidity curves towards lower pH values compared to PPI alone by

reducing the PPI-PPI aggregation. The pH_c became ratio-independent for ratio ranging between 1:1 and 10:1 (**Figure 32A**). With further acidification, the complexes with a ratio of 2:1 tended to grow at pH 4.94, resulting in the formation of insoluble complexes (referred to the second critical pH parameter $pH_{\phi 1}$). At this point, the OD strongly increased, switching from a transparent to a cloudy dispersion (**Figure 26C**). It increased curvilinearly and a shift of $pH_{\phi 1}$ value was observed with the increase in mixture ratio from pH 4.80-5.10 at a ratio of 1:1 to pH 6.30-6.70 at the mixture ratio of 10:1 (**Figure 32A**)(Lan et al., 2020b). This phenomenon was attributed to the rise of self-PPI aggregates formation by increasing the protein concentration in the biopolymer mixture. The turbidity further increased until reaching a maximum OD at pH_{opt} (pH 4.54). At this pH value, an overall charge neutralization was supposed to occur in the biopolymer mixture. At pH_{opt} , the mixtures contained the maximum amount of coacervates and thus showed the maximum OD. Then, a decreasing of OD occurred with further acidification. As for $pH_{\phi 1}$, pH_{opt} increased with the increase in mixture ratio. Overall, a shift of coacervation events towards higher pHs was observed as the biopolymer mixture ratio increased (pH 4.49 at a ratio of 1:1 to pH 4.92 at a ratio of 10:1) (**Figure 26B**). As the same way, it was observed that pH_c , $pH_{\phi 1}$ and $pH_{\phi 2}$ also increased with mixture ratio from 1:1 to 10:1 (respectively from 6.0 to 7.0 for the pH_c value, from 5.0 to 6.5 for the $pH_{\phi 1}$ value and 2.5 to 4.0 for the $pH_{\phi 2}$ value). At a PPI-TRAG ratio of 1:1, the charges of TRAG chains are supposed to saturate the charges of pea proteins. As the mixture ratio increased, the proteins were in excess, resulting in an increased amount of PPI-PPI aggregates and less complex formation, as previously reported in a PPI-GA interaction study (Liu et al., 2009). A dissolution of the electrostatic complexes at $pH_{\phi 2}$ occurred when the electrostatic attractive forces declined between the macromolecules due to the protonation of acid functions of TRAG (pH 1.50-2.50). All complexes were assumed to be dissolved near pH 2.04 as revealed by the absence of OD. The dissolution pH was independent of the mixture ratio.

The formation of soluble and insoluble complexes occurred at a PPI-GAC mixture ratio of 2:1 at pH 4.50 and 4.05, respectively (**Figure 26A**). The increase in turbidity continued up to pH 3.49 reaching the maximal OD value. This value corresponded to the optimal pH value for the maximum formation of PPI-GAC complexes. At $pH_{\phi 2}$ (2.97), the OD decreased because of the dissociation of the formed complexes. This dissociation would be explained by the protonation of carboxylic acid groups, preventing the association with amino groups of proteins due to

electrostatic interactions. Together with the increase in biopolymer ratio, a shift of the optimal pH value was observed. This event was explained by the increase in $\text{NH}_3^+/\text{COO}^-$ ratio in the protein/polysaccharide mixture. The maximum OD for pH_{opt} was obtained at a ratio of 2:1. It could be assumed that it corresponded to the optimal ratio/ pH_{opt} couple for the maximum formation of PPI-GAC complexes obtained (**Figure 32B**). The results are in accordance with other studies (Liu et al., 2009). A shift of pH_{opt} was also observed towards higher pH values with the increase in mixture ratio from 1:1 to 10:1 (**Figure 26B**).

In PPI-ALG mixture at a ratio of 2:1, the critical events attributed to the formation of soluble and insoluble complexes were identified at pH 5.59 (pH_C) and 4.04 ($\text{pH}_{\phi 1}$), respectively, and the optimal biopolymer interactions occurred at pH 2.96 (pH_{opt}) (**Figure 26A**). Together with the increase in biopolymer mixture ratio, the critical pH values shifted towards higher pHs (**Figure 26B**). A strong decrease in OD at $\text{pH} < \text{pH}_{\text{opt}}$ was observed, indicating the occurrence of a partial dissolution of the formed complexes. The maximum OD at pH_{opt} increased from 0.15 at a PPI-ALG ratio of 1:1 to 0.48 at a PPI-ALG ratio of 5:1 (**Figure 32C**). By comparing the different ratios, the 5:1 ratio showed the maximum OD at pH_{opt} value. It suggests that this ratio was considered as the optimal condition for the production of complex coacervates from PPI -ALG couple.

Overall, the pH_{opt} increased progressively with the increase in mixture ratio for the case of polyanionic polysaccharide. According to the literature, pH_{opt} values increase with the mixture ratio until a maximum value is reached after which the OD reached a plateau with further increases in biopolymer mixture ratio (Klemmer et al., 2012).

Regarding PPI-TARA mixtures, the critical events associated with the formation of complex coacervates were identified only at ratios of 1:1 and 2:1 (**Figure 26A, 32D**). The optimal biopolymer interaction occurred at pH 4.48 and 3.58, respectively. Regarding the evolution of pH_{opt} , a shift of pH_{opt} was observed in **Figure 26B**. The behavior was different from other protein-polysaccharide mixtures, as the pH_{opt} decreased with the increase of PPI-TARA ratio. As the ratios increased from 5:1, the turbidity profile of PPI-TARA mixtures was similar to that of homogeneous PPI. Although the latter ratios presented a profile similar to that of PPI alone, the OD of the profile decreased with increasing mixture ratios. For example, for ratios of 5:1

and 10:1 ratios and homogenous PPI at pH 5.50, the OD was respectively of 0.295, 0.157, and 0.088. This observation suggests an increase in protein solubility in the presence of tara gum.

The magnitude of the increase was dependent on the nature of the polysaccharide involved and the mixture ratio. Comparing gum tragacanth, gum arabic and sodium alginate, it seemed that the pH_{opt} decreased with the negative net charge of the polysaccharide. Previous studies have shown that the pH tends to plateau at higher biopolymer ratios (Klemmer et al., 2012).

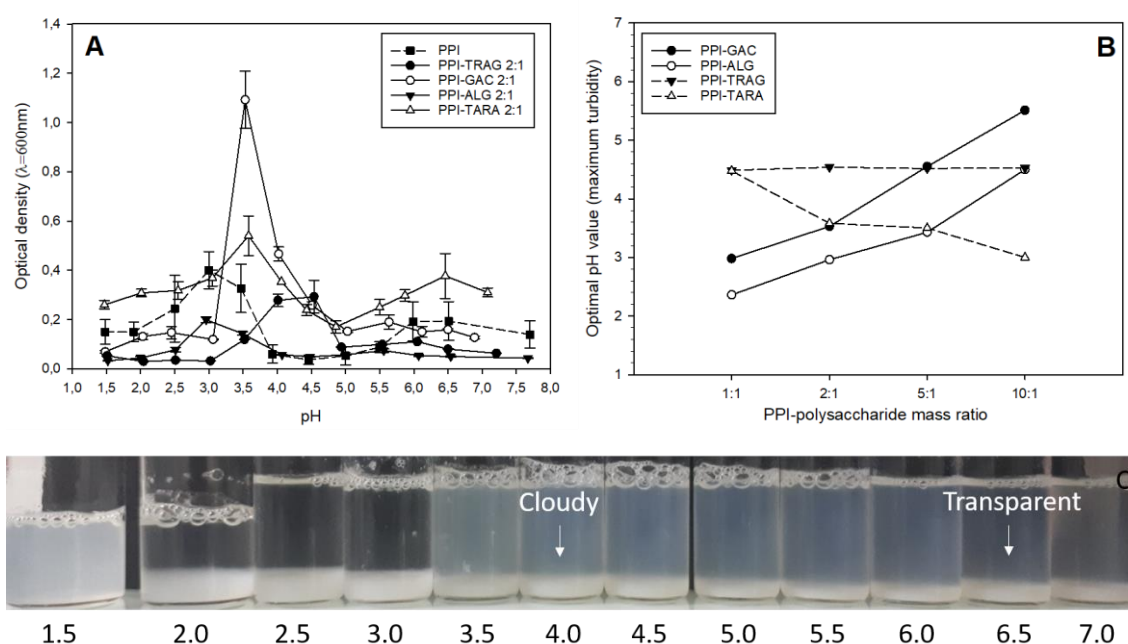


Figure 26: A) Curves of the mean turbidity of PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG and PPI-TARA mixtures at a 2:1 ratio according to the pH. B) Critical pH value (pH_{opt}) according to the mass ratio of mixtures of PPI and different polysaccharides (GAC, ALG, TRAG, TARA). C) Appearance of PPI-TRAG at a 2:1 mixing ratio as a function of pH.

3.2. Zeta potential

The zeta potential analysis allows an understanding of the formation and stability of coacervates formed by electrostatic interactions between oppositely charged proteins and polysaccharides. Changes in zeta potential were investigated according to the pH during the same acid titration as the turbidity profile (pH 7.0-2.0), and according to mixture ratio (1:1-10:1).

PPI showed a cationic nature at pH values less than 4.80 because of the protonation of the amino groups ($-NH_3^+$, theoretic pKa of about 9.4) while it had an anionic nature at pH values greater than 4.8 due to the deprotonation of carboxyl groups (COO^- , theoretic pKa of about 2.5

to 4.5) (Jones and McClements, 2010) (**Figure 27A**). It was admitted that the pKa could change locally depending on the structure of the protein. The isoelectric point (IEP; pI) of commercial pea globulins is known to be in the 4.5-5 pH range, which is consistent with our values (Adebiyi and Aluko, 2011; Cuevas-Bernardino et al., 2018).

Tragacanth gum, arabic gum and sodium alginate showed a negative zeta potential, the absolute value of which increased as the pH increased (**Figure 27A**). Like for other anionic biopolymer, the deprotonation of carboxylic groups occurred with the increasing of pH. At higher pH values, the zeta potential no longer changed.

Tragacanth gum, like arabic gum, showed a relatively strong polyelectrolyte behavior with a maximum zeta potential of -28,5 mV at pH > 5.0 and approached a neutral zeta potential at pH < 2.0 (ZP= -2.7 mV). Structurally, the major fraction of Arabic gum (89% of the total; 280 kDa) consists of a β -(1-3)-galactopyranose backbone highly branched with β -(1-6)-galactopyranose residues terminating in arabinose and glucuronic acid and/or 4-O-methyl-glucuronic acid units (i.e. carboxylic groups from glucuronic acid units) only at the terminus of each branch). This provides the arabinogalactan with its anionic nature. Arabic gum is known to contain about 15-16% of glucuronic acid units (Osman et al., 1993).

Tragacanth gum consisted in two fractions: the water-soluble fraction (composed of tragacanthin) and the water insoluble fraction (composed of bassorin). Tragacanthin, a pectic component, is composed of a chain of α -(1-4)-linked D-galacturonic acid units, some of which being replaced at O-3 by β -D-xylopyranosyl units and some of them being terminated with D-Galactose or L-Fucose. Bassorin is reported as a neutral, highly branched arabinogalactan (of type II) comprising (1-6)- and (1-3)- linked core chains containing galactose and arabinose (both in the form of furanose and pyranose) and side groups of (1-2)-, (1-3)- and (1-5)-linked arabinose units occurring as monosaccharides or oligosaccharides (Kora and Arunachalam, 2012). The galacturonic acid content varies from 10 to 30% per weight in dry matter depending on the species (Balaghi et al., 2011).

Tara gum had a low negative zeta potential between -8 and 0 mV for the pH range tested (**Figure 27A**). The absence of ionisable (acidic or basic) groups allowed the gum to maintain neutrality, and therefore a pKa value estimate was not applicable. Tara gum, unlike most types of anionic polysaccharides (pectin, carrageenan, etc...), is considered a non-ionic

polysaccharide. The main chain of the structure consists of β -(1,4)-mannose units with galactose with α -(1,6)-linked branches with a mannose-to-galactose ratio of 3:1 (Barbosa et al., 2019). Its structure is mainly composed of hydroxyl groups, resulting in its neutral nature. It has been demonstrated that other gums such as Guar, Konjac, locust bean gums, also known as gluco- and galactomannans, have the same profile (Barbosa et al., 2019).

Sodium alginate showed the highest negative value of zeta potential. Manucol LD (the commercial sodium alginate used) has been described by Horniblow et al. as a sodium alginate with a molecular weight of 145 kDa and a galacturonic acid - mannuronic acid ratio of 38:62 (Horniblow et al., 2016). Thus, alginate possesses larger carboxylic acid extremities, explaining the higher maximum zeta potential values compared to arabic gum and tragacanth gum, due to differences in their polymeric structures.

A charge neutralization could be assumed since the addition of anionic polysaccharides is known to induce to cationic protein adsorption via an electrostatic attraction at pH 3.00-3.50.

Regarding PPI-TRAG mixtures, all mixture ratios showed intermediate zeta potentials between those of the two separate biopolymers in solution (**Figure 27B**). As the net charge of biopolymer mixture is closed to zero, the formation of complex coacervation occurred.

Therefore, the IEP was used to represent the pH at which the zero net charge of a biopolymer mixture was achieved, and the influence of biopolymer mixture ratios on the IEP is shown in **Figure 27B, C, D, E**. The electrophoretic mobility corresponded to the mean of electrophoretic mobility of unbound PPI and polysaccharides and that of PPI-polysaccharide complex coacervates. At a mixture ratio of 1:1, the electrophoretic mobility obtained from PPI-TRAG mixture was different from the isoelectric point of PPI alone, decreasing from pH 4,8 (PPI alone) to 3,0 (PPI-TRAG mixture). The mixture showed surface charges similar to those of TRAG with zeta potentials remaining negative within the pH range of 7.0-3.0. As the mixture ratio increased, the isoelectric point changed towards higher pH values, reaching a pH value of 4.20 at a mixture ratio of 10:1, close to homogeneous PPI solution (**Figure 27F**). Similar results have been reported for the association of tragacanth gum with whey proteins (Raoufi et al., 2016). Moreover, a high zeta potential magnitude of soluble complexes, observed at pH > 4.50, has highlighted an electrostatic repulsion in the system, preventing protein precipitation (Klassen and Nickerson, 2012).

The electrophoretic mobility of the PPI-GAC mixture at a ratio of 1:1 was electrophoretically neutral at pH 3.00 (**Figure 27C**). Electrophoretic mobility measurements of the PPI-GAC mixture at a ratio of 2:1 allowed estimating the net neutral surface charge of the formed complexes at pH 3.49, which was consistent with the pH_{opt} of the system. Data were in accordance with similar studies of PPI-GAC complexes (Liu et al., 2009). At a higher pH, the formed complexes carried a net negative charge when the charge contribution from GA was superior to that of PPI. In contrast, at a lower pH, a net positive charge of the complexes was found when the positive charge contribution from PPI dominated due to the protonation of glucuronic acid residues of GA., the IEP of the mixture shifted with a trend similar to PPI-TRAG mixtures when the mixture ratio increased towards higher pH values (**Figure 27F**).

The addition of ALG to PPI shifted the pH of the net neutrality from 4.80 (homogeneous PPI) to 1.47 at a PPI-ALG ratio of 1:1 (**Figure 27D**). As shown by Klemmer et al., an electrophoretic mobility profile similar to that of the homogeneous ALG solution was identified, and a negative charge was retained within the examined pH range (Klemmer et al., 2012). The increased protein content in the mixture ratio inducing a shift towards higher pHs (**Figure 27F**). The pHs of the net neutrality were close to pH_{opt} values at a corresponding biopolymer mixture ratio, suggesting that at pHs close to pH_{opt} , charge neutralisation occurred.

In contrast, the pH corresponding to the net neutrality did not shift with the addition of TARA regardless of the mixture ratio (**Figure 27E, F**). The pH of the net neutrality was equivalent to 4.50 in all mixture ratios. The maximum zeta potential value increased with the ratio, due to the increasing addition of proteins, which were charged, to the mixture. Thus, the evolution of the zeta potential in this mixture was mainly due to the amount of PPI added to the mixture.

The Charge neutralization can be modulated by altering the charge of one or both biopolymers or by varying the mixture ratios between PPI and polysaccharides. The zeta potential values obtained were due to the contribution of complex coacervates but also to unbound PPI and polysaccharides that greatly contribute to the measured net charge according to the ratio and the excess of one of the biopolymers in the mixtures. In all mixture ratios, the zeta potential value of dispersions became more positive with the decrease in pH from 7.00 to 2.00, suggesting the formation of more positively charged complexes. For all mixtures, complexes

carried a net negative charge at $pH > pI$, whereas at $pH < pI$, the complexes carried a net positive charge.

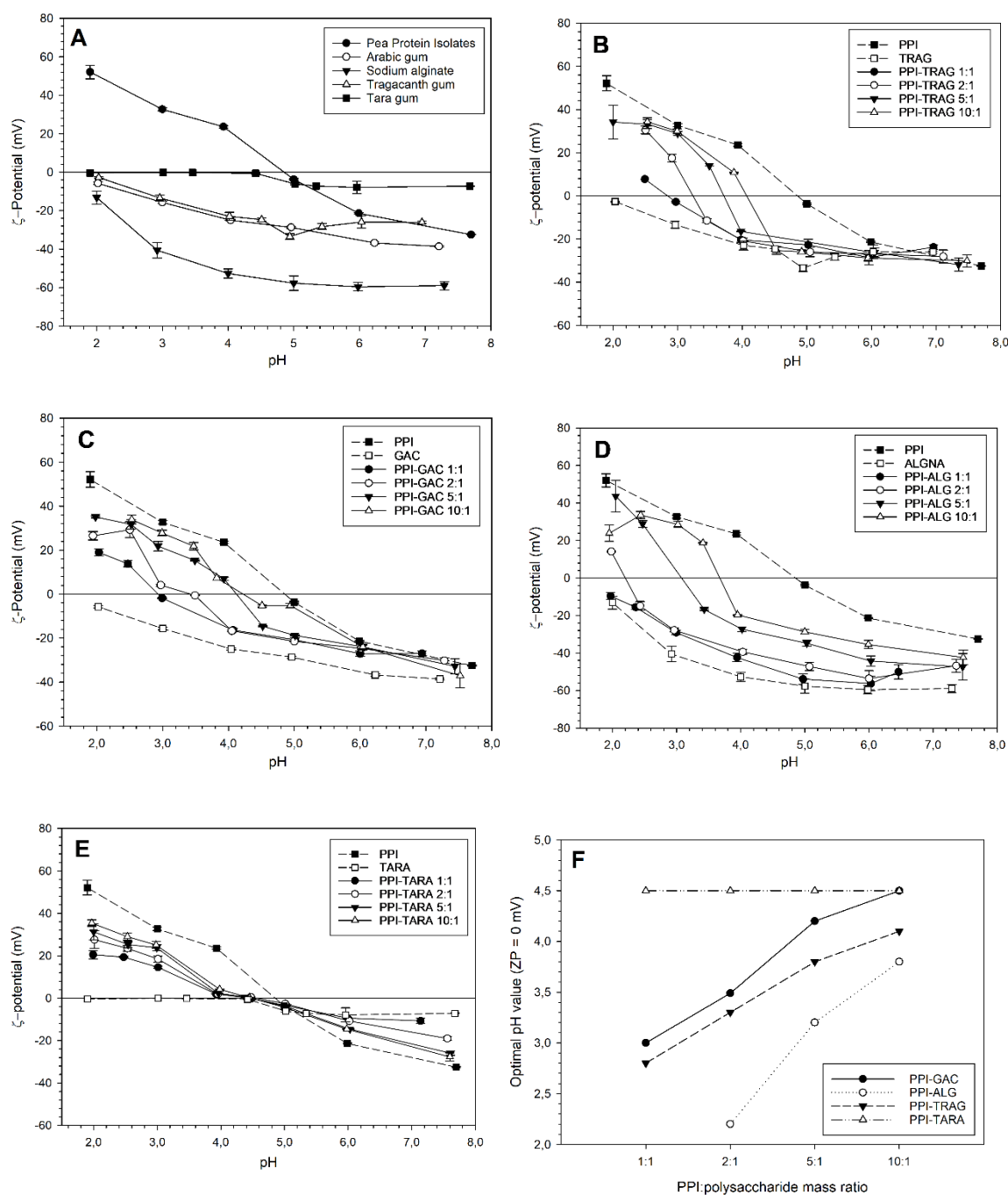


Figure 27: Mean zeta potential (mV) of pea protein isolates and polysaccharides (arabic gum, sodium alginate, tragacanth gum and tara gum) (A) and mixtures (PPI-TRAG (B), PPI-GAC (C), PPI-ALG (D) and PPI-TARA (E)) at different ratios according to the pH. Data represents the mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). F) Critical pH values according to the mass ratio of PPI and different polysaccharides (GAC, ALG, TRAG, TARA).

3.3. Pea protein solubility

In this section, the pH-dependent solubility profile of the soluble PPI-polysaccharide complexes formed was explored.

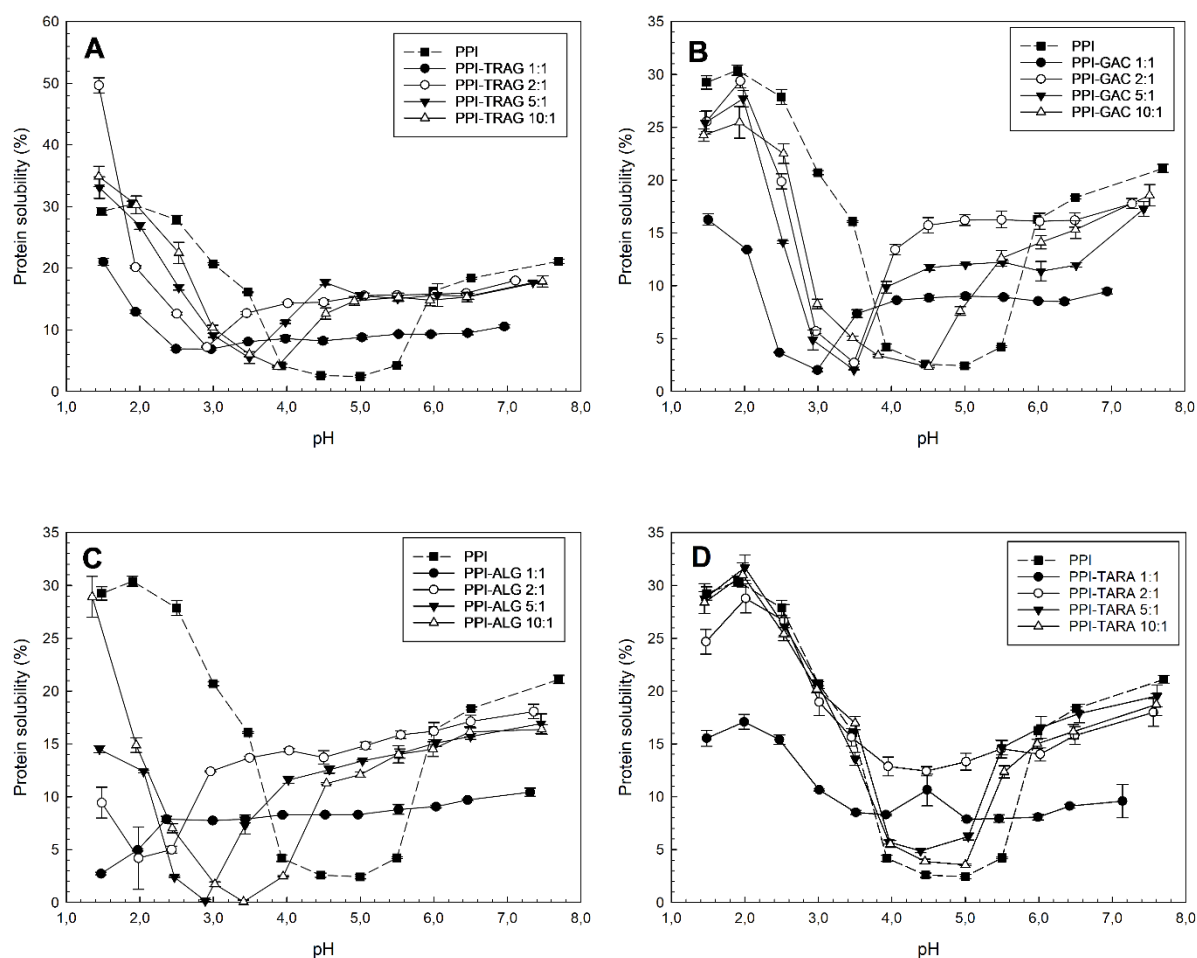
The PPI solubility profile showed a downward trend with a decrease from 22% at pH 7.00 to its minimum (3%) at pH 4.5, corresponding to the protein IEP (**Figure 28A**). It was followed by an increase in solubility with progressive pH decreases. Similar protein solubility profiles have been reported with commercial PPI (Guo et al., 2019).

Regarding PPI-TRAG mixtures, the presence of TRAG increased the PPI protein solubility at pH 4.50 (pI) from 2.5% (homogeneous PPI) to 14.6% (PPI-TRAG ratio of 2:1) (**Figure 28A**). This trend was explained by the decrease of PPI self-aggregation with addition of tragacanth gum. This has also been reported for pea protein - pectin mixtures (Warnakulasuriya et al., 2018). Also, the pH for PPI minimum solubility was shifted from 4.50 to 3.50 as the PPI-TRAG mixture ratio decreased from 10:1 to 2:1. This phenomenon was in agreement with the previously observed phase behavior. This has previously been demonstrated by the protein-polysaccharide complexes formation at pH less than 4.00, increasing protein solubility in an acid pH range (Guo et al., 2019).

Similarly, the addition of GAC and ALG to PPI mixed systems induced a shift in the minimum solubility from PPI alone (**Figure 28B, C**). It has been suggested that this shift could be linked to soluble and insoluble complexes formation (Liu et al., 2010). Also, a shift of pH range from which a minimal solubility occurred has been observed towards more acidic pHs as the polysaccharide amount increased in soy protein-carrageenan complexes (Molina Ortiz et al., 2004). The addition of ALG to PPI resulted in a loss of solubility at PPI-ALG ratio of 5:1 and 10:1 (0.15 and 0.07% respectively), because protein precipitation dominated in the system. Overall, the complexation with anionic polysaccharides appears to shift the pH of the minimum protein solubility towards more acid pH values (Guo et al., 2019; Klassen et al., 2011; Liu et al., 2010). PPI-GAC and PPI-TRAG mixtures shared a similar trend in pH-dependent protein solubility profile in terms of pH value shifting (**Figure 28E**). Differences observed between the PPI-ALG, PPI-GAC and PPI-TRAG mixtures could be related to the charge of the polysaccharide (Klassen et al., 2011). As reported by Klassen *et al.*, alginate and carrageenan differ in their surface charge, leading to a difference in canola protein precipitation, ι -carrageenan being more likely

to induce canola protein precipitation (Klassen et al., 2011). Similarly, the tendency of polysaccharides tested in this study to form complexes with PPI was dependent on the surface charge of polysaccharides, with alginate > arabic gum > tragacanth gum.

Regarding PPI-TARA mixtures, since TARA is a non-ionic polysaccharide, the association with PPI plays a minor role. The incompatibility observed was directly correlated with the protein self-association as observed at ratios ranging between 5:1 and 10:1, because they had a profile similar to that of homogeneous PPI (**Figure 28D**). As the PPI-polysaccharide ratio decreased, the protein solubility increased for values greater than or less than pI by limiting PPI self-aggregation. As showed in **Figure 28E**, the minimum solubility at the different PPI-TARA ratios was close to the pI of PPI because the biopolymers were not charged at this pH. Overall, it has been admitted that the pH and ionic strength only affect protein self-association in protein - non-ionic polysaccharide systems (Syrbe et al., 1998).



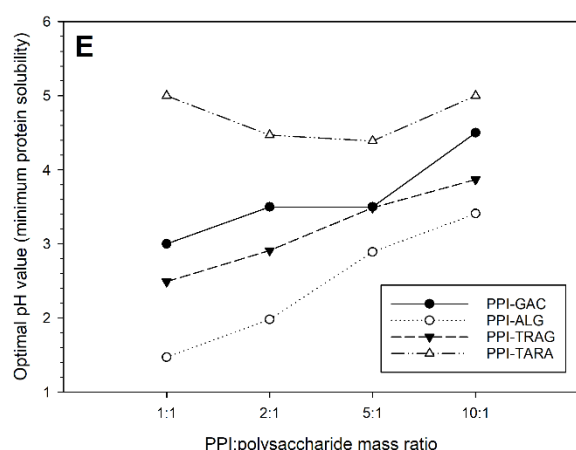


Figure 28: Percentage of protein solubility of the PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) and PPI-TARA (D) mixtures at different ratios according to the pH. Data represents the mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). E) Critical pH values according to the mass ratio of mixtures PPI and different polysaccharides (GAC, ALG, TRAG, TARA) corresponding to the minimum protein solubility.

3.4. Coacervation yield of concentrated mixtures

PPI-TARA and PPI-TRAG mixtures were prepared at a total biopolymer concentration of 1.0% and 2.0% (w/v), respectively, due to the high viscosity of the gums, while PPI-GAC and PPI-ALG mixtures were prepared at a concentration of 5.0%. The coacervation yield was obtained from the percentage of protein solubility measured in the supernatant after centrifugation. The coacervation yield was mainly associated with complex coacervation between the pea proteins and the polysaccharides and with the self-aggregation of pea proteins.

The yields obtained in the PPI-GAC mixtures were in agreement with the previously performed analyses (turbidity and zeta potential) (Figure 29B). The maximum yield corresponded to a mixture ratio of 2:1 at pH 3.50, which was in agreement with the higher OD value obtained in the turbidity analysis. A pH shift was also observed as the mixture ratio increased. However, this shift was not clearly identified as in 0.3% total biopolymer study since the yields seemed to be very close to one another and the maximum yield value obtained did not seem significant.

Similarly, in the PPI-ALG and PPI-TRAG mixtures, the best yields obtained were respectively for the ratio of 5:1 at pH= 3.50 and for the ratio of 2:1 at pH= 3.0 (Figure 29A, C). A shift was also observed as previously reported. However, the results of the PPI-TRAG mixtures differed from those of the turbidity analysis by 0.50 pH unit. The yield was improved in the presence

of alginate due to its higher surface charge, compared to PPI-TRAG and PPI-GAC mixtures. In all pea protein - polysaccharide mixtures, the pH value corresponding to maximal value yield shifted towards higher pHs. This shift of pH values was similar to the pH shift limit in the turbidity and zeta potential studies, showing that the pH required for the maximum production of coacervates shifted as the pea protein - anionic polysaccharide mixture ratio increased.

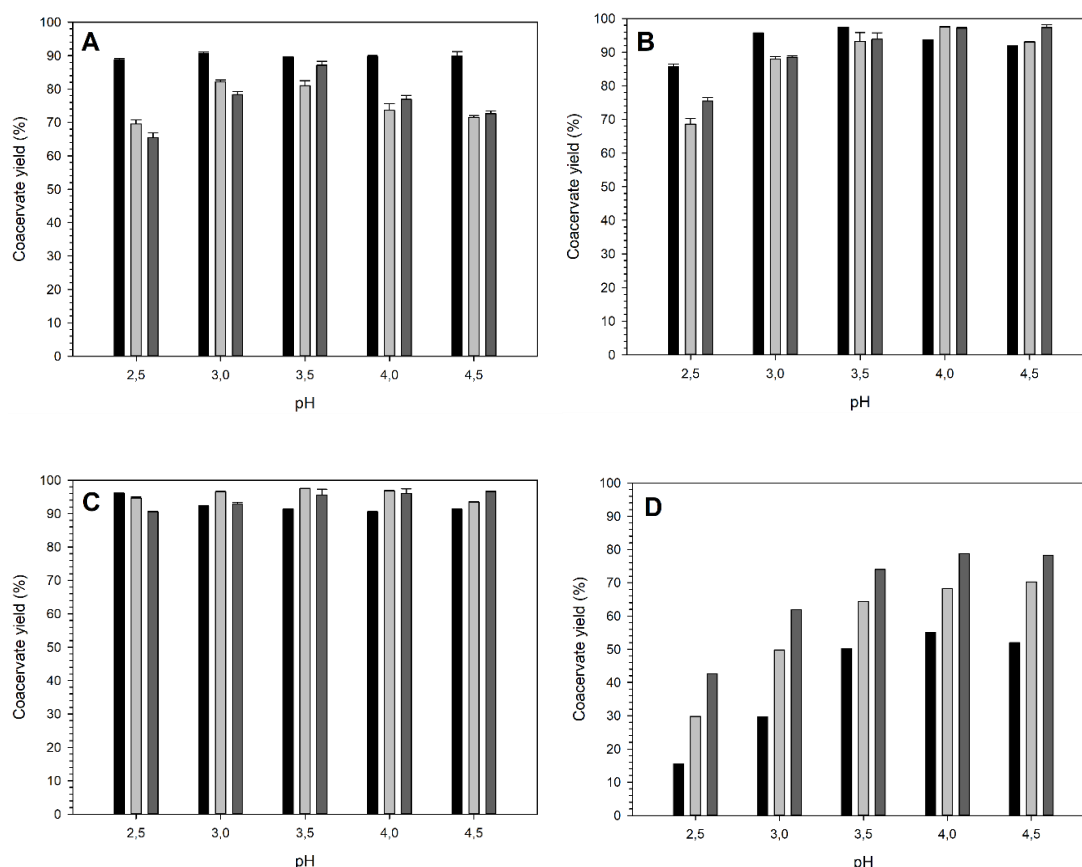


Figure 29: Coacervation yield of pea protein – polysaccharide mixtures (PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) and PPI-TARA (D)) at ratios of 2:1 (black), 5:1 (light grey) and 10:1 (dark grey) determined based on the protein solubility in concentrated solutions.

In contrast, the coacervation yield obtained for PPI-TARA mixtures seemed to correspond to a PPI self-aggregation mechanism as tara gum was considered as a non-ionic polysaccharide (**Figure 29D**). The presence of TARA appeared to decrease the aggregation, since the solubility increased (or the obtained yield decreased).

The higher yield obtained with independent ratios corresponded to the neutral net charge value obtained in the zeta potential analysis. Differences in maximal complex coacervation

yield values obtained between PPI-anionic polysaccharides could be due to the polysaccharide surface charge (alginate > arabic gum > tragacanth gum) as observed in the previous protein solubility study.

3.5. FTIR analysis

Previously prepared complex coacervates were spray-dried to obtain microparticles. Then, they were characterized by FTIR and observed by SEM.

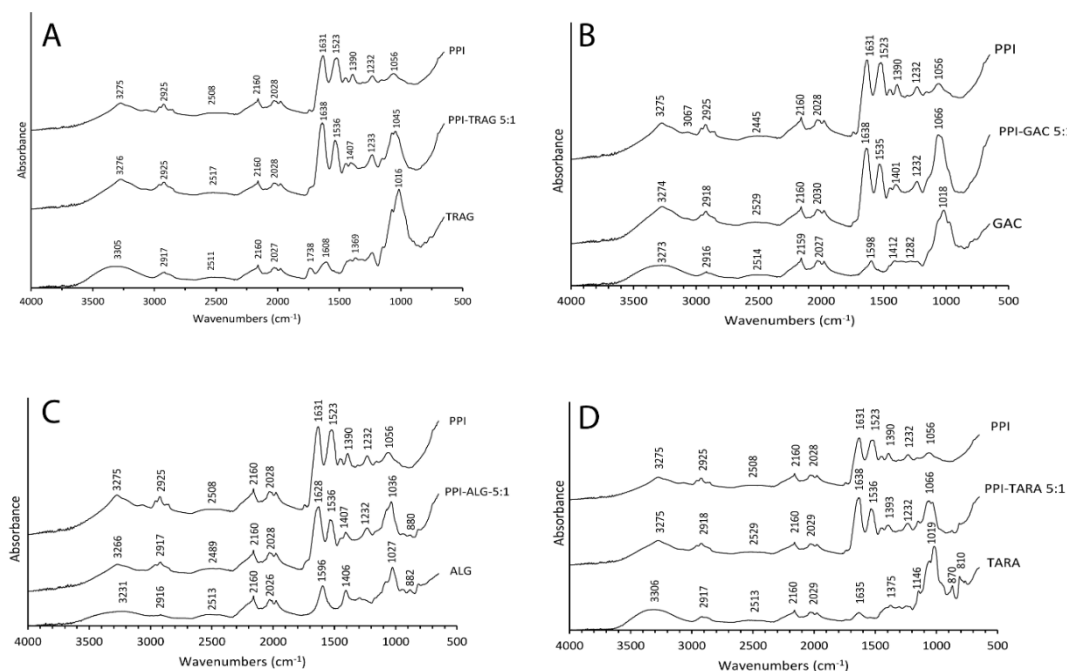


Figure 30: FTIR spectra of the PPI-TRAG (a), PPI-GAC (b), PPI-ALG (c) and PPI-TARA (d) mixtures prepared at PPI: Polysaccharide ratio of 5:1.

The FTIR analysis provides information on the structure of proteins and polysaccharides and their interactions in the mixture. Molecularly, the interactions of functional groups can lead to the appearance of new bands and to changes in absorption band or location in the FTIR spectra. **Figure 30** shows the FTIR spectra of raw materials as well as the dried protein-polysaccharide mixtures.

Regarding the tragacanth gum spectrum, the broad band at 3305 cm^{-1} could be attributed to stretching vibrations of hydroxyl- groups in the gum (**Figure 30A**). The bands at $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ corresponded to asymmetric and symmetric stretching vibrations of C-H groups. The broad band at 2160 cm^{-1} was related to the carbonyl species of the gum. The peak at 1608 cm^{-1} could be attributed to the characteristic asymmetrical stretching of carboxylate group. The symmetrical stretching of carboxylate groups could be associated with the bands present in the zone of 1369 cm^{-1} (Kora and

Arunachalam, 2012). The peaks of the region of 1016 cm^{-1} were associated with the fingerprint region of carbohydrates.

The spectrum of arabic gum showed an absorption band at $3290\text{--}3305\text{ cm}^{-1}$ corresponding to -OH hydrogen bonded groups, characteristics of glucosidic rings (**Figure 30B**). The peak at 2916 cm^{-1} was due to the presence of sugars, galactose, arabinose, rhamnose, alkane with C-H stretching and aldehyde C-H. The peaks at 1598 and 1412 cm^{-1} were respectively related to COO^- symmetric and asymmetric stretching. The peak at 1018 cm^{-1} was associated with alkene C-H bends (Daoub et al., 2018).

The spectrum of sodium alginate showed characteristic bands corresponding to carboxylic, ether and hydroxyl groups (**Figure 30C**). The peak at 1406 and 1596 cm^{-1} were attributed to symmetric and asymmetric -COO^- stretching vibration, while the peak at 3231 cm^{-1} was related to the stretching vibration of -OH groups (Nayak and Pal, 2011).

The spectrum of tara gum showed characteristic peaks at 810 and 870 cm^{-1} , which are associated with the presence of $\alpha\text{-D-galactopyranose}$ units and $\beta\text{-D-mannopyranose}$ units (**Figure 30D**). The peaks at 1019 and 1146 cm^{-1} corresponded to the C-O stretching vibration of pyranose rings. (Figueiro et al., 2004). The peak at 1375 cm^{-1} was attributed to -CH_2 and C-OH symmetrical deformations. The peak at 1635 cm^{-1} was associated with the association with water. The broad peaks ranging from 2800 to 3000 cm^{-1} were related to the O-H and C-H stretching vibration.

Regarding pea proteins, a strong -OH contraction vibration band and a C-H stretching band were respectively observed at 3275 cm^{-1} and 2925 cm^{-1} (**Figure 30**). The stretching or bending of C=O at 1631 cm^{-1} , N-H deformation and C-N stretching at 1523 cm^{-1} and C-N stretching at 1232 cm^{-1} corresponded to amide I (high content of β -sheet structures), II and III, respectively (Aguilar-Vázquez et al., 2018). The peak of amide I was due to a high content of β -sheet structures (Wang et al., 2011). The peak at 1056 cm^{-1} corresponded to C-O vibration stretching.

Regarding the spectra of raw materials and coacervates, the functional groups present in the coacervates closely resembled the functional groups of pea proteins and the polysaccharides involved. The domination of PPI structure was clearly established in the spectrum of PPI-TRAG complexes due to the higher protein ratio (5:1), but it was different from that of each individual biopolymer.

Regarding PPI-TRAG complexes, the peaks corresponded to amide I of PPI shifted from 1631 to 1638 cm^{-1} (**Figure 30A**). The peaks related to amide II and III were shifted respectively from 1523 and 1232 cm^{-1} to 1536 and 1233 cm^{-1} . The shifting of amide peaks could be explained by conformational changes in α -helix structures towards β -sheets configuration (Mousazadeh et al., 2018). Moreover, a decrease of the intensity of amide II and III peaks (respectively at 1536 cm^{-1} and 1407 cm^{-1}) was observed in the complexes compared to the separate pea protein solution due to a decrease of free functional groups. The disappearance of peaks corresponding to TRAG, especially at 1635 cm^{-1} , could also point out the presence of interactions between the two biopolymers (Mousazadeh et al., 2018). In addition, the disappearance of the peak might be attributed to the excess of protein in the mixture. The “fingerprint region” of PPI-TRAG coacervates showed a broad band (1100-950 cm^{-1}) which could be due to the superposition of PPI (1056 cm^{-1} corresponding to carboxylate stretching vibration) and TRAG (peak 1073 and 1016 cm^{-1} , C-O-C stretching vibration) spectra. This involved the establishment of electrostatic interactions between pea proteins and the gum leading to the formation of coacervates.

Overall, the carbonyl-amide region was affected during the formation complex coacervates. The coacervates did not show the symmetric $-\text{COO}^-$ stretching vibrations (1608 cm^{-1}) found for TRAG. A shift of wavenumbers was observed in amide peaks towards higher values compared to native PPI and could be explained by the establishment of electrostatic interactions between the amino groups of PPI and the carboxylic groups of TRAG. This phenomenon has also been observed in gelatin-carboxymethylcellulose complex formation (Duhoranimana et al., 2017). The same observations were made for PPI-GAC mixture. In the case of PPI-ALG mixture, a shift of the amide I peak wavenumber was observed towards lower value compared to native PPI (1631 cm^{-1} to 1628 cm^{-1}).

3.6. ESEM observations

A systematic examination of the surface morphology of the spray-dried microparticles was achieved by Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) (**Figure 31**). The average size of microparticles ranged between 2 and 10 μm . The aggregation of sub-micron particles on larger particles was observed. The microparticles showed a predominantly spherical shape with a rough surface and concavities. These wrinkles/distorsions have been attributed to the uneven shrinkage of the particles during the drying process with rapid evaporation of water (Eratte et al., 2015; Sheu and Rosenberg, 1998). The appearance of these microstructures has been observed by various authors in the preparation of microparticles using a spray-drying process (Gharsallaoui et al., 2010;

Nesterenko et al., 2012; Pierucci et al., 2007). These wrinkles could improve the release properties of microparticles due to a greater surface area. Details of the microparticle surface showed a regular polymeric network, without any porous structure, suggesting a high integrity of the encapsulating materials. However, some nanometric irregularities were observed at the surface of some particles, also modulating the release of potential encapsulated compounds (Jun-xia et al., 2011) (**Figure 31**, PPI-TRAG x100,000). These irregularities could be described as a network composed of organized “fibrillar-like” strands of 25-75 nm. These nanostructures are similar to those observed during pea protein gelation in the presence of calcium chloride (Munialo et al., 2014). However, the morphology of pea protein-based particles obtained using spray-drying process has not been clearly described in the literature at a nanometric scale since the use of a coating during SEM observations could cover the roughness and porosities on the particle surface due to their small dimensions. The metal-coated particle surface looked smoother than it actually was (Conforto et al., 2015). Since this roughness was found on the various protein-polysaccharide mixtures, it could be assumed that it could be linked with the nature of the protein instead of the nature of the polysaccharide.

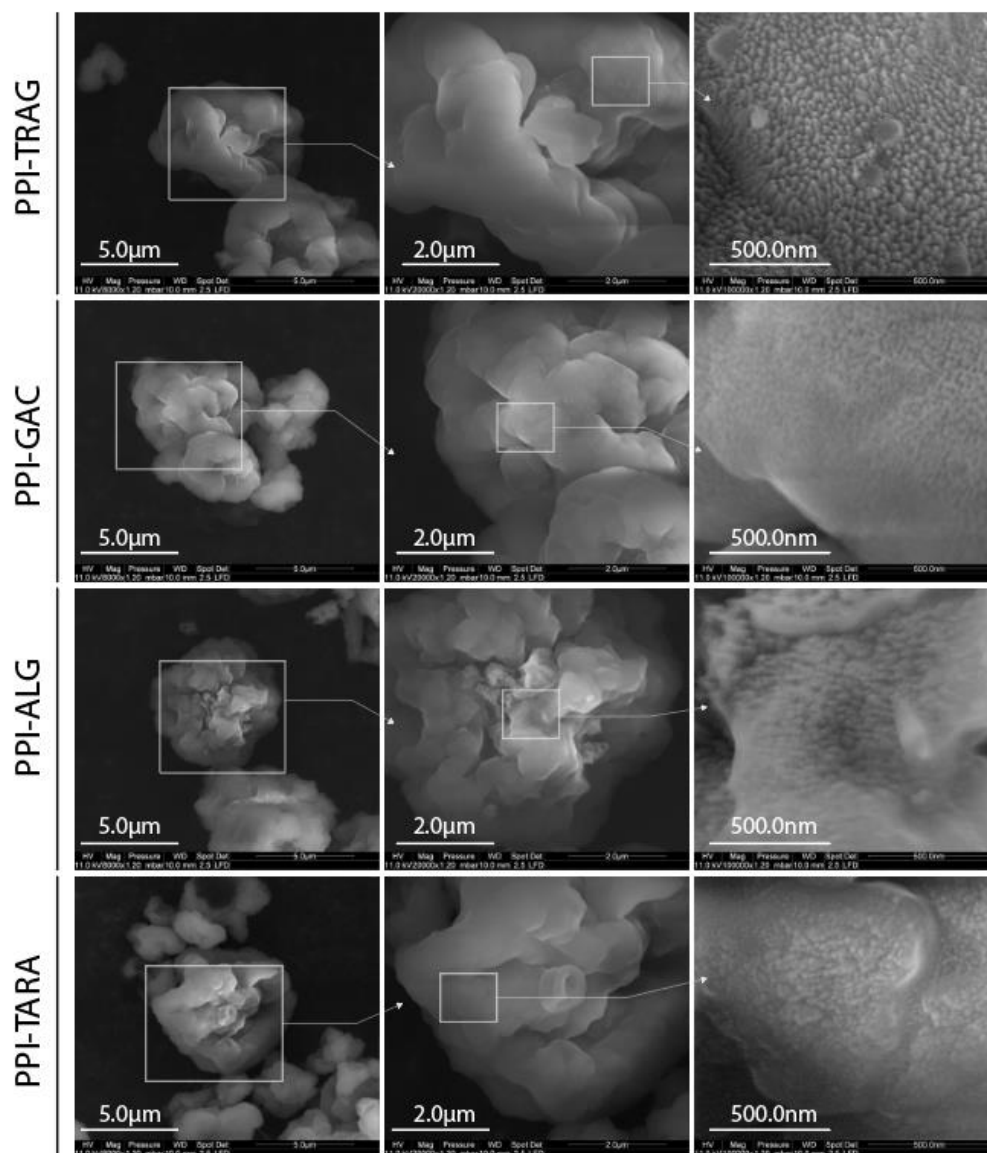


Figure 31: SEM observations (left to right: x8,000; x20,000; x100,000) of spray-dried PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG and PPI-TARA coacervates prepared at a ratio of 5:1.

4. Conclusion

This study compared the ability of commercial tragacanth gum to form complex coacervates with pea proteins to three other polysaccharides: arabic gum, sodium alginate and tara gum. Tragacanth gum, arabic gum and sodium alginate formed effectively complex coacervates with PPI. Complex coacervation is highly dependent on the pH as well as the nature and concentration of the polysaccharide used. This study showed the optimum parameters for complex coacervation between the pea protein and tragacanth gum with a maximum interaction at a PPI/TRAG ratio of

2:1 at pH 3.5. The zeta potential analysis, that allowed performing the preformulation study, identified a pH shifting from 2.8 to 4.0 as the PPI-TRAG mixture ratio increased from 1:1 to 10:1. Overall, the pH values of critical structure-forming events, especially pH_{opt} values, were shifted towards higher pHs as the protein content increased in all PPI-polysaccharide mixtures. Moreover, the pH-dependent protein solubility profile was shifted towards more acid pH values as the biopolymer ratio decreased. For more concentrated solutions, there was a correspondence of pH values between optimal yield and the neutral net charge value obtained in the zeta potential analysis of 0.3% w/v solutions. Differences in yield obtained could be due to the polysaccharide surface charge (alginate > arabic gum > tragacanth gum). Compared to arabic gum, tragacanth gum appears to be a good alternative since its properties are similar in association with PPI. Regarding PPI-TARA mixtures, the possible formed complexes were dependent on pea protein self-aggregation since tara gum was considered a non-ionic polysaccharide. The electrostatic interaction between proteins and polysaccharide backbones were verified by FTIR. The surface morphology of the generated microparticles was studied by SEM. The spray-dried microparticles maintained a spherical shape and a surface without fracture. An observation at nanometric scale showed fibrillar-like structures which could be of interest to further studies in other fields of coacervation. Based on our findings, PPI associated with different anionic polysaccharides could be used in the area of microencapsulation.

Declaration of competing interest

The authors are not aware of any affiliations, memberships, funding or financial holdings that could affect the objectivity of this article.

Acknowledgements

We thank Dr Egle Conforto from the CCA platform of La Rochelle University for her assistance in SEM observation. This work was financially supported by INNOV'IA and IDCAPS (La Rochelle, France).

5. References

- Adebiyi, A.P., Aluko, R.E., 2011. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry* 128, 902–908.
- Aguilar-Vázquez, G., Loarca-Piña, G., Figueroa-Cárdenas, J.D., Mendoza, S., 2018. Electrospun fibers from blends of pea (*Pisum sativum*) protein and pullulan. *Food Hydrocoll.* 83, 173–181.
- Anderson, D.M.W., Bridgeman, M.M.E., 1985. The composition of the proteinaceous polysaccharides exuded by *astragalus microcephalus*, *A. Gummifer* and *A. Kurdicus*—The sources of turkish gum tragacanth. *Phytochemistry* 24, 2301–2304.
- 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.
- Balaghi, S., Mohammadifar, M.A., Zargaraan, A., 2010. Physicochemical and Rheological Characterization of Gum Tragacanth Exudates from Six Species of Iranian *Astragalus*. *Food Biophysics* 5, 59–71.
- Balaghi, S., Mohammadifar, M.A., Zargaraan, A., Gavlighi, H.A., Mohammadi, M., 2011. Compositional analysis and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian *Astragalus*. *Food Hydrocolloids* 25, 1775–1784.
- Barbosa, J.A.C., Abdelsadig, M.S.E., Conway, B.R., Merchant, H.A., 2019. Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. *International Journal of Pharmaceutics: X* 1, 100024.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A., 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Res. Int.* 43, 414–431.
- Conforto, E., Joguet, N., Buisson, P., Vendeville, J.-E., Chaigneau, C., Maugard, T., 2015. An optimized methodology to analyze biopolymer capsules by environmental scanning electron microscopy. *Materials Science and Engineering: C* 47, 357–366.
- Daoub, R.M.A., Elmubarak, A.H., Misran, M., Hassan, E.A., Osman, M.E., 2018. Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17, 241–249.
- Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., Boury, F., 2004. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 232, 239–247.
- Duhoranimana, 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.

Figueiro, S., Goes, J., Moreira, R., Sombra, A., 2004. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. *Carbohydrate Polymers* 56, 313–320.

Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., Cayot, P., 2010. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chemistry, 5th Conference on Water in Food* 122, 447–454.

Ghayempour, S., Montazer, M., Mahmoudi Rad, M., 2016. Encapsulation of Aloe Vera extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product. *International Journal of Biological Macromolecules* 93, 344–349.

Ghorbani Gorji, S., Ghorbani Gorji, E., Mohammadifar, M.A., Zargaraan, A., 2014. Complexation of sodium caseinate with gum tragacanth: Effect of various species and rheology of coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules* 67, 503–511.

Guo, Q., Su, J., Yuan, F., Mao, L., Gao, Y., 2019. Preparation, characterization and stability of pea protein isolate and propylene glycol alginate soluble complexes. *LWT – Food Science and Technology* 101, 476–482.

Horniblow, R.D., Latunde-Dada, G.O., Harding, S.E., Schneider, M., Almutairi, F.M., Sahni, M., Bhatti, A., Ludwig, C., Norton, I.T., Iqbal, T.H., Tselepis, C., 2016. The chelation of colonic luminal iron by a unique sodium alginate for the improvement of gastrointestinal health. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 2098–2108.

Jain, A., Thakur, D., Ghoshal, G., Katare, O.P., Shivhare, U.S., 2016. Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. *International Journal of Biological Macromolecules* 87, 101–113.

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.

Kayitmazer, A.B., 2017. Thermodynamics of complex coacervation. *Adv. Colloid Interface Sci.* 239, 169–177.

Klassen, D.R., Elmer, C.M., Nickerson, M.T., 2011. Associative phase separation involving canola protein isolate with both sulphated and carboxylated polysaccharides. *Food Chemistry* 126, 1094–1101.

Klassen, D.R., Nickerson, M.T., 2012. Effect of pH on the formation of electrostatic complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International* 46, 167–176.

Klemmer, K.J., Waldner, L., Stone, A., Low, N.H., Nickerson, M.T., 2012. Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry* 130, 710–715.

Kora, A.J., Arunachalam, J., 2012. Green Fabrication of Silver Nanoparticles by Gum Tragacanth (*Astragalus gummifer*): A Dual Functional Reductant and Stabilizer. *Journal of Nanomaterials* 2012, 1–8.

Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., Rao, J., 2020. Phase behavior and complex coacervation of concentrated pea protein isolate-beet pectin solution. *Food Chem.* 307, 125536.

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

Liu, S., Low, N.H., Nickerson, M.T., 2009. Effect of pH, Salt, and Biopolymer Ratio on the Formation of Pea Protein Isolate–Gum Arabic Complexes. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1521–1526.

Molina Ortiz, S.E., Puppo, M.C., Wagner, J.R., 2004. Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates–carrageenan systems. *Food Hydrocolloids* 18, 1045–1053.

Mousazadeh, M., Mousavi, M., Askari, G., Kiani, H., Adt, I., Gharsallaoui, A., 2018. Thermodynamic and physiochemical insights into chickpea protein-Persian gum interactions and environmental effects. *International Journal of Biological Macromolecules* 119, 1052–1058.

Munialo, C.D., van der Linden, E., de Jongh, H.H.J., 2014. The ability to store energy in pea protein gels is set by network dimensions smaller than 50nm. *Food Research International* 64, 482–491.

Nayak, A.K., Pal, D., 2011. Development of pH-sensitive tamarind seed polysaccharide–alginate composite beads for controlled diclofenac sodium delivery using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules* 49, 784–793.

Nazarzadeh Zare, E., Makvandi, P., Tay, F.R., 2019. Recent progress in the industrial and biomedical applications of tragacanth gum: A review. *Carbohydrate Polymers* 212, 450–467.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V., 2012. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International* 48, 387–396.

Nur, M., Ramchandran, L., Vasiljevic, T., 2016. Tragacanth as an oral peptide and protein delivery carrier: Characterization and mucoadhesion. *Carbohydrate Polymers* 143, 223–230.

Osman, M.E., Williams, P.A., Menzies, A.R., Phillips, G.O., 1993. Characterization of commercial samples of gum arabic. *J. Agric. Food Chem.* 41, 71–77.

- Pierucci, A.P.T.R., Andrade, L.R., Farina, M., Pedrosa, C., Rocha-Leão, M.H.M., 2007. Comparison of alpha-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *J Microencapsul* 24, 201–213.
- Raoufi, N., Kadkhodaei, R., Phillips, G.O., Fang, Y., Najafi, M.N., 2016. Characterisation of whey protein isolate-gum tragacanth electrostatic interactions in aqueous solutions. *Int J Food Sci Technol* 51, 1220–1227.
- Sheu, T.-Y., Rosenberg, M., 1998. Microstructure of Microcapsules Consisting of Whey Proteins and Carbohydrates. *J Food Science* 63, 491–494.
- Syrbe, A., Bauer, W.J., Klostermeyer, H., 1998. Polymer Science Concepts in Dairy Systems—an Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction. *International Dairy Journal* 8, 179–193.
- Tamnak, S., Mirhosseini, H., Tan, C.P., Tabatabaee Amid, B., Kazemi, M., Hedayatnia, S., 2016. Encapsulation properties, release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectin–pea protein isolate conjugate and Tween 80. *Food Hydrocolloids* 61, 599–608.
- Toews, R., Wang, N., 2013. Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food Research International* 52, 445–451.
- 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.
- Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z., Li, D., 2011. Effect of Secondary Structure determined by FTIR Spectra on Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate. *Procedia Eng.* 15, 4819–4827.
- Warnakulasuriya, S., Pillai, P.K.S., Stone, A.K., Nickerson, M.T., 2018. Effect of the degree of esterification and blockiness on the complex coacervation of pea protein isolate and commercial pectic polysaccharides. *Food Chemistry* 264, 180–188.
- Weinbreck, F., de Vries, R., Schrooyen, P., de Kruif, C.G., 2003. Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic. *Biomacromolecules* 4, 293–303.

6. Supplementary data

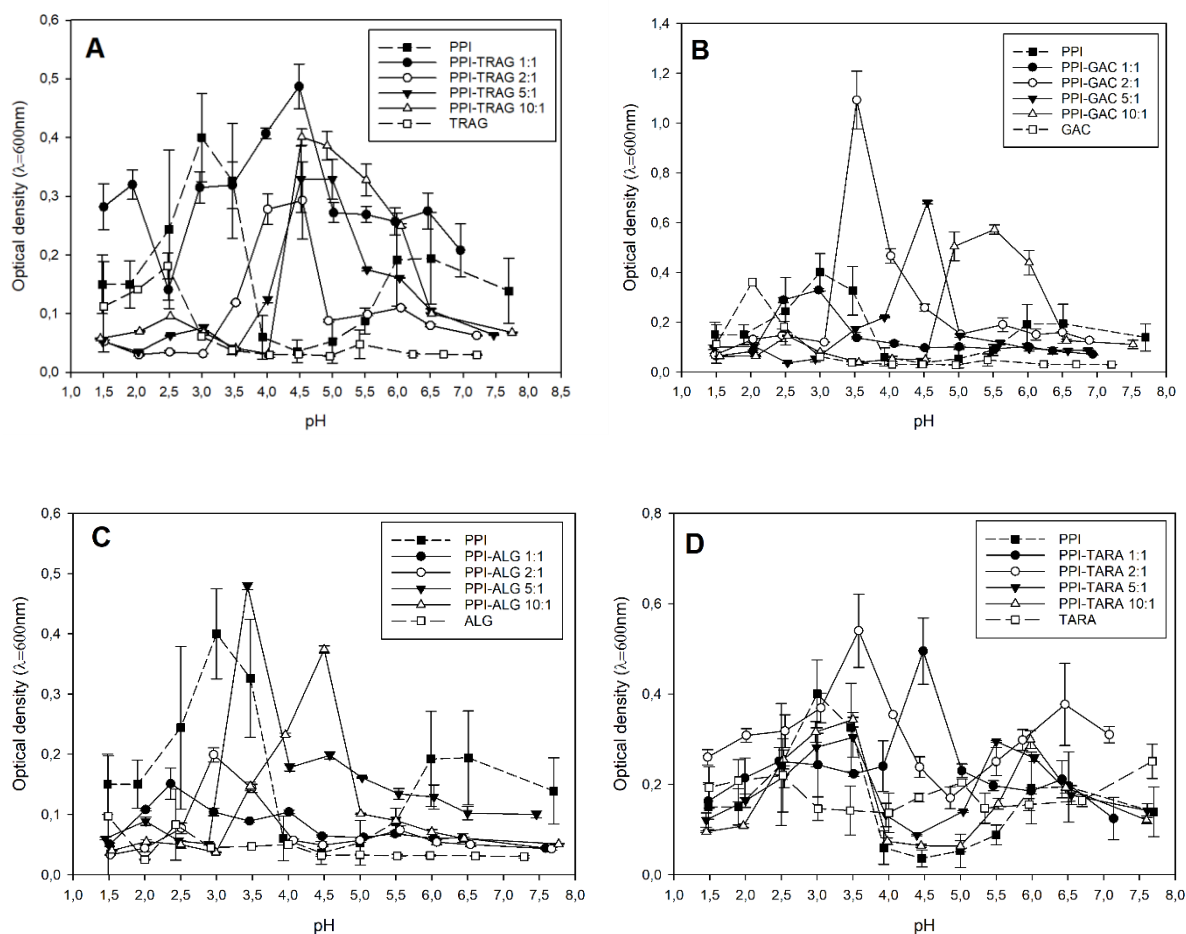


Figure 32: Curves of the mean turbidity of PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) and PPI-TARA (D) mixtures according to the pH.

Conclusion :

Cette étude a permis de comparer les capacités de la gomme adragante, la gomme arabique et l'alginate de sodium à former des coacervats complexes avec la protéine de pois. Dans un premier temps, une étude de coacervation complexe en phase liquide a été réalisée à une concentration de 0,3% m/v , en vue d'une étude structure/fonction du mélange. L'une des conditions les plus importantes permettant l'établissement de la coacervation complexe est d'amener les charges de biopolymères chargés de manière opposée suffisamment proches pour permettre une interaction électrostatique entre les composés. Ce phénomène de coacervation complexe est principalement sensible au pH en raison de la variation des charges des polymères en fonction du pH. Ainsi, la caractérisation des couples

protéines/polysaccharides en fonction du ratio et du pH par des mesures comme le potentiel zêta ou la turbidité permet d'identifier la plage de pH de coacervation appropriée aux différents couples étudiés. Ce phénomène est dépendant de la nature et de la concentration du polysaccharide utilisé pour une même protéine associée.

Les travaux ont permis d'identifier les paramètres optimaux pour la coacervation complexe entre la protéine de pois et la gomme adragante avec une interaction maximale à un rapport PPI / TRAG de 2:1 à pH 3,5. Dans le cas de la gomme arabique et l'alginate de sodium, les paramètres identifiés pour les biopolymères d'origines commerciales sont en accord avec la littérature étudiant des composés isolés de protéines de pois et de polysaccharides purifiés (Klemmer et al., 2012; Liu et al., 2010).

Dans l'ensemble, les événements critiques (pH_c , $pH_{\phi 1}$, pH_{opt} et $pH_{\phi 2}$) de formation des coacervats complexes ont été déplacés vers des pH plus élevés à mesure que la teneur en protéines augmentait dans tous les mélanges PPI-polysaccharides. Par exemple, l'analyse du potentiel zêta a identifié un changement de pH de 2,8 à 4,0 lorsque le rapport de mélange PPI-TRAG augmentait de 1:1 à 10:1. Il en est de même pour les couples PPI-GAC et PPI-ALG. Ainsi, les paramètres optimaux de coacervation complexes peuvent être modulés en fonction de la nature du polysaccharide associé à la protéine et du ratio entre les biopolymères. De plus, le profil de solubilité des protéines dépendant du pH a été déplacé vers des valeurs de pH plus acides à mesure que le rapport des biopolymères diminuait.

Pour des solutions plus concentrées (concentration entre 1 et 5% m/v), un rendement de coacervation complexe a été étudié. Ce rendement de coacervation est principalement associé au phénomène de coacervation complexe entre les biopolymères chargés de manière opposée et au phénomène d'auto-agrégation des protéines de pois. Les résultats ont montré une correspondance entre le rendement optimal de coacervation complexe et la valeur de charge nette nulle obtenue dans l'analyse du potentiel zêta de solutions à 0,3% m/v. Les différences de rendement de coacervation complexe obtenues pourraient être dues à la charge superficielle du polysaccharide (alginate > gomme arabique > gomme adragante).

La gomme adragante semble représenter une bonne alternative à la gomme arabique car ses propriétés sont similaires en association avec la protéine de pois. De plus, les propriétés

stabilisantes et émulsifiantes de la gomme adragante montrent un potentiel intéressant pour la microencapsulation ([Balaghi et al., 2010](#)).

En ce qui concerne les mélanges PPI-TARA, les complexes éventuellement formés sont associés à l'auto-agrégation des protéines de pois en raison du caractère non-ionique de la gomme tara. Cette observation a été confortée par les analyses de potentiel zêta, de solubilités des protéines et du rendement de coacervation. Dans les trois analyses, les conditions optimales de formation de coacervats « complexes » correspondaient au point isoélectrique de la protéine de pois (pH=4,5). La présence de la gomme tara atténue toutefois ces phénomènes d'auto-agrégation en augmentant la concentration en polysaccharide (augmentation de la solubilité des protéines et diminution du rendement de coacervation).

Le séchage par atomisation des solutions concentrées a permis l'élaboration de microparticules à l'échelle laboratoire, caractérisées par FTIR et microscopie électronique à balayage.

La présence d'interactions électrostatiques entre les protéines et les polysaccharides (TRAG, GAC et ALG) a également pu être mise en évidence par FTIR dans la région carbonyl-amide. Un décalage des pics d'amides a notamment été mis en évidence vers des valeurs supérieures par rapport à la protéine de pois seule ainsi qu'un décalage des groupements acides carboxyliques.

La morphologie de surface des microparticules générées a été étudiée par microscopie électronique à balayage. Les microparticules séchées par atomisation ont conservé une forme sphérique et une surface lisse sans pores ou fractures. Des concavités ont été observées à la surface des particules et sont associées à l'évaporation d'eau au cours du procédé de séchage par atomisation. Cette morphologie a été observée dans les différentes formulations PPI-GAC, PPI-TRAG, PPI-ALG et PPI-TARA. Selon la littérature, ces distorsions peuvent moduler les propriétés de libération d'un actif encapsulé en raison de l'augmentation de la surface ([Walton and Mumford, 1999](#)). Une observation à l'échelle nanométrique a montré des structures de type fibrillaire qui pourraient être intéressantes pour des études ultérieures dans d'autres domaines de la coacervation.

Sur la base de nos résultats, les protéines de pois associées à différents polysaccharides anioniques (gomme adragante, gomme arabique, alginate de sodium) pourraient être utilisées dans le domaine de la microencapsulation en tant que matrice encapsulante pour la vectorisation de composés lipophiles.

Points-clés :

- Capacité de la gomme adragante, de la gomme arabique et l'alginate de sodium à former des coacervats complexes avec les protéines de pois
- Phénomène sensible au pH
- Identification et modularité des paramètres optimaux (pH ratio protéine/polysaccharide) pour chacun des couples
- Propriétés de formation de coacervats complexes similaires entre la gomme arabique et la gomme adragante : la gomme adragante peut représenter une alternative à la gomme arabique
- Séchage par atomisation des coacervats complexes sous forme de microparticules
- Formation de microparticules sphériques et lisses typique du procédé de séchage par atomisation
- Présence de distorsions à la surface des microparticules

Résultats et discussion

Chapitre 2 : Influence de la coacervation complexe sur le comportement des microsphères

Chapitre 2 : Influence de la coacervation complexe sur le comportement des microsphères

1. Introduction / enjeux

Les différents modèles de coacervation complexe étudiés dans le chapitre précédent ont permis l'élaboration de microparticules composées d'une matrice basée sur l'interaction entre les protéines présentant un caractère amphiphile et les polysaccharides. Ces microparticules ont été adaptées pour le développement d'un vecteur (microsphère) permettant l'encapsulation d'un actif hydrophobe (mélange huile de tournesol / α -tocophérol) en vue d'une protection et une libération pH-dépendante.

La coacervation complexe a été rapportée comme une méthode efficace pour la microencapsulation d'actifs de nature lipophile (huile de poisson), en utilisant notamment comme matrice encapsulante un mélange gélatine/polyphosphate ([Barrow et al., 2007](#)). La gélatine a également prouvée son efficacité en tant que composé cationique associé aux composés polyanioniques comme la gomme arabique, la pectine, la carboxyméthylcellulose ou encore l'alginate pour l'élaboration de systèmes de coacervation complexe encapsulant des composés lipophiles ([Devi et al., 2012](#); [Dong et al., 2011](#); [Duhoranimana et al., 2018](#); [Muhoza et al., 2019](#)). Toutefois, en raison de l'émergence de maladies ces dernières années impliquant notamment les prions, des réglementations liées à la sécurité et la santé ont été renforcées, poussant à l'utilisation de sources de biopolymères différentes ([Chourpa et al., 2006](#)). Les protéines extraites de sources végétales, et notamment de légumineuses, ont été largement développées dans le domaine de l'industrie alimentaire ([Bajaj et al., 2017](#)).

L'objectif de ces travaux est d'élaborer des microsphères complexes basée sur un mélange entre les protéines de pois et un polysaccharide (gomme arabique, gomme adragante, alginate de sodium ou gomme tara) comme vecteur d'un actif hydrophobe. Ce mélange a pour avantage de combiner la sensibilité au pH des deux composés, les propriétés émulsifiantes des protéines de pois et présenter des capacités de libération sensibles au pH. Un mélange huile de tournesol/ α -tocophérol (90 :10) (m/m) est utilisé comme modèle d'actif à encapsuler.

La production des microsphères à l'échelle pilote (300g environ) permet d'obtenir une quantité appréciable de microsphères séchées par atomisation. Dans le cadre de cette étude, les microsphères ont été réalisées à partir des matrices de protéines de pois associées à la gomme arabique (PPI-GAC), à la gomme adragante (PPI-TRAG), à l'alginate de sodium (PPI-ALG) et à la gomme tara (PPI-TARA) à différents ratios et comparées à des microsphères formulées à partir de protéines de pois seules en vue de comprendre la fonctionnalité des coacervats complexes et notamment leur stabilité au pH. La variation du ratio protéines - polysaccharides permettra d'apprécier la contribution de chacun des biopolymères impliqués. Les conditions de formulation des microsphères produites à l'échelle pilote ont été adaptées à partir des travaux précédents pour un objectif de production. Le **Tableau 9** rassemble les différentes maquettes réalisées.

Dans ce contexte, cette étude fait l'objet d'une caractérisation des différentes formulations produites au cours du procédé d'émulsion et de coacervation en phase liquide (par suivi granulométrique et viscosimétrique) mais également de la caractérisation des microsphères produites après séchage : caractérisation physique des microsphères et efficacité d'encapsulation, morphologie des particules par microscopie électronique à balayage et étude de libération de l' α -tocophérol en milieu tamponné.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. *Matières appliquées à l'encapsulation*

Les biopolymères utilisés au cours de cette étude sont issus de produits commerciaux présentant un grade FOOD ou FEED, et proviennent de fournisseurs d'ingrédients agroalimentaires.

Les protéines de pois (isolats de protéines de pois *Pisum Sativum*) Nutralys F85M, sous forme de poudre, ont été obtenues de Roquette (Lestrem, FRANCE). Le produit est composé de 80% protéines, 7% d'humidité relative, 3% sucre, 6% de matière grasse totale et 4% de cendres. La gomme arabique Instantgum BA a été obtenue de Nexira (Rouen, FRANCE). La gomme adragante CEROTRAG 887 provient de C.E. Roeper GmbH (Hamburg, ALLEMAGNE). La gomme tara est un galactomannane extrait d'endospermes de graines d'arbustes Tara *Caesalpinia spinosa*. L'exsudat, comportant $\geq 80\%$ de galactomannanes, provient de Starlight Products (Rouen, FRANCE).

2.1.2. *La matière active encapsulée*

Les actifs liposolubles utilisés au cours de cette étude sont la vitamine E sous la forme d' α -tocophérol, qui constitue le marqueur d'encapsulation et l'huile de tournesol, coencapsulée dans les microsphères.

L' α -tocophérol (pureté $\geq 96\%$) provient de Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) sous la référence T3251. Le composé est stocké à 4°C à l'abri de la lumière. L'actif se présente sous la forme d'un liquide visqueux, jaune-brun, hydrophobe, inodore et non-toxique.

L'huile de tournesol, fournie également par Sigma Aldrich sous la référence 88921, est extraite des graines de l'espèce *Helianthus annuus*. Le composé a été testé selon les normes de la pharmacopée européenne. L'huile est stockée à 4°C à l'abri de la lumière. L'actif se présente sous la forme d'un liquide visqueux, jaune, hydrophobe, inodore et non-toxique.

2.1.3. *Les produits chimiques*

Les produits chimiques suivants utilisés dans ce projet de recherche ont été obtenus de Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) : acide chlorhydrique 37% (CAS 7647-01-0 ; réf. 258148), chlorure de sodium (CAS 7647-14-5 ; réf. S1679), hydroxyde de sodium (CAS 1310-73-2 ; réf. 71687), phosphate de potassium monobasique (CAS 7778-77-0 ; P0662), acide trifluoroacétique (CAS 76-05-1 ; réf. 302031). L'acétonitrile (réf. 412391000), provenant du fournisseur Carlo Erba, présente un grade de pureté compatible avec une utilisation gradient pour la chromatographie en phase liquide. Le chloroforme (réf. 438601), provenant également de Carlo Erba, présente un grade adapté à l'analyse ISO et stabilisé à l'éthanol.

2.2. Méthodes

2.2.1. *Formulation des microsphères*

La formulation des microsphères encapsulant un modèle d'actif hydrophobe (un mélange huile de tournesol/ α -tocophérol 90 :10 m/m) est effectuée selon un procédé d'émulsification – coacervation – séchage par atomisation (**Figure 33**).

La première étape consiste à hydrater les biopolymères dans deux cuves différentes : une première cuve permettant d'hydrater les protéines de pois et une seconde cuve permettant d'hydrater l'un des polysaccharides suivants : gomme arabique, gomme adragante, alginate de sodium ou gomme tara. Les biopolymères sont hydratés dans de l'eau distillée à l'aide d'un agitateur à pale (IKA RW20 Digital, Staufen, Allemagne). Dans le cas de la gomme adragante, l'alginate de sodium et la gomme tara, l'eau distillée est préalablement chauffée à 45°C.

Dans la cuve contenant les protéines de pois, l'actif hydrophobe y est dispersé dans la solution protéique sous agitation au moyen d'un Ultra-Turrax (IKA T50 basic, IKA), fixée à 5000 tours/minute pendant 10 minutes pour former la pré-émulsion. La pré-émulsion est ensuite homogénéisée par l'intermédiaire d'un homogénéisateur à haute pression MG2-500B (BOS homogenisers, Hilversum, Pays-Bas) en serrant la première tête d'homogénéisation à 200 bars et la seconde tête à 50bars de sorte à obtenir une pression totale à 250 bars. L'émulsion récupérée est ensuite isolée dans une cuve en vue de poursuivre le procédé.

Le procédé consiste ensuite à réaliser la coacervation entre les protéines et les polysaccharides. Brièvement, la solution de polysaccharide est ajoutée à l'émulsion sous agitation à pale défloculeuse à 500 rpm pour limiter l'introduction d'air dans le mélange.

L'agitation est maintenue pendant 10 minutes. Le pH est ensuite ajusté à l'aide d'acide chlorhydrique 1M en suivant les conditions optimales de coacervation complexe estimées dans la partie précédente. Une agitation est maintenue au cours de cette étape et poursuivie pendant 10 minutes après ajout de l'acide. Le mélange obtenu est soumis au processus de séchage par atomisation.

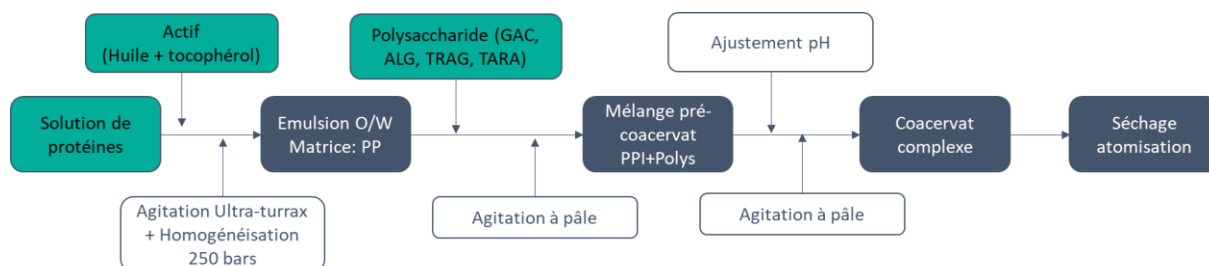


Figure 33: Schéma du procédé de coacervation complexe.

Le tableau reprend les différentes formulations des microsphères de ce projet (**Tableau 9**).

Tableau 9: Formulation des microsphères d' α -tocophérol.

Matrice	Ratio	pH	% actif (m/m)	% d' α -tocophérol* (m/m)	% matrice (m/m)	%d'extrait sec du mélange
PPI	-	6.8	25.0%	2.5%	75.0%	5.0%
PPI-GAC	1 :1	3.0	25.0%	2.5%	75.0% (37.5% PPI – 37.5% GAC)	5.0%
	2 :1	3.5	25.0%	2.5%	75.0% (50% PPI – 25% GAC)	5.0%
	5 :1	4.2	25.0%	2.5%	75.0% (62.5% PPI – 12.5% GAC)	5.0%
	10 :1	4.4	25.0%	2.5%	75.0% (68.2% PPI – 6.8% GAC)	5.0%
PPI-TRAG	1 :1	3.0	25.0%	2.5%	75.0% (37.5% PPI – 37.5% TRAG)	5.0%
	2 :1	3.2	25.0%	2.5%	75.0% (50% PPI – 25% TRAG)	5.0%
	5 :1	3.8	25.0%	2.5%	75.0% (62.5% PPI – 12.5% TRAG)	5.0%
	10 :1	4.2	25.0%	2.5%	75.0% (68.2% PPI – 6.8% TRAG)	5.0%
PPI-ALG	2 :1	2.2	25.0%	2.5%	75.0% (50% PPI – 25% ALGNA)	5.0%
	5 :1	3.2	25.0%	2.5%	75.0% (62.5% PPI – 12.5% ALGNA)	5.0%
	10 :1	3.8	25.0%	2.5%	75.0% (68.2% PPI – 6.8% ALGNA)	5.0%
PPI-TARA	5 :1	4.5	25.0%	2.5%	75.0% (62.5% PPI – 12.5% TARA)	4.5%
	10 :1	4.5	25.0%	2.5%	75.0% (68.2% PPI – 6.8% TARA)	5.0%

* La proportion en tocophérol correspond à 10% du mélange huile - α -tocophérol 90 :10.

2.2.2. Séchage par atomisation

Le séchage des émulsions liquides décrites dans la partie précédente a été effectué sur une tour d'atomisation pilote Minor (Niro Atomizer, Danemark) équipée d'une turbine de modèle F11 (**Figure 34**), dans le but d'obtenir des microparticules individualisées. Les conditions de séchage par atomisation sont les suivantes : la température d'entrée est fixée à $140 \pm 2^\circ\text{C}$, le débit d'air de séchage est d'environ 400kg/h. La température de sortie est contrôlée entre 75°C et 80°C . Le débit de pompe d'alimentation liquide est réglé en fonction de la température de sortie souhaitée. La fréquence de rotation de la turbine est fixée à 50 Hz. Les microsphères sont séparées de l'air humide par l'intermédiaire du cyclone (Niro Atomizer) et collectées dans le récipient de collection. La poudre est stockée dans un flacon fermé à 4°C et à l'abri de la lumière.

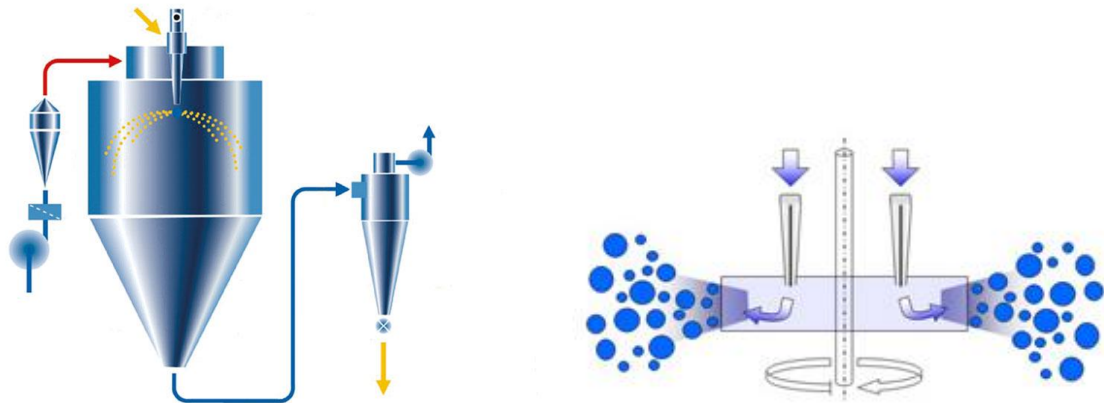


Figure 34: Schéma du séchage par atomisation et d'une turbine F11.

Le rendement du procédé d'atomisation est déterminé par la relation suivante :

$$RA (\%) = \frac{m_{\text{matière sèche}}}{m_{\text{initiale}}} \times 100$$

Avec RA le rendement d'atomisation (en %),

$m_{\text{matière sèche}}$ masse de matière sèche des microparticules collectées après atomisation (en g)

$m_{\text{masse initiale}}$ la masse de matière sèche engagée dans la préparation liquide à atomiser (en g)

2.2.3. Analyse granulométrique

2.2.3.1. Voie liquide – analyse des émulsions

Les distributions de tailles des gouttelettes d'huile en émulsion ou les suspensions de coacervats complexes ont été estimées au moyen d'un granulomètre laser Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). La gamme de taille des particules détectées par l'appareil est de 0,1 μ m à 1000 μ m. Les indices de réfraction utilisés pour le calcul de taille des particules sont les suivants : $n_{\text{particule}}=1,456$ et $n_{\text{eau}}=1,33$. Les distributions granulométriques des dispersions étant multimodales, les résultats de chaque population de particules ont été exprimés selon le paramètre statistique « mode » correspondant à la valeur la plus représentée pour cette population. Le pourcentage de chaque population a également été estimé pour une distribution multimodale.

2.2.3.2. Voie sèche – analyse des microparticules

Le diamètre moyen des microparticules obtenues par séchage par atomisation est déterminé par un granulomètre laser Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Royaume-Uni). Le fonctionnement de l'appareil est basé sur le principe de diffraction multi-angulaire de la lumière rouge (à 633 nm) du laser ou d'une source de lumière bleue (470 nm). La gamme de mesure est comprise entre 0,1 μ m et 1000 μ m. Brièvement, la mesure consiste à introduire 10 g environ de microparticules dans la trémie de l'appareil et la mesure est effectuée dans les conditions suivantes : l'indice de réfraction utilisé est de 1,45, la pression de l'air fixée à 2,5 bars. A partir de la distribution de taille, les diamètres en volume $D(V ; 0,1)$, $D(V ; 0,5)$ et $D(V ; 0,9)$ des microparticules sont déterminées par le logiciel (Malvern).

2.2.4. Mesure de la viscosité apparente

Le comportement rhéologique des suspensions de coacervats complexes est étudié au moyen d'un viscosimètre rotatif de type Brookfield DV-E (Brookfield Ametek, Massachusetts, Etats-Unis). Il permet de mesurer la viscosité d'un fluide à un taux de cisaillement donné. Le principe de fonctionnement de l'appareil est d'entraîner la rotation d'un mobile immergé dans un fluide. Dans le cadre de ce projet, le mobile utilisé est un mobile SC4-31 adapté à l'analyse de petits échantillons dans une cuve Thermosel. Il permet l'analyse de fluides avec une gamme de viscosité entre 30 et 100 kCP (1 cP = 1 mPa.s). Un échantillon de 4mL d'une suspension de coacervat complexe est prélevé et placé dans la cuve thermostatée à 25°C.

2.2.5. *Mesure du taux d'humidité relative*

Le taux d'humidité relative des microparticules est déterminé à partir de la perte de masse de l'échantillon pesé sur une balance dessicante Sartorius (Gottinguen, Allemagne) à 105°C. 2g d'échantillon sont pesés et placés dans un creuset en aluminium et séchés sur la balance jusque masse constante. La balance fournit un résultat exprimé en pourcentage d'humidité relative (%HR).

2.2.6. *Etude morphologique de surface par microscopie électronique à balayage (MEB)*

Les observations par microscopie électronique à balayage ont été réalisées avec un microscope Quanta 200 Environmental Field Gun Apparatus (FEI, France) en mode environnemental. Les observations ont été réalisées selon la méthode développée par Conforto *et al.* avec quelques modifications (Conforto *et al.*, 2015). Les échantillons sont fixés au support d'observation au moyen d'un scotch carbone conducteur double face. Comme décrit par l'auteur, aucun enrobage ou métallisation n'est appliqué sur les échantillons avant observation afin d'écarter toute altération de la surface des particules. L'échantillon est placé dans la chambre d'observation. Les paramètres de la chambre sont ajustés tels que la pression de vapeur d'eau soit de 1,30mbar, la tension d'accélération du faisceau entre 11 et 20 kV. Le courant de vapeur est fixé entre 0,1 et 2 nA. Les échantillons sont observés par les détecteurs SE (Secondary Electrons) et BSE (Back Scattered Electrons).

2.2.7. *Méthode d'analyse HPLC pour le dosage de l' α -tocophérol encapsulé*

100 mg de microsphères sont mis en suspension avec 4,5 mL de chloroforme dans un flacon. La solution est vivement agitée pendant 10 minutes. 1mL de la phase chloroformique est prélevé et centrifugé 10 min à 12000 rpm. Le surnageant est dilué par deux dans l'acétonitrile et stocké dans un vial scellé en vue de réaliser les analyses HPLC.

Le dosage se fait en comparaison avec une gamme étalon établie avec des concentrations connues avec le même produit de référence. L'estimation de la concentration en α -tocophérol est réalisée en calculant l'aire sous le pic de détection UV, après séparation HPLC.

L' α -tocophérol est séparé sur une colonne Interchim C18 WOD Uptisphere. Le composé est élué dans un mélange eau (5%) / acétonitrile (95%) en mode gradient à un débit de 0,8mL/min. Le composé est détecté en UV à 290 nm (**Tableau 10**). Le dosage de l' α -tocophérol est réalisé par comparaison avec une gamme d' α -tocophérol entre 0,1 et 200 μ g/mL (**Figure 35**).

Tableau 10: Conditions analytiques pour la détection de l' α -tocophérol par HPLC.

Conditions analytiques HPLC					
Colonne HPLC	Phase mobile	Gradient (%A / %B)	Injection	Température chauffe-colonne	Longueur d'onde
C18 WOD Uptisphere	5% Eau (A) / 95% B) Acétonitrile Débit : 0,8mL/min	0,00 min : 5% - 95% 10,00 min : 5% - 95% 11,00 min : 0% - 100% 14,00 min : 0% - 100% 15,00 min : 5% - 95%	20 μ L	30°C	UV : 290nm

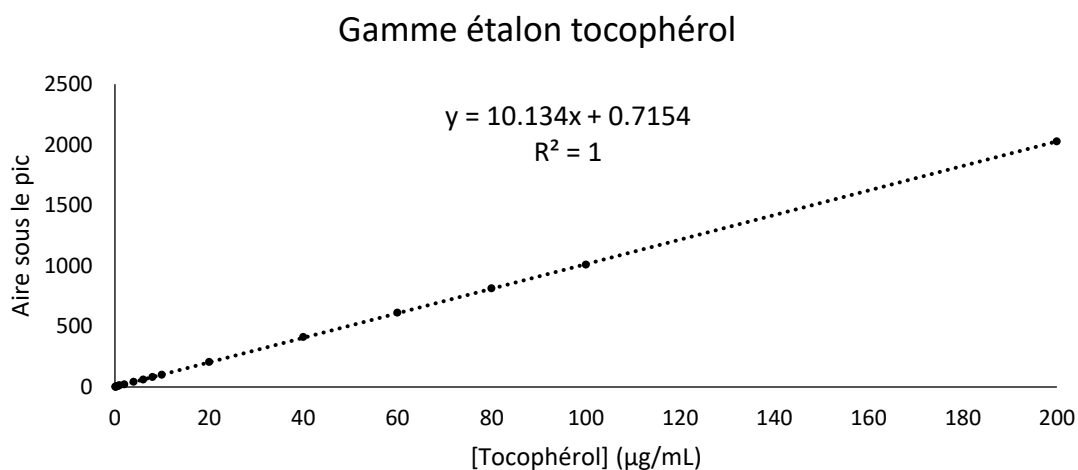


Figure 35: Gamme étalon d' α -tocophérol détectée par HPLC.

La concentration théorique d' α -tocophérol (en $\mu\text{g/mL}$) est déterminée selon l'équation :

$$[\text{Tocophérol}]_{\text{théorique}} = \frac{m_{\text{poudre}} \times T_{\text{tocophérol}}}{V_{\text{solvant}}}$$

Avec m_{poudre} – la masse de matière sèche des microsphères pesées (en mg)

$T_{\text{tocophérol}}$ – le pourcentage d' α -tocophérol théorique contenu dans la matière sèche de microsphères (en %)

V_{solvant} – le volume de solvant ajouté pour l'extraction (en mL)

La concentration expérimentale de tocophérol, notée $[Tocophérol]_{\text{expérimental}}$, (en $\mu\text{g/mL}$) est déterminée à partir de la gamme étalon de tocophérol (**Figure 35**).

L'efficacité d'encapsulation théorique (%EE) est déterminée par le rapport entre la quantité mesurée et la quantité théorique d' α -tocophérol dans les microsphères :

$$\%EE = \left(1 - \frac{[Tocophérol]_{\text{expérimental}}}{[Tocophérol]_{\text{théorique}}}\right) \times 100$$

2.2.8. Etude de relargage en milieu tamponné du tocophérol

L'évaluation du profil de libération de l' α -tocophérol est réalisée dans des milieux de digestion *in vitro* qui permettent de mimer artificiellement les conditions de pH et de température du transit digestif. Deux milieux sont ainsi préparés : le milieu simulé de digestion gastrique (milieu à pH acide) et le milieu simulé de digestion entérique (milieu à pH neutre).

Dans les conditions de digestion gastrique, 90mg de microsphères sont mis en suspension dans 4,5mL d'une solution tampon pH 2,0 dont la préparation est inspirée de la pharmacopée américaine afin d'obtenir une suspension de microsphères à 20g/L. Pour la préparation d'un litre de solution tampon pH 2,0 dans une fiole jaugée, il convient d'ajouter 2.0g de chlorure de sodium (NaCl) et 7mL d'acide chlorhydrique (HCl) 37% à de l'eau ultrapure. Le pH est ensuite ajusté à 2,0 par addition d'acide chlorhydrique 1M ou d'hydroxyde de sodium 1M. La solution est ajustée avec de l'eau ultrapure jusqu'au trait de jauge.

Dans le cas de la digestion entérique simulée, 90mg de microsphères sont mis en suspension dans 4,5 mL d'une solution tampon pH 6,8 dont la préparation est extraite de la pharmacopée américaine afin d'obtenir une suspension de microsphères à 20g/L. Pour la préparation d'un litre de solution tampon pH 6,8 dans une fiole jaugée, 6,8g de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) et 77mL de solution d'hydroxyde de sodium 0,2M sont ajoutés dans de l'eau ultrapure. Le pH est ajusté à 6,8 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 1M ou d'acide chlorhydrique 1M. La solution est ajustée avec de l'eau ultrapure jusqu'au trait de jauge.

Le mélange microsphères/solution tampon est incubé dans une étuve à 37,5°C en présence d'une agitation orbitale de 180 rpm pendant un temps donné. La procédure est répétée pour

chaque temps de prélèvement/analyse ($t = 7, 15, 30, 45, 60, 90$ et 120 minutes). La mesure est réalisée en triplicats.

Le tocophérol relargué se trouve dans le milieu de digestion, autrement dit un milieu aqueux. Une extraction liquide/liquide en présence de chloroforme est nécessaire pour doser la vitamine E relarguée. Ce procédé utilise le protocole suivant :

4,5 mL de chloroforme est ajouté ensuite aux solutions de suspension de microsphères. Le mélange est agité manuellement pendant 10s et est laissé à déphaser (déphasage rapide inférieur à 1 min). 1mL de la phase chloroformique est prélevé et centrifugé 10 min à 12 000 g. Le surnageant est dilué par deux dans l'acétonitrile et stocké dans un vial scellé en vue de réaliser les analyses HPLC.

Une étude complète a été effectuée pour étudier l'impact sur les microsphères de l'utilisation du chloroforme dans ce protocole sur une possible libération parasite de la vitamine E lors de la phase d'extraction liquide/liquide.

3. Résultats et discussion

3.1. Etude de la granulométrie au cours du procédé de coacervation complexe permettant l'encapsulation d'une phase lipidique en vue d'élaborer des microsphères

L'étude présentée dans le chapitre 1, traitant de l'association des protéines de pois avec des polysaccharides chargés ou non négativement par coacervation complexe, a permis de mettre au point des microparticules pouvant être appliquées au processus de microencapsulation d'un actif lipidique sous forme de microsphères.

Ce processus d'encapsulation requiert une étape préliminaire d'émulsification de la phase lipidique dans une phase aqueuse en présence des protéines de pois. Il est nécessaire d'étudier la capacité des protéines utilisées à former une émulsion suffisamment fine pour être stable au cours du processus de microencapsulation par coacervation complexe. Pour vérifier les propriétés émulsifiantes de la protéine de pois utilisée, la première étape consiste à établir une pré-émulsion de la phase lipidique dans la phase aqueuse en présence des protéines de pois. Pour améliorer la stabilité de l'émulsion, une seconde étape d'émulsification par homogénéisation à haute pression est ajoutée. Pour cette étude, la phase lipidique est composée d'une huile de tournesol dans laquelle y est ajoutée 10% (m/m) d' α -tocophérol. Ce marqueur sera utilisé pour la suite de l'étude en tant que marqueur de suivi de l'encapsulation de cette phase. La phase lipidique est émulsionnée dans une solution aqueuse concentrée à 10% m/m en émulsifiant protéique. Après contrôle de l'émulsion réalisée, le procédé de coacervation complexe est poursuivi par l'ajout d'un des polysaccharides étudiés au cours du précédent chapitre et de l'ajustement du pH du milieu afin de favoriser la formation de coacervats complexes. Le contrôle de taille des particules en suspension est réalisé après ajout du polysaccharide et ajustement du pH.

La taille des gouttelettes d'huile est mesurée par granulométrie laser en voie liquide après formulation de l'émulsion. La taille des gouttelettes est un indicateur de la stabilité de l'émulsion au cours du procédé d'encapsulation. Il est admis que plus une gouttelette d'huile est de taille importante et plus cela favorise les phénomènes de coalescence et par conséquent de déphasage de la phase lipidique (Goodarzi and Zendehboudi, 2019).

L'objectif de la première partie de l'étude est donc d'étudier la distribution en taille des gouttelettes et des particules en suspension au cours du procédé afin de garantir une stabilité de l'émulsion au cours de la phase de séchage par atomisation et ainsi obtenir une efficacité d'encapsulation importante.

La seconde partie consistera à étudier l'évolution de la distribution des particules en suspension au cours de l'ajout du polysaccharide dans l'émulsion et de l'étape d'ajustement du pH favorisant la coacervation. Y seront décrits l'influence du choix du polysaccharide dans la préparation de la coacervation complexe (gomme arabique, gomme adragante, alginate de sodium et gomme tara) ainsi que l'influence du ratio protéine/polysaccharide sur la distribution de taille des particules en suspension.

3.1.1. Analyse de la qualité des émulsions préparées à partir de protéines de pois natives

Au cours de cette étude, les protéines pois étudiées, commercialisées par le fournisseur Roquette en tant que Nutralys F85M, sont décrites pour leurs propriétés émulsifiantes permettant la stabilisation d'une quantité importante de charge lipidique dans des préparations alimentaires. Les émulsions étudiées par granulométrie laser ont été formulées à 10% m/m de protéines de pois en phase aqueuse et à 25% m/m de charge lipidique (mélange 90 :10 huile de tournesol / tocophérol). L'étape d'émulsification de l'actif hydrophobe dans la phase aqueuse est effectuée en deux étapes : une pré-émulsion au moyen d'une agitation à l'ultraturrax, suivie d'une homogénéisation à haute pression à 250 bars. La distribution de taille des gouttelettes de l'émulsion est estimée par granulométrie laser en voie liquide. Les résultats sont exprimés en pourcentage volumique, c'est-à-dire en nombre de gouttelettes d'émulsion d'une taille donnée sur le nombre total de gouttelettes analysées au cours de la mesure.

Les résultats de la **Figure 36** montrent l'évolution de la taille des gouttelettes des émulsions formulées avec les protéines de pois avant et après homogénéisation à 250 bars. Les résultats mettent en évidence que la pré-émulsion formée à l'ultraturrax permet de former une émulsion avec une population bimodale dont le diamètre moyen est équivalent à 35,8µm. L'homogénéisation à 250 bars permet de former une émulsion avec un diamètre moyen de 5,75µm. Deux populations de gouttelettes sont observées : une première population quasi

submicronique représentant 60% de la population totale et une seconde population centrée à 10 μ m.

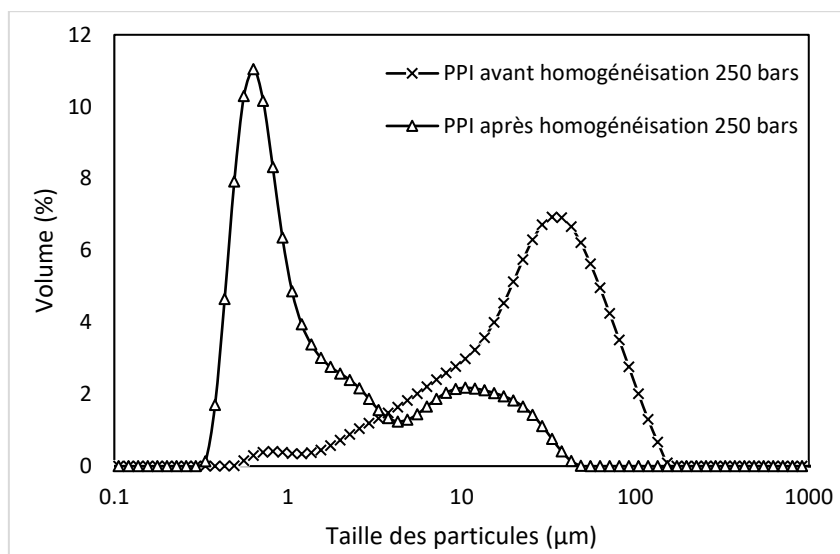


Figure 36: Distribution de taille des gouttelettes d'α-tocophérol en émulsion dans une solution de protéines de pois avant et après homogénéisation à 250 bars.

Par comparaison des deux distributions granulométriques, il semble que l'homogénéisation à 250 bars permette d'obtenir une émulsion plus fine, et donc probablement plus stable (Juttulapa et al., 2017).

L'homogénéisation de l'émulsion à 250 bars est donc une étape importante pour la stabilisation de l'émulsion au cours du procédé.

3.1.2. Analyse de l'évolution de la granulométrie au cours du procédé de coacervation complexe

Des analyses granulométriques en voie liquide ont été réalisées au cours des différentes étapes du procédé de coacervation complexe sur les quatre couples présentés : PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PPI-TARA. Pour cette analyse, seuls les résultats au rapport protéines/polysaccharides 10 :1 (m/m) ont été présentés (**Figure 37**). Pour rappel, l'étape d'émulsification est suivie par l'ajout d'une solution de polysaccharide sous agitation à pale à 500 rpm, puis de l'ajustement du pH sous agitation continue. Les résultats présentés indiquent donc la granulométrie des étapes suivantes : l'homogénéisation à 250 bars de la solution protéines de pois-huile (-Δ-), le mélange protéines de pois-huile-polysaccharide sous agitation à pale défloculeuse (-●-) et l'ajustement du pH sous agitation à pale défloculeuse (-○-). La

courbe correspondant à l'émulsion par homogénéisation à haute pression a été présentée précédemment (cf paragraphe 3.1.1.), et ne fera pas l'objet d'une nouvelle description. Une analyse du polysaccharide seul en solution a également été réalisée (symbolisé -x-). Le **Tableau 11** décrit la taille des différentes populations observées pour chaque distribution granulométrique ainsi que le pourcentage en volume de chacune de ces populations.

Dans le cas du mélange PPI-GAC, une légère augmentation du volume de la seconde population (centrée à 10µm) est constatée après ajout du polysaccharide (-●-). Par conséquent, il semble que l'ajout de la gomme arabique n'altère pas la qualité de l'émulsion (**Figure 37B, Tableau 11**). D'après l'étude précédente sur la coacervation complexe entre PPI-GAC, les coacervats complexes ne se forment pas à pH 6.8. Il peut être déduit que l'ajout de la solution de gomme arabique n'affecte pas la qualité de l'émulsion à cette étape. Cependant, après acidification du milieu au pH optimal de formation des coacervats complexes PPI-GAC (-○-), une modification importante de la distribution granulométrique est observée. En effet, le diamètre moyen des particules est équivalent à 13,1 µm contre 5,75µm pour l'émulsion protéines-huile. D'autre part, la population submicronique (0,6 µm) observée dans l'émulsion PPI-Huile a disparu après abaissement du pH.

L'abaissement du pH semble donc induire l'augmentation de la taille des particules par formation des coacervats complexes. Une agrégation des particules entre elles au cours du mélange peut expliquer l'évolution de la granulométrie. Les travaux de Wei et al., étudiant la stabilisation de la protéine de pois en présence de différents polysaccharides, a mis en évidence que l'abaissement du pH de la protéine de 7 à 3,5 (proche du point isoélectrique de la protéine) entraînait l'augmentation de la taille des particules en raison de la floculation des protéines (Wei et al., 2020). Cette floculation était provoquée par la diminution des charges globales de la protéine à une valeur de pH proche de son point isoélectrique conduisant à l'agrégation des protéines (Liu et al., 2010).

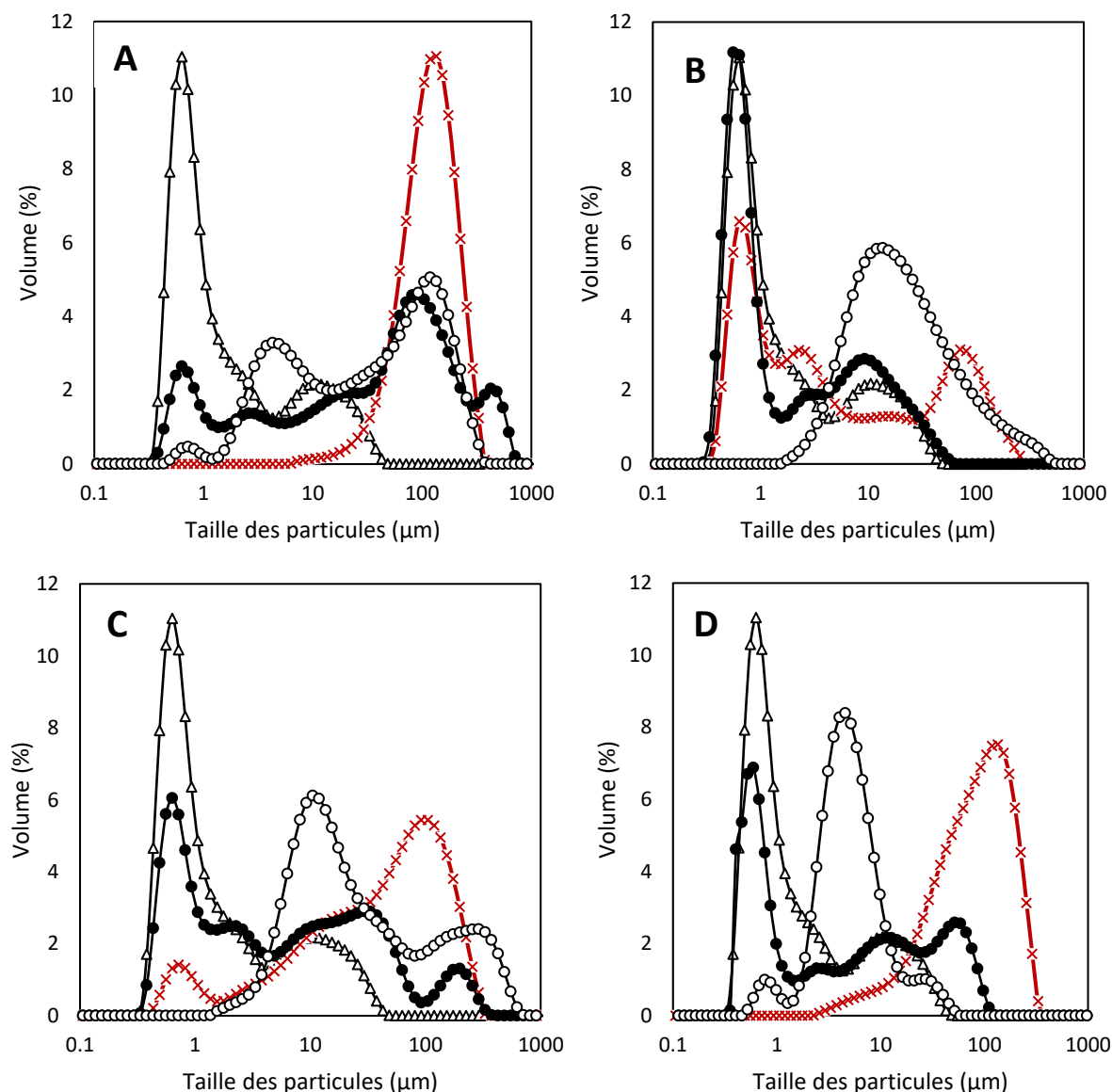


Figure 37 : Evolution de la distribution de taille des gouttelettes/particules en dispersion au cours du procédé de coacervation complexe à partir de : PPI-TRAG 10 :1 (A), PPI-GAC 10 :1 (B), PPI-ALG 10 :1 (C) et PPI-TARA 10 :1 (D). -x- correspond à la solution de polysaccharide seul ; -Δ- correspond à l'émulsion PPI-huile après homogénéisation à 250 bars ; -●- correspond au mélange PPI-polysaccharide sans ajustement du pH ; -○- correspond au mélange PPI-Polysaccharide avec ajustement du pH.

Dans le cas de la gomme adragante, une déstabilisation de l'émulsion est constatée après ajout de la solution de la gomme adragante dans l'émulsion (**Figure 37A, Tableau 11**). La distribution de la taille des particules est hétérogène avec la présence de 5 populations différentes de particules, dont une population inférieure à 1μm correspondant à l'émulsion. Cette différence de distribution de taille des particules peut être liée à la granulométrie de la solution de la gomme adragante ajoutée. En effet, l'analyse de la granulométrie en voie liquide d'une dispersion de gomme adragante à 2% d'extrait sec met en évidence des particules

présentant une taille de 129 μm environ. Les travaux de Farzi et al. ont montré qu'une dispersion à 0,5% de gomme adragante présentait également des particules avec une distribution polydispersée et un $D(4,3)$ équivalent à 130 μm pour des gommes issues de trois espèces différentes (Farzi et al., 2015). Ce système polydispersé est lié à la présence de deux polysaccharides différents : la tragacanthine et la bassorine. La tragacanthine est un polymère ramifié très soluble dans l'eau, ne formant donc que peu d'agrégats. La bassorine, par contre, est considérée comme un polysaccharide insoluble capable de former des agrégats en solution (López-Franco et al., 2009). Dans cette étude, la population à 100 μm semble correspondre à la fraction insoluble de la gomme adragante (bassorine) et la population inférieure à 10 μm à la fraction soluble (tragacanthine). Après ajustement du pH, il peut être constaté que la distribution de taille est moins polydispersée qu'avant ajustement du pH. Trois populations semblent alors obtenues : une population (47% de la fraction) dont la taille est équivalente à 120 μm correspondant au mélange de coacervats complexes protéines de pois – gomme adragante et à la fraction insoluble de la gomme adragante (la bassorine), une population (35% de la fraction) dont la taille est équivalente à 4,4 μm correspondant au mélange de coacervats complexes protéines de pois – gomme adragante, et une dernière population (18% de la fraction) correspondant à l'émulsion protéine-huile n'ayant pas réagi. La fraction submicronique correspondant à l'émulsion n'est plus présente après ajustement. La disparition de la population submicronique peut être liée à la formation d'agrégats après coacervation complexe.

L'ajout de la solution d'alginate à l'émulsion de protéines de pois forme une dispersion dont la distribution de taille des particules est polydispersée (**Figure 37C**). Les premières populations observées, inférieures à 10 μm , semblent correspondre à l'émulsion de protéines de pois-phase lipidique. La population de particules entre 20 et 100 μm semble avoir augmenté après l'ajout de la solution d'alginate et une population de particules dont la taille est supérieure à 100 μm , est observée. Cette augmentation de la taille des particules peut être liée à la structure de l'alginate de sodium ou aux premières phases d'interaction entre la protéine et le polysaccharide chargé négativement à pH 7. Après l'ajustement du pH favorisant la coacervation complexe, une distribution bimodale, et tout comme pour les deux polysaccharides précédents, la disparition de la population de taille submicronique sont observées. La coacervation complexe semble entraîner l'agrégation des particules entre elles,

augmentant la granulométrie du mélange. Selon l'étude de Singh et Burgess, la précipitation de l'albumine était favorisée en présence d'acide alginique au cours de la coacervation complexe (Singh and Burgess, 1989). Cette précipitation peut expliquer l'augmentation de la taille des particules en suspension.

Tableau 11: Distribution granulométrique des différentes solutions PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PPI-TARA au ratio 10 :1 au cours des différentes étapes du processus de coacervation complexe. Les résultats décrivent la taille des différents pics de la distribution (en μm) ainsi que la proportion de chaque fraction/pic.

Couple	Etape	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5
PPI	Emulsion après homogénéisation à 250 bars	0,6 75%	10,6 25%			
PPI-TRAG	Solution TRAG	-	-	-	129 100%	
	Mélange PPI-TRAG	0,6 14%	2,7 11%	21,4 15%	87,5 50%	438 10%
	Ajustement du pH	0,7 18%	4,4 35%	-	119 47%	
PPI-GAC	Solution GAC	0,7 37%	2,3 25%	15,5 9%	74,1 29%	
	Mélange PPI-GAC	0,6 1,5%	3,0 54,5%	9,2 44%		
	Ajustement du pH	-	-	13,1 100%		
PPI-ALG	Solution ALG	0,7 8%		98,7 92%		
	Mélange PPI-ALG	0,6 32%	2,2 17%	30,9 44%	190 7%	
	Ajustement du pH	-	10,8 75%	-	277 25%	
PPI-TARA 10:1	Solution TARA	-	-	-	130 100%	
	Mélange PPI-TARA	0,6 14%	2,8 11%	12,6 15%	57 60%	
	Ajustement du pH	0,7 0,3%	4,2 94,7%	24,3 5%		

Enfin, l'ajout de la gomme tara dans la formulation PPI-TARA entraîne la formation de particules dont la distribution est, tout comme pour les trois premiers polysaccharides, polydispersée (**Figure 37D**). A l'ajustement du pH, la déstabilisation de l'émulsion semble moins importante. Cela peut être expliqué par le fait que la gomme tara est un galactomannane non ionique et par conséquent ne forme pas de coacervats complexes avec les protéines de pois. Par conséquent, l'ajustement du pH ne provoque que l'agrégation entre les protéines. Cela se confirme d'autant plus que le pH de la solution est ajusté à 4,5, pH

correspondant au point isoélectrique de la protéine. La protéine n'est plus chargée à ce pH, entraînant l'agrégation des protéines entre elles. L'étude de l'association entre les protéines de pois et un galactomannane issu de la gomme konjac par Wei *et al.* a montré des résultats similaires. Selon l'auteur, le faible changement de granulométrie est attribué au fait que le galactomannane est neutre et ne s'associe donc pas à la protéine. D'autre part, la faible augmentation de la granulométrie est liée selon la même étude à la forte viscosité du galactomannane, réduisant l'agrégation de la plupart des particules de protéines. (Wei *et al.*, 2020).

En comparant les distributions de tailles des suspensions après ajustement du pH en présence de gomme arabique ou de gomme adragante, une population monomodale est obtenue en présence de gomme arabique tandis qu'en présence de gomme adragante, une distribution bimodale est obtenue avec une première population entre 1 et 10µm et une seconde comprise entre 20 et 500µm. Il peut être déduit que la gomme arabique permet de réduire l'altération de la qualité de l'émulsion comparativement à la gomme adragante.

En comparant l'interaction des protéines de pois avec la gomme arabique et l'alginate de sodium, il peut être constaté que la taille des particules en suspension est plus importante en présence d'alginate. Cela peut être lié à la structure du polysaccharide. En effet, l'alginate de sodium présente une structure en chaîne linéaire en solution tandis que les chaînes ramifiées de la gomme arabique conduisent à une structure globulaire. D'après Duce, le volume hydrodynamique et la viscosité sont plus élevées dans le cas d'une structure allongée et les charges plus accessibles, conduisant à la précipitation des complexes (Duce *et al.*, 2004).

3.1.3. Influence du ratio protéine/polysaccharide sur la distribution de taille des particules de coacervats complexes

Dans cette étude sont présentées les analyses granulométriques en voie liquide des différentes solutions après ajustement du pH de la solution conduisant au phénomène de coacervation complexe. Les résultats ci-dessous présentent l'évolution de la distribution de taille des particules en suspension en fonction de la nature du polysaccharide (gomme adragante, gomme arabique, alginate de sodium ou gomme tara) et le ratio protéine-polysaccharide (1 :1, 2 :1, 5 :1 et 10 :1) (m/m) (**Figure 38**). Le **Tableau 12** décrit la taille des

différentes populations observées pour chaque distribution granulométrique ainsi que le pourcentage de chacune de ces populations.

Dans le cas de la gomme arabique, la distribution des particules en suspension est monomodale quel que soit le ratio utilisé (**Figure 38B**). A l'exception du ratio 1 :1, il semble que plus la proportion en gomme arabique diminue, et plus la taille de la suspension diminue (la taille du pic majoritaire diminuant de 34,8 μ m au ratio 2 :1 à 13,1 μ m au ratio 10 :1) (**Tableau 12**). Il peut être déduit que la présence de la protéine de pois permet de mieux stabiliser l'émulsion qu'en augmentant la charge en polysaccharides.

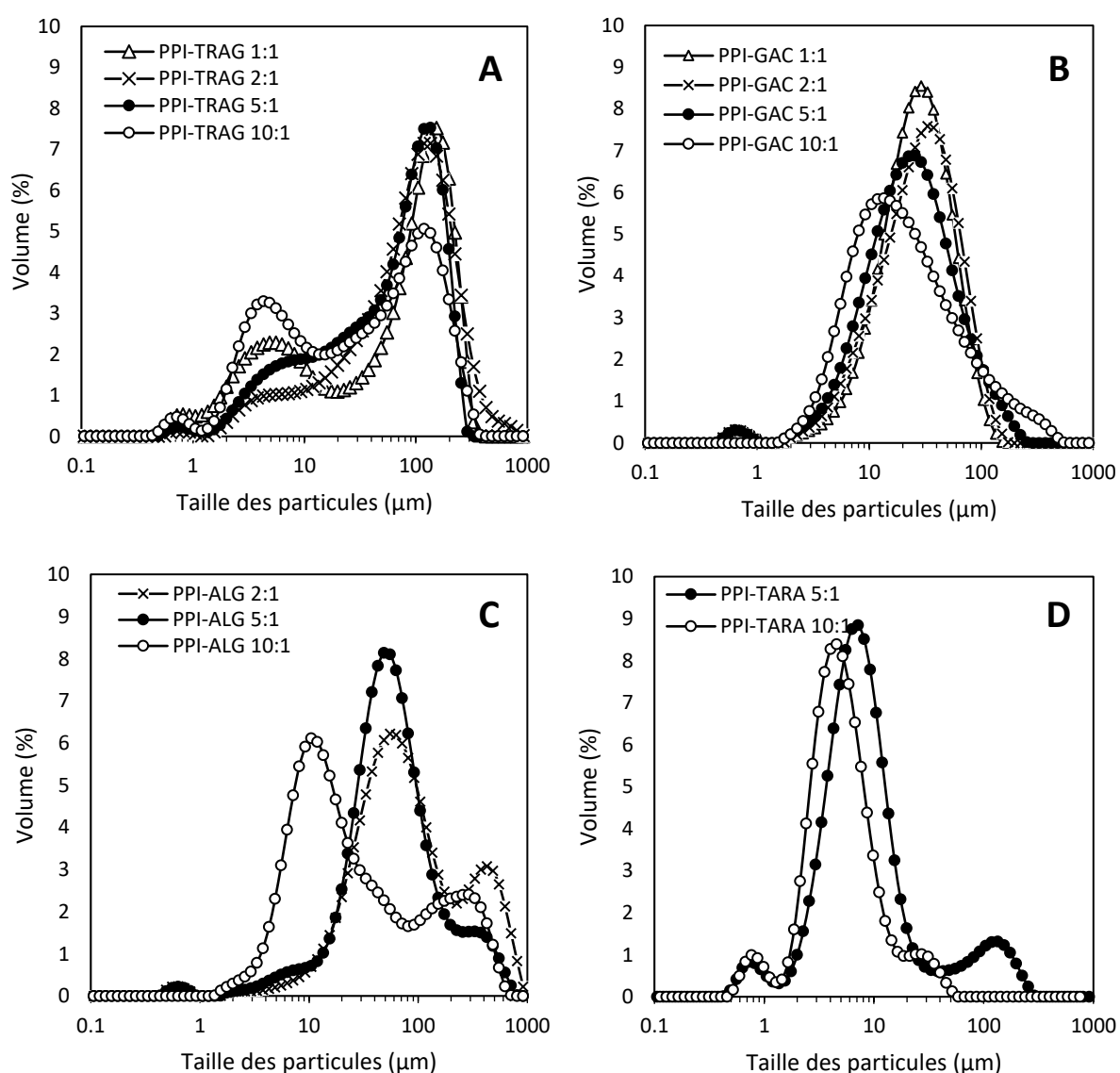


Figure 38: Influence du ratio protéine/polysaccharide sur la distribution de taille des particules en suspension de PPI-TRAG (A), PPI-GAC (B), PPI-ALG (C) et PPI-TARA (D) encapsulant l'α-tocophérol.

Dans les travaux d'Akil, étudiant l'interaction entre la β -lactoglobuline et la gomme arabique, il a été constaté que le diamètre des particules n'était pas affecté par le ratio protéine/polysaccharide à pH optimal de formation des coacervats complexes (Akil, 2007). Selon leur étude, la taille des particules est davantage affectée par le phénomène d'agrégation des protéines, qui augmente avec le ratio protéines/polysaccharide pour une même valeur de pH. Toutefois, d'après les résultats obtenus dans cette étude, il semble que le phénomène inverse soit obtenu.

Tableau 12: Distribution granulométrique des différentes émulsions PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PI-TARA aux différents ratios après coacervation complexe. Les résultats décrivent la taille des différents pics de la distribution (en μm) ainsi que la proportion de chaque fraction/pic.

Couple protéine / polysaccharide	Ratio	Pic 1	Pic 2	Pic 3
PPI-TRAG	1:1	0,8 μm 2%	5,5 μm 30%	153 μm 68%
	2:1	0,8 μm 0,5%	3,8 μm 4,5%	118 μm 95%
	5:1	0,7 μm 1%	1,8 μm 16%	135 μm 83%
	10:1	0,7 μm 18%	4,4 μm 35%	119 μm 47%
PPI-GAC	1:1	0,7 μm 1%	29,1 μm 99%	
	2:1	0,6 μm 1%	34,8 μm 99%	
	5:1	0,6 μm 1%	24,3 μm 99%	
	10:1		13,1 μm 100%	
PPI-ALG	2:1	0,6 μm 0,8%	55,2 μm 77,2%	426 μm 22%
	5:1	0,6 μm 0,7%	48,6 μm 91,3%	330 μm 8%
	10:1	10,8 μm 75%	277 μm 25%	
PPI-TARA	5:1	0,748 μm 3,5%	6,91 μm 85%	139 μm 11,5%
	10:1	0,7 μm 0,3%	4,2 μm 94,7%	24,3 μm 5%

En présence de gomme adragante, une distribution bimodale est constatée quel que soit le ratio (**Figure 38A**). La principale population de particule se situe entre 40 et 200 μm . La seconde population plus faible se trouve entre 1 et 20 μm . Tout comme dans le cas de la

gomme arabique, il semble que plus la proportion en polysaccharide diminue dans le mélange, plus le diamètre du pic majoritaire diminue (**Tableau 12**).

La même observation a été faite pour l'alginate de sodium et la gomme tara (**Figure 38C et D**). Ainsi, la présence du polysaccharide affecte la qualité de l'émulsion en augmentant la distribution de la taille de particules.

Points-clés :

- Diminution de la taille de l'émulsion avec homogénéisation à haute pression
- Formation de coacervats complexes augmente la distribution de taille des particules en suspension
- Distribution de taille dépendante de la nature des polysaccharides
- Gomme arabique permet de former une suspension de particules plus fine que la gomme adragante et l'alginate de sodium
- Pas d'impact de la présence de gomme tara (polysaccharide non-ionique) sur la distribution de taille des particules en suspension
- Influence du ratio protéine/polysaccharide sur la distribution de taille des particules en suspension
- Plus le ratio augmente, plus le diamètre de particules diminue

3.2. Etude de la viscosité au cours du procédé de coacervation complexe permettant l'encapsulation d'une phase lipidique

La viscosité du mélange protéines-polysaccharides est influencée par la nature du polysaccharide (poids moléculaire, ramification, rigidité des chaînes, composition osidique), les concentrations ou encore par la structure des complexes protéines-polysaccharides ([Bai et al., 2017](#)). Des chercheurs ont pu mettre en évidence l'augmentation de la viscosité apparente avec la formation de coacervats complexes protéines-polysaccharides ([Azarikia and Abbasi, 2016](#)). Réciproquement, des résultats inverses ont rapporté que la viscosité apparente d'un mélange protéine-polysaccharide (caséinate – gomme xanthane) diminue en raison des

interactions électrostatiques (Liu et al., 2012). La viscosité apparente des solutions de coacervats complexes a été étudiée pour les différents couples PPI-GAC, PPI-TRAG, PPI-ALG, PPI-TARA. Les résultats de viscosité apparente des solutions à 25°C et à un taux de cisaillement de 0,34 s⁻¹ sont présentés dans le tableau suivant (**Tableau 13**).

Tableau 13: Viscosité apparente des couples PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PPI TARA à 25°C à un cisaillement de 0.34 s⁻¹ (1 rpm).

Couple protéine / polysaccharide	PPI	PPI-TRAG				PPI-GAC				PPI-ALG			PPI-TARA	
Ratio	-	1:1	2:1	5:1	10:1	1:1	2:1	5:1	10:1	2:1	5:1	10:1	5:1	10:1
pH final	6,8	3	3,2	3,8	4,2	3	3,5	4,2	4,4	2,2	3,2	3,8	4,5	4,5
Viscosité apparente, mPa.s	421	7560	6540	2154	1926	965	861	765	363	723	678	543	5970	5430

Dans tous les mélanges testés, la viscosité apparente diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement, mettant en évidence un comportement pseudo plastique (Vargas et al., 2021) (**Figure 39**). Ce phénomène est expliqué par la rupture du réseau entourant les particules ou des liaisons faibles entre les molécules, ou au réarrangement de la structure des complexes solubles soumis à un cisaillement (Liu et al., 2017). Dans le cas du mélange PPI-TRAG, il semble que la viscosité apparente du couple soit pH-dépendante. La **Figure 39** présente la viscosité apparente du couple PPI-TRAG au ratio 5 :1. Une viscosité apparente importante est observée à pH 7, indiquant la présence de charges négatives fortes induisant des répulsions électrostatiques entre les complexes et un gonflement des complexes pouvant conduire à l'augmentation de la résistance au cisaillement. La diminution du pH à 4,4 entraîne ensuite la protonation des charges négatives des biopolymères, et notamment des groupements acides carboxyliques, conduisant à une diminution de ces phénomènes de répulsion et donc une réduction de la viscosité apparente. La gomme adragante devient également plus flexible, facilitant la réduction de la viscosité (Azarikia and Abbasi, 2016). Les travaux de ces mêmes auteurs ont montré une diminution importante de la viscosité pour un mélange protéines de lait-gomme adragante au pH optimal de formation des coacervats complexes (pH 3, avec un potentiel zêta nul) par rapport au pH correspondant à la formation de complexes solubles (pH 5).

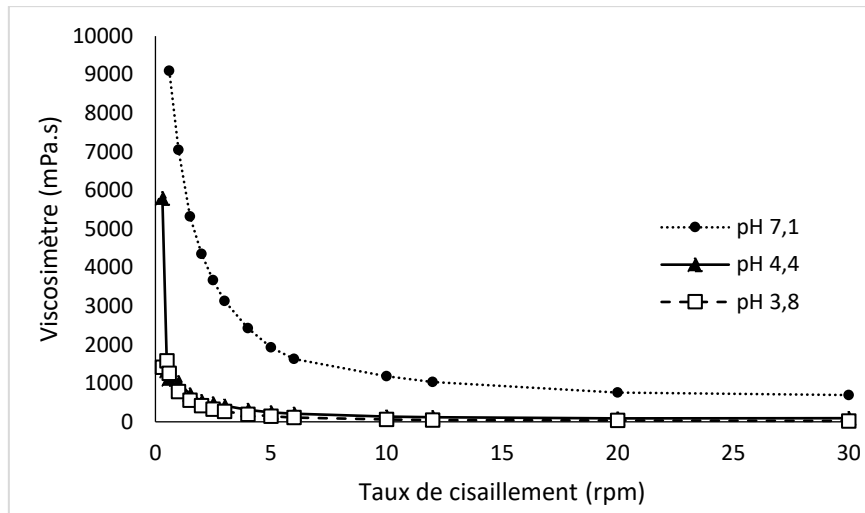


Figure 39: Influence de l'acidification du milieu dans le mélange PPI-TRAG 5:1.

La viscosité du mélange dépend de la nature du polysaccharide utilisé. Les coacervats complexes à partir de gomme arabique et d'alginate permettent d'obtenir des suspensions avec la plus faible viscosité (la plus faible étant obtenue pour le couple PPI-GAC au ratio 10 :1). En présence de gomme adragante ou de gomme tara, la viscosité est plus importante. Ces deux gommes sont notamment décrites pour leurs propriétés stabilisantes.

Dans les différents mélanges protéines - polysaccharides, la viscosité apparente diminue en augmentant le ratio protéines-polysaccharides. Ainsi, dans le cas du complexe PPI-TRAG, la viscosité apparente est plus importante au ratio 1 :1 que 5 :1 (7560 mPa.s et 2154 mPa.s respectivement). Cette viscosité plus élevée peut être expliquée par l'augmentation de la concentration en polysaccharides, conduisant à des interactions inter- et intramoléculaires plus importantes, ainsi qu'une augmentation de l'enchevêtrement des chaînes polysaccharidiques (Azarikia and Abbasi, 2016). L'observation est identique en présence de gomme tara, d'alginate ou de gomme arabique.

Points-clés :

- Influence du ratio protéines/polysaccharides sur la viscosité de la solution avant séchage par atomisation
- L'augmentation du ratio protéines-polysaccharides permet de diminuer la viscosité des solutions
- Gomme adragante et gomme tara forment des solutions plus visqueuses pouvant affecter les propriétés fonctionnelles des microsphères séchées

3.3. Caractéristiques des microsphères

Les suspensions précédemment présentées sont séchées par atomisation dans une tour d'atomisation pilote. La température de séchage, ou température d'air chaud à l'entrée de la chambre d'atomisation, est fixée à 140°C. Il peut être considéré que dans le cas de solutions aqueuses, la température choisie est suffisante pour permettre une évaporation de l'eau par entraînement en présence d'un grand volume d'air et produire ainsi des microsphères. Le choix d'une température relativement basse se justifie par la nécessité d'éviter la dénaturation des protéines végétales et la dégradation de la matière active sensible utilisée. Au cours de l'évaporation, le débit de pulvérisation de la solution à sécher est également ajusté pour garantir une température suffisamment basse, de l'ordre de 50-60°C, limitant la dénaturation thermique des composés au cours du procédé.

L'influence du polysaccharide et du ratio protéines /polysaccharides utilisé sur différents paramètres comme le taux d'humidité, le diamètre moyen de particules, le rendement d'atomisation et l'efficacité d'encapsulation ont été étudiés.

Le rendement d'atomisation se définit comme le rapport de la quantité de matière sèche obtenue après atomisation sur la quantité de matière sèche engagée dans l'atomisation.

Tableau 14: Caractéristiques des microsphères d'α-tocophérol préparées.

	Ratio	pH	D(V ; 0,5) émulsion (μm)	Viscosité (mPa.s) (0,34 s ⁻¹)	%EE	%HR	D(V ; 0,1) poudre (μm)	D(V ; 0,5) poudre (μm)	D(V ; 0,9) poudre (μm)	%RA
PPI	-	6,8	5,75	421	53,4 ± 3,4	3,6 ± 0,1	4,4	11,5 ± 1,3	22,9	86
PPI-GAC	1 :1	3,0	32,1	965	77,4 ± 0,9	3,2 ± 0,3	7,5	15,5 ± 0,7	46,5	85
	2 :1	3,5	35,8	861	54,1 ± 2,9	3,9 ± 0,2	7,0	15,2 ± 0,3	45	59
	5 :1	4,2	33,5	765	44,6 ± 3,7	3,4 ± 0,1	6,7	15,6 ± 1,3	73,3	77
	10 :1	4,4	26,4	363	42,7 ± 1,0	3,2 ± 0,4	7,1	16,6 ± 0,3	109	57
PPI-TRAG	1 :1	3,0	196	7560	54,1 ± 7,3	4,2 ± 0,4	12,4	78,3 ± 6,7	535	71
	2 :1	3,2	111	6540	71,2 ± 4,5	3,3 ± 0,1	11,5	57,5 ± 4,6	334	59
	5 :1	3,8	92,5	2154	52,1 ± 2,7	4,2 ± 0,2	10,8	14,6 ± 5,6	34	43
	10 :1	4,2	48,1	1926	61,2 ± 1,9	3,3 ± 0,0	6,7	24,4 ± 1,8	130	55
PPI-ALG	2 :1	2,2	162	723	34,2 ± 0,3	4,6 ± 0,2	8,6	18,2 ± 7,2	186	75
	5 :1	3,2	90,8	678	26,8 ± 8,3	4,1 ± 0,2	8,4	20,5 ± 0,8	120	78
	10 :1	3,8	87,9	543	52,9 ± 2,1	3,0 ± 0,3	8,4	20,1 ± 0,2	20	79
PPI-TARA	5 :1	4,5	21	5970	48,8 ± 1,1	3,8 ± 0,1	9,5	75,9 ± 18,4	225	53
	10 :1	4,5	6,41	543	63,1 ± 2,7	3,5 ± 0,3	8,7	51,7 ± 23,1	345	53

Le taux d'humidité relative (%HR) obtenu pour les poudres atomisées est de l'ordre de 3-4% (**Tableau 14**). Les valeurs obtenues pour les différents couples protéines/polysaccharides sont similaires au taux d'humidité relative des microsphères comportant uniquement la protéine de pois. La nature du polysaccharide associé à la protéine de pois ou encore le ratio protéines/polysaccharides ne semblent pas avoir d'influence significative sur l'humidité des poudres obtenues par atomisation. Selon Botrel *et al.*, l'humidité relative de particules séchées par atomisation est principalement influencée par les variables du procédé de séchage comme la température d'air d'entrée du process (Botrel *et al.*, 2014). Les changements de composition de la paroi encapsulante n'entraînent que peu d'effets sur l'humidité de la poudre.

L'analyse de la taille des particules séchées par atomisation met en évidence des particules à une échelle micrométrique avec un diamètre D (V ; 0,5) variant entre 10 et 80 μm dans les différents mélanges préparés. Le séchage d'une émulsion de protéines de pois encapsulant un actif hydrophobe permet de former des microparticules avec la taille la plus faible (10,6μm). Le résultat est en accord avec les résultats généralement trouvés dans la littérature

(Costa et al., 2015; Pereira et al., 2009). En présence de gomme arabique, la granulométrie des microparticules ne semble pas varier en fonction du ratio protéines/polysaccharides (taille moyenne de particule variant entre 15,5 et 16,6 μm pour les ratios PPI-GAC 1 :1 et 10 :1 respectivement). Tout comme pour la gomme arabique, la présence d'alginate de sodium ne semble pas influencer la taille des particules (particules variant de 18,2 à 20,1 μm pour des ratios 2 :1 et 10 :1 respectivement). En association avec la gomme adragante, il semble que le diamètre moyen diminue lorsque le ratio protéine/polysaccharide augmente. Cela peut s'expliquer par l'augmentation de la viscosité avec l'augmentation de la proportion en polysaccharides. Les travaux de Xie ont montré que la diminution de la viscosité des préparations atomisées permet de réduire la taille des microparticules (Xie et al., 2010). La valeur de $D(V;0,9)$ augmente également avec l'augmentation de la proportion en polysaccharides. Le diamètre important observé pour cette valeur de $D(V;0,9)$ observée notamment pour le rapport 1 :1 (535 μm) s'explique par une agglomération des particules au cours du séchage par atomisation et est liée principalement à la viscosité importante de la solution séchée. Dans le cas de la gomme tara, une faible diminution de la taille des particules est observée avec l'augmentation du ratio protéines/polysaccharides. Cela peut également être lié à la viscosité des solutions préparées. Tout comme pour la gomme adragante, la valeur de $D(V;0,9)$ observée notamment pour les rapports 5 :1 et 10 :1 (225 et 345 μm respectivement) s'explique par une agglomération des particules au cours du séchage par atomisation et est liée principalement à la viscosité importante de la solution séchée.

L'efficacité d'encapsulation (%EE) des microcapsules est affectée par la capacité de la matière encapsulante à former une couche continue autour des gouttes d'huile, réduisant les phénomènes de coalescence (Bajaj et al., 2017). Les résultats, rassemblés dans le **Tableau 14**, décrivent l'efficacité d'encapsulation de microcapsules avec une charge théorique de 25% d'actif hydrophobe. La mesure de l'efficacité d'encapsulation est déterminée par le dosage de l'actif libéré dans la phase chloroformique, donc de l'actif non encapsulé.

L'efficacité d'encapsulation de la protéine de pois est équivalente à 53,4%. Des tendances différentes sont observées en fonction de la nature du polysaccharide. Dans le cas de l'interaction PPI-GAC, une augmentation de l'efficacité d'encapsulation est observée avec la diminution du ratio protéine/polysaccharide (77,4% au ratio PPI-GAC 1 :1 contre 42,7% au ratio 10 :1). Cette observation n'a pas été constatée dans les cas des autres interactions

protéines-polysaccharides. Dans le cas de la gomme adragante et la gomme tara, aucune tendance n'est constatée en fonction du ratio. Enfin, dans le cas du mélange PPI-ALG, le phénomène inverse est observé. Il est observé une augmentation de l'efficacité d'encapsulation avec l'augmentation du ratio protéine-polysaccharide (34,2% au ratio PPI-ALG 2 :1 contre 52,9% au ratio 10 :1). Ce phénomène peut s'expliquer directement par la présence d'une paroi observée en présence d'alginate comme décrit dans le chapitre suivant (chapitre 3.4).

Le rendement d'atomisation (%RA) des microcapsules, présenté dans le **Tableau 14**, varie de 53 à 85% entre les différents mélanges. Il ne semble pas y avoir de tendance sur le rendement d'atomisation entre les différents ratios d'un même mélange. Les rendements d'atomisation obtenus peuvent être associés à la présence de poudres adhérant dans la tour au cours du procédé ou encore à la perte de fines particules au travers des filtres de la tour d'atomisation. Dans le cas de la gomme adragante et la gomme tara, les rendements d'atomisation semblent plus faibles. Dans le cas de la gomme tara, le rendement n'excède pas 53%. Selon les travaux de Nesterenko, cette diminution du rendement d'atomisation est associée à la viscosité des émulsions, relation moins évidente dans le cadre de nos essais ([A. Nesterenko, 2012](#)).

Points-clés :

- Humidité relative indépendante de la formulation utilisée
- Distribution de taille des microsphères :
 - Gomme arabique et alginate : pas de variation de taille des microsphères en fonction du ratio protéines/polysaccharides
 - Gomme adragante et gomme tara : augmentation de la taille des microsphères en diminuant le rapport protéines/ polysaccharides
 - Lien avec la viscosité des solutions à sécher par atomisation
- Efficacité d'encapsulation :
 - Dépendante de la nature du polysaccharide
 - Amélioration de l'efficacité d'encapsulation avec l'augmentation de la quantité en gomme arabique
 - Diminue de l'efficacité d'encapsulation en présence d'alginate
 - Pas d'influence du rapport protéines/polysaccharides dans le cas de PPI-TRAG et PPI-TARA
- Rendement d'atomisation :
 - Pas d'influence du rapport protéines/polysaccharides
 - Diminution du rendement d'atomisation lié à la perte de particules dans la chambre d'atomisation ou au travers des filtres de la tour

3.4. Analyse morphologique

L'observation de microparticules par microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'étudier la morphologie des microparticules, leurs caractéristiques de surface et leur structure interne. Le mode environnemental et la méthode utilisée au cours de cette étude sont non-destructifs pour l'échantillon et permettent d'observer la surface de particules non

soumises à un enrobage métallique. Les paramètres utilisés sont issus d'une étude optimisée d'observations de microparticules composées de biopolymères sensibles au haut vide, présentant les intérêts du mode environnemental et les inconvénients de l'étape de préparation d'échantillon par métallisation (Conforto et al., 2015; Joguet, 2014).

L'une des propriétés importantes de poudres sèches est leur morphologie, jouant un rôle important sur leur caractéristiques fonctionnelles et de relargage de principe actifs microencapsulés. L'analyse de la morphologie de microparticules fournit des informations sur leur structure, leur forme, et leur taille au travers d'images de hautes qualités par microscopie électronique (Arpagaus et al., 2018).

3.4.1. Analyse morphologique des microsphères séchées par atomisation

La **Figure 40** présente les observations de microsphères issues de formulations PPI seuls encapsulant l' α -tocophérol. La figure présente deux grossissements différents. La **Figure 40A**, au grossissement x600, permet de visualiser la forme des microsphères, la répartition de taille, la cohésivité entre les particules et la qualité du séchage et de l'encapsulation.

Le grossissement x8000 (**Figure 40B et C**), permet d'étudier en détail les caractéristiques d'une microsphère individuelle. Une analyse de surface d'une microsphère est présentée en **Figure 40B** et une coupe de microsphères réalisée par broyage de la particule à l'azote liquide en **Figure 40C**. Ces dernières renseignent sur la qualité de l'encapsulation de l'actif au sein de la microsphère.

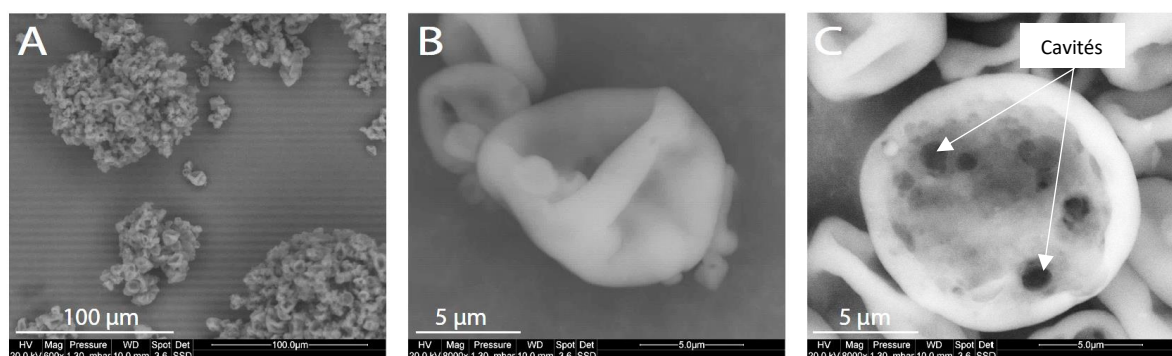


Figure 40: Observation MEB de microsphères PPI au grossissement x600 (A) et des surfaces externe (B) et interne de la microsphère (C) au grossissement x8000.

La **Figure 40A** met en évidence des particules individualisées indiquant la bonne qualité du séchage de la solution. Les observations MEB mettent en évidence des particules présentant

une granulométrie d'environ 10 μ m, correspondant aux résultats obtenus par granulométrie laser en voie sèche (10,6 μ m). Les microsphères présentent une forme sphérique dégonflée caractéristique du procédé de séchage par atomisation. Ces caractéristiques ont également été observées dans les travaux de N. Joguet pour une matrice de protéines de pois encapsulant de la vitamine A (Joguet, 2014). Le dégonflement des particules est caractérisé par la présence de concavités (**Figure 40B**). Les techniques de nébulisation, impliquant l'emploi d'une buse ou d'une turbine, favorisent la formation de gouttelettes sphériques. Lors de la phase d'atomisation, les protéines, de par leurs propriétés tensioactives, se placent à l'interface air/eau. Une enveloppe poreuse se forme après évaporation de l'eau de la particule, dans laquelle sont dispersées les gouttelettes d'actifs liposolubles.

La forme sphérique d'une particule atomisée est liée au processus de séchage et à la formulation impliquée. Au cours du séchage par atomisation, la goutte formée par le système de nébulisation subit une première étape de perte d'eau conditionnée par le transfert de masse induit par la différence de pression relative entre le flux d'air et la surface de la goutte. Ce transfert de masse rapide se produit dès la sortie du système de nébulisation. La surface de la goutte est ainsi séchée en premier lieu par ce phénomène physique dépendant de la température d'air de séchage, du débit d'air, de la fréquence de la turbine et de la tension superficielle à la surface de la goutte d'émulsion. Cette première étape conduit à la solidification rapide de la paroi de la particule, qui, selon ses propriétés, va influencer la forme de la particule. Dans le cas de la protéine de pois, il semble que cette paroi soit perméable à la vapeur d'eau (**Figure 43**).

La seconde étape de séchage est directement dépendante de la température d'air de séchage. La goutte se réchauffe de la surface vers l'intérieur par l'intermédiaire d'un gradient de température. Lorsque la température d'air de chauffage est supérieure à la température d'ébullition du solvant de l'émulsion, il y a formation de vapeur à l'intérieur de la goutte et vaporisation de celle-ci vers l'extérieur de la particule au travers du film formé à la surface. Cette vaporisation conduit à la formation d'une cavité interne principale au centre de la particule et de petites cavités périphériques (Teixeira et al., 2004) (**Figure 40C**)(**Figure 43**). Selon la littérature, ces cavités et notamment les cavités périphériques, peuvent correspondre à l'emplacement de l'actif hydrophobe piégé dans la matrice hydrophile (Gharsallaoui et al., 2010). L'auteur a également mis en évidence la présence de bulles d'air piégées au centre de

la matrice pour des microcapsules protéines de pois-pectine. Une étude de coacervation complexe lysozyme/pectine séchée par atomisation a mis également en évidence une structure interne similaire avec une coque externe et une bulle d'air centrale, causée par l'expansion de bulles d'air emprisonnées à l'intérieur de la gouttelette (Ben Amara et al., 2016). Ces petites cavités peuvent également être dues à l'incorporation d'air au cours des phases d'agitation/homogénéisation. Enfin, la déperdition de vapeur d'eau à l'issue de la seconde étape de séchage entraîne une contraction de la microsphère, déformant le film à sa surface et formant des concavités caractéristiques du processus impliqué (Alamilla-Beltrán et al., 2005; Dolinsky, 2001).

Globalement, la topographie à la surface des particules de protéines de pois encapsulant l' α -tocophérol met en évidence une surface lisse et l'absence de fissures ou de pores, assurant la protection de l' α -tocophérol (**Figure 40B**). D'après les travaux d'Oliveira et al., la surface externe de la particule ne présentant pas de fissures ou de ruptures favorise une faible perméabilité aux gaz, une rétention et une protection d'actif plus importante (Oliveira et al., 2007).

3.4.2. Etude de l'influence de la nature du polysaccharide et du ratio protéine - polysaccharide sur la morphologie des microsphères

Les observations au MEB des différentes formulations produites à partir de protéines de pois et d'alginate, de gomme arabique, de gomme adragante ou encore de gomme tara encapsulant l' α -tocophérol sont rassemblées dans la **Figure 41**. Cette dernière figure présente la morphologie externe des particules à un grossissement x2500. L'objectif de cette étude est d'identifier les variations possibles de taille ou de morphologie des différentes formulations en fonction de la nature du polysaccharide associé à la protéine de pois ou encore le ratio protéines-polysaccharides utilisé.

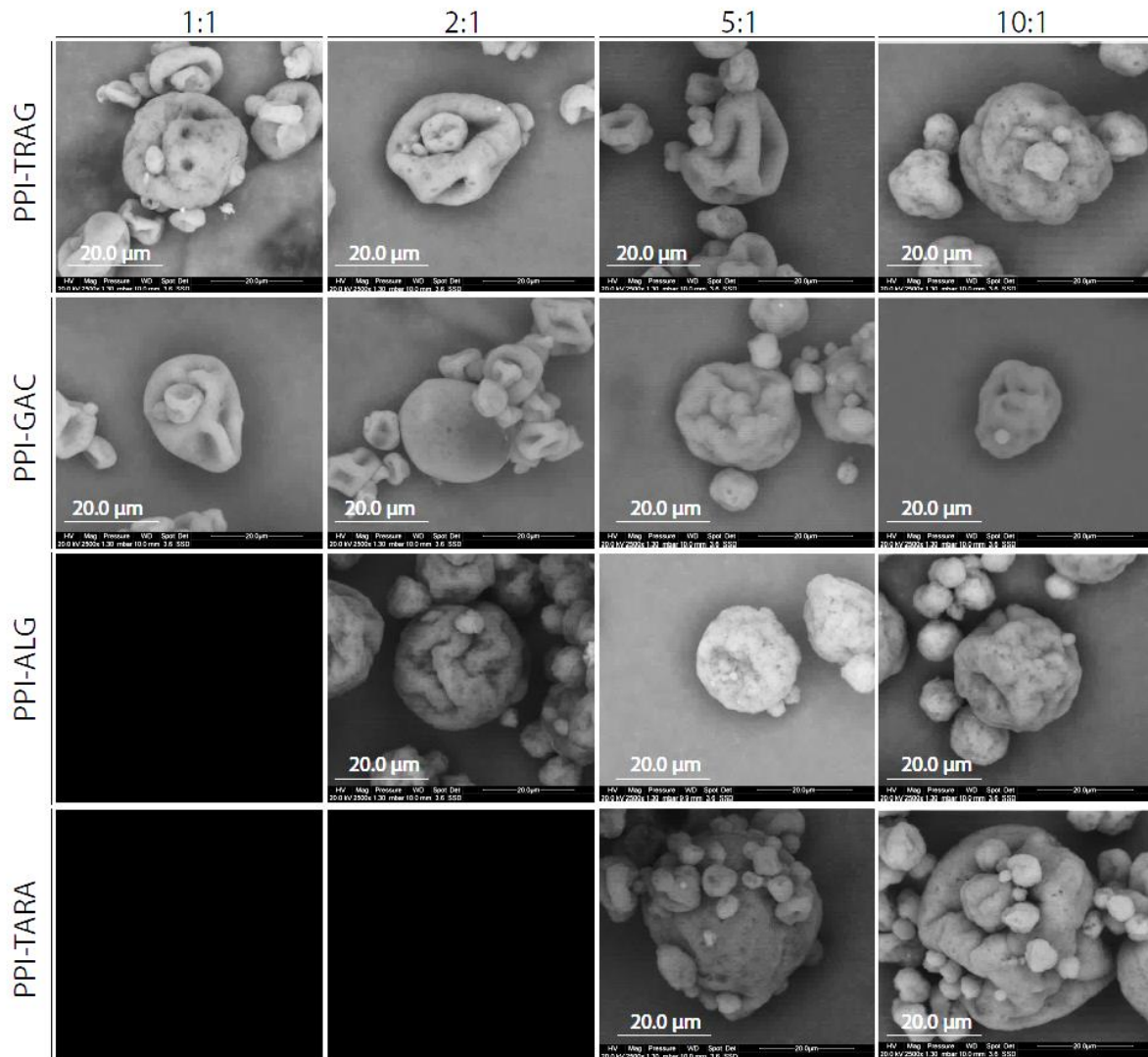


Figure 41: Observation MEB des différentes formulations de microsphères PPI-GAC, PPI-TRAG, PPI-ALG et PPI-TARA aux différents ratios 1 :1, 2 :1, 5 :1 et 10 :1 au grossissement x2500.

Les particules observées présentent globalement une forme sphérique dégonflée, encore une fois typique du séchage par atomisation. La surface externe se caractérise par une paroi continue ne présentant pas de ruptures ou de fissures, influençant la perméabilité aux gaz et la perte de composés volatils. Les microcapsules obtenues par séchage par atomisation sont essentiellement sphériques mais des variations morphologiques peuvent être observées en fonction de la nature du vecteur utilisée (Walton and Mumford, 1999).

Les microparticules de PPI-GAC semblent présenter une variation de morphologie de surface en fonction du ratio protéines-polysaccharides. Ainsi, il semble que plus le ratio protéines-polysaccharide est faible, plus les particules semblent lisses par comparaison des particules de PPI-GAC 1 :1 et 5 :1. Ainsi l'ajout de gomme arabique semble faciliter l'obtention d'une

paroi continue et lisse, pouvant affecter les propriétés de relargage de la microparticule (Jun-xia et al., 2011). L'augmentation de la rugosité à la surface de la particule en augmentant le ratio protéines-polysaccharides serait dès lors associé à la protéine. Selon l'étude de l'encapsulation d'une huile de thon par des coacervats complexes protéines de lait-gomme arabique, les concavités sont liées principalement à la présence des protéines au sein de la paroi des particules séchées par atomisation (Eratte et al., 2015). Une autre étude présentant l'encapsulation d'oméga 3 par des coacervats complexes protéines de soja/gomme arabique présente des microcapsules à la morphologie similaire : des particules sphériques lisses avec des concavités similaires (de Conto et al., 2013). L'auteur décrit également qu'en fonction du ratio de protéines végétales, les particules perdent de leur homogénéité, avec notamment la présence de parties manquantes de capsules et de fissures pouvant résulter d'une mauvaise interaction entre les biopolymères (de Conto et al., 2013; Jun-xia et al., 2011).

Les microparticules PPI-TRAG ne semblent, quant à elles, pas présenter de différences de morphologie de surface quel que soit le ratio protéines-polysaccharides. Un aspect lisse est observé avec quelques rugosités de surface sur les différentes particules présentées. Dans une étude traitant de la microencapsulation de β -carotène par des coacervats complexes caséine-gomme adragante, des résultats similaires ont été observés avec des particules sphériques lisses, sans fissures. Les particules ont été réticulées en présence de génipine (Jain et al., 2016). Cette phase finale de réticulation améliore les propriétés de surface des particules. Ces dernières présentent un réseau polymérique plus rigide, sans pores à la surface. L'auteur suggère que le couple réticulé permet une bonne intégrité des microcapsules.

Les microparticules de PPI-ALG présentent une variation de morphologie plus marquée par rapport aux gommages précédemment observées. En effet, l'observation de la surface externe des particules met en évidence une surface plus rugueuse qu'en présence de gomme arabique ou gomme adragante. Cette différence de morphologie impliquerait certainement une différence de réponse sur les propriétés de relargage de l'actif encapsulé. Les micrographies présentées pour l'encapsulation de *Lactobacillus casei* par un complexe soluble protéines de soja – alginate présentent une surface rugueuse similaire à celle observée au cours de notre étude (Hadzieva et al., 2017). L'auteur y décrit des particules sphériques avec une surface ridée et une faible porosité.

Enfin, les microparticules PPI-TARA présentent une morphologie sphérique avec des concavités, tout comme pour les autres mélanges, et une faible rugosité. Le ratio ne semble pas affecter l'aspect de surface des microparticules.

Des tâches sombres peuvent être également observées sur la plupart des particules. Ces tâches, révélées par contraste chimique par le détecteur d'électrons rétrodiffusés, s'expliquent par une différence de composition chimique de type organique/inorganique entre deux zones de la particule. Ainsi, ce contraste chimique peut mettre en évidence une hétérogénéité de composition de la matrice, liée à la présence de cavités d'air ou d'actif non encapsulé (huile végétale ou α -tocophérol). En présence de cavités à la surface de particules, ces dernières apparaissent plus sombres que les zones plus denses. L'incorporation de bulles d'air au sein de la suspension est dépendante du mode d'agitation utilisé au cours du procédé et de la viscosité de la solution. Ainsi, une suspension présentant une viscosité importante ne permettra qu'un faible dégazage de la solution au cours de l'homogénéisation de la solution.

3.4.3. Analyse de surface des microsphères

Une analyse plus précise de la surface des microparticules a pu être réalisée en adaptant les conditions d'analyse au microscope électronique à balayage, en diminuant notamment la puissance du faisceau d'électrons de 20kV à 11kV. A cette tension, seul le capteur SE (électrons secondaires) est disponible. Les analyses de surface ont été réalisées sur le ratio 5 :1 des couples PPI-TRAG, PPI-GAC, PPI-ALG et PPI-TARA (**Figure 42**).

Les particules de protéines de pois seules encapsulant l' α -tocophérol se caractérisent par une surface rugueuse. Le plus fort grossissement met en évidence l'absence de pores mais une présence importante de petites concavités, assimilant la surface de la particule à une surface « ridée ».

L'analyse de la surface des microparticules de PPI-TRAG met en évidence la présence d'une surface lisse ne contenant pas de pores comme décrit dans les premières analyses.

Pour les microparticules de PPI-GAC, la surface est également lisse comme observé précédemment avec la présence de cavités. Au plus faible grossissement, ces cavités semblent correspondre à des pores. Toutefois, une analyse au plus fort grossissement permet de valider

l'absence de pores et la présence de cavités. Ces cavités sont certainement liées à la seconde phase de séchage par atomisation, entraînant une déformation de la paroi encapsulante.

La structure particulière des microparticules de PPI-ALG peut être mise en évidence avec le grossissement intermédiaire. L'analyse à ce grossissement semble mettre en évidence une structure de particule qui soit plus proche d'une structure poreuse qu'une structure sphérique lisse. Cette morphologie peut s'expliquer par la formation de microparticules composées de précipités de coacervats complexes. La morphologie de surface des microparticules est similaire à une agrégation en couches par couches de précipités de coacervats PPI-ALG. Cette structure particulière a un impact sur le profil de libération de l'actif encapsulé par la matrice PPI-ALG. Selon Jun-Xia *et al.*, ces irrégularités requièrent des études plus approfondies de l'interaction entre les deux biopolymères (Jun-xia et al., 2011).

Enfin pour le couple PPI-TARA, la morphologie des particules semble intermédiaire entre la surface lisse des particules de PPI-TRAG et la surface rugueuse observée pour les microparticules de protéines de pois seules. Cette structure intermédiaire, plus lisse que les protéines de pois, est liée à la présence de la gomme tara qui permet de faciliter le lissage des particules de par les propriétés plastifiantes du polysaccharide. Ce phénomène a notamment été mis en évidence en présence de maltodextrine (Jun-xia et al., 2011).

Points-clés :

- Les microsphères présentent une morphologie sphérique et lisse, typique du procédé de séchage par atomisation
- Structure interne des particules de protéines de pois présentent de nombreuses cavités internes
- En présence de gomme arabique et gomme adragante : microsphères lisses sans pores à la surface garantissant la protection de l'actif encapsulé
- La formulation PPI-TARA présente une surface lisse sans pore
- Les microsphères de coacervats complexes protéines de pois – alginate présentent une surface de particule hétérogène poreuse pouvant affecter les propriétés de relargage de l'actif

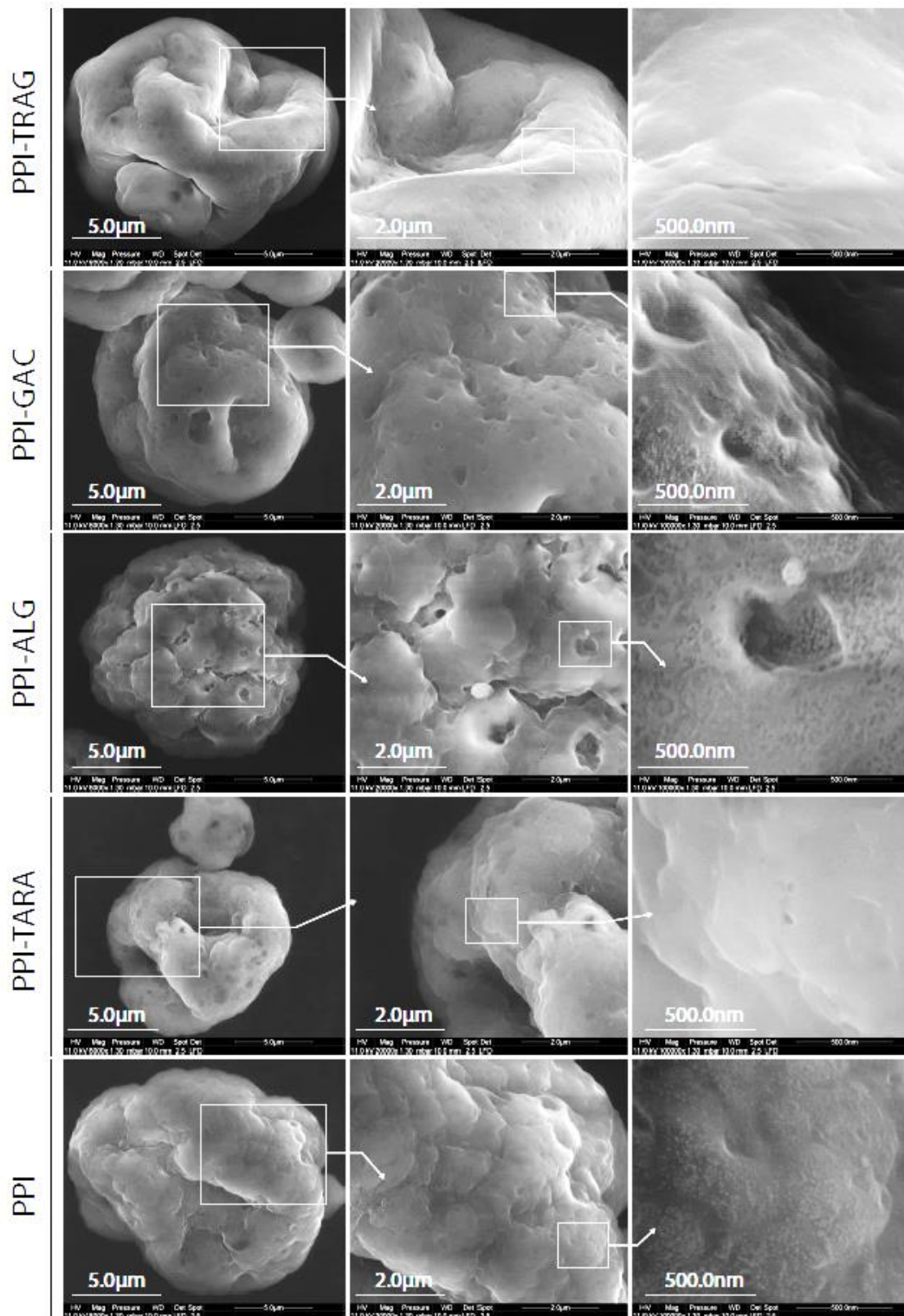


Figure 42: Observation MEB des différentes formulations de microsphères PPI, PPI-GAC, PPI-TRAG, PPI-ALG et PPI-TARA au ratio 5 :1 aux grossissements x8 000, x20 000 et x100 000.

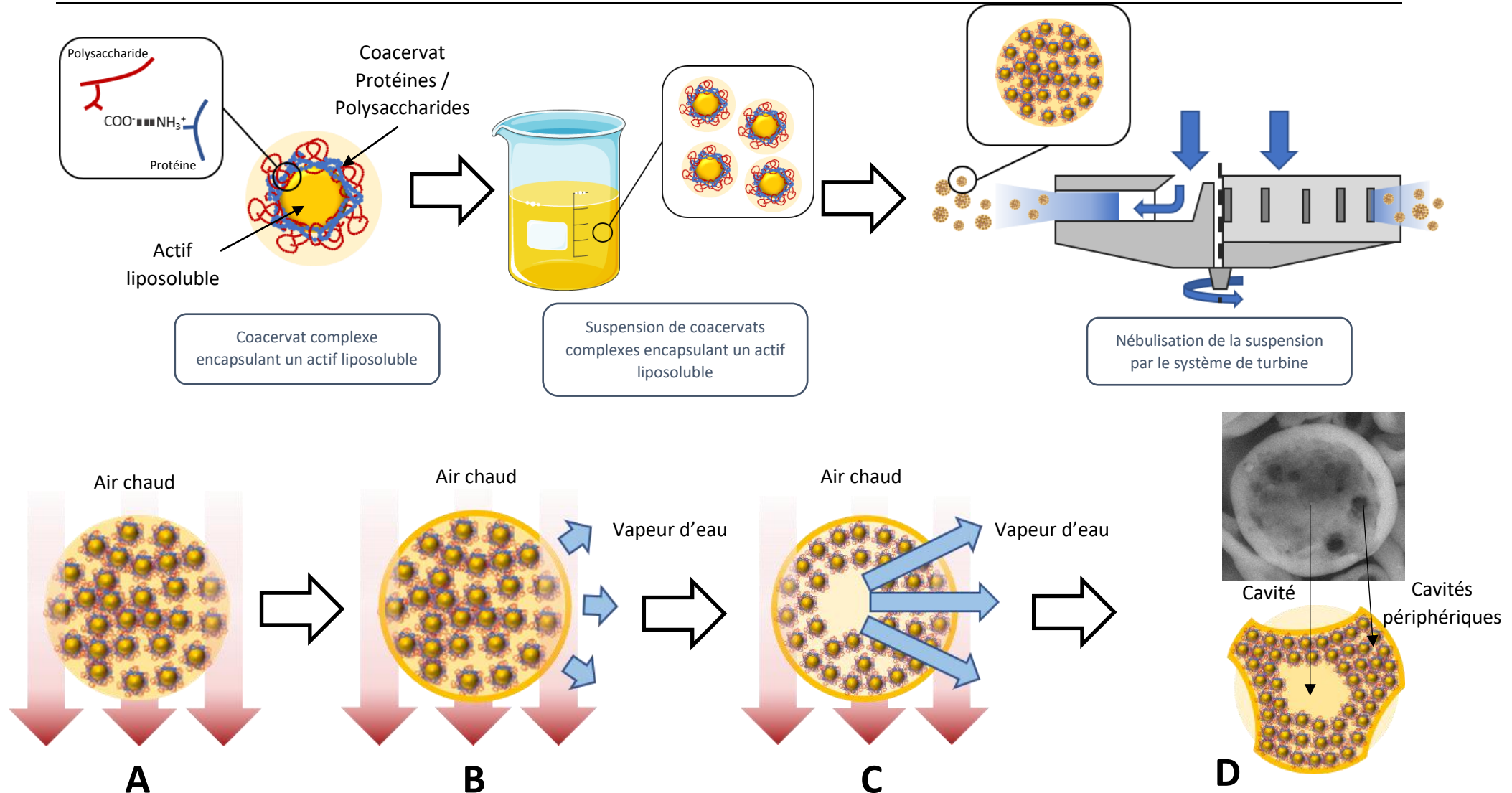


Figure 43: Figure bilan de séchage par atomisation des formulations de coacervats complexes et influence des différents paramètres sur la forme de la particule finale (adaptation du schéma développé par N. Joguet, 2014). En A : la goutte atomisée est soumise aux facteurs physiques (vitesse d'air) et thermiques ($T^\circ\text{C}$ de l'air d'entrée). En B : 1^{ère} étape de séchage, les facteurs physiques induisent un transfert d'eau par modification de la tension superficielle à la surface de la goutte, ce qui a pour conséquence le séchage d'un film à la surface. En C : 2^{nde} étape de séchage, la goutte se réchauffe de l'extérieur vers l'intérieur par transfert thermique et l'eau se vaporise, créant ainsi une cavité centrale. En D : la particule finale voit son film de surface se contracter de par la perte d'eau.

3.5. Etude de la stabilité des microsphères et de la libération de l' α -tocophérol en milieu aqueux en fonction du pH

Le principe actif encapsulé peut être libéré des microsphères par dégradation instantanée ou progressive de l'encapsulant. La libération de ce dernier peut être provoquée par un changement des paramètres physico-chimiques du milieu (température, mise en contact avec un solvant, un changement de pH) ou par une action mécanique.

Dans ces travaux, une étude de libération de l' α -tocophérol encapsulé par les différents couples protéines-polysaccharides a été réalisée dans des milieux aqueux à pH 6.8 et 2.0 pour comparer les profils de libération du principe actif en fonction du pH du milieu. Pour rappel, les microsphères produites au cours de cette étude permettent l'encapsulation d'un actif modèle lipophile composé d'huile de tournesol et d' α -tocophérol. L' α -tocophérol joue ici le rôle de marqueur de suivi de libération d'un actif lipophile. Les cinétiques de libération réalisées de l' α -tocophérol encapsulé par les couples PPI-GAC, PPI-TRAG, PPI-ALG et PPI-TARA sont présentées dans les figures suivantes aux différents ratios (1 :1, 2 :1, 5 :1, 10 :1) dans les milieux à pH 6,8 et 2,0.

La **Figure 44** présente les deux profils de relargage de l' α -tocophérol en milieu neutre (pH 6,8) (**Figure 44A**) et milieu acide (pH 2,0) (**Figure 44B**) en présence de PPI ou du coacervat complexe PPI-GAC aux différents ratios 1 :1, 2 :1, 5 :1 et 10 :1. Le pourcentage d' α -tocophérol relargué est exprimé par rapport au taux d' α -tocophérol encapsulé dans les formulations de microsphère.

Pour les microsphères de PPI seules, un relargage similaire a été observé quel que soit le pH (pH 6,8 ou 2,0). A 120 minutes, le relargage est respectivement équivalent à 37% et 41% à pH 6,8 et 2,0. La légère variation peut être liée à la différence de solubilité de la protéine de pois entre pH 2,0 et pH 6,8. Les travaux de Djoullah ont également mis en évidence une faible libération de l'actif encapsulé (riboflavine) au sein d'un gel de protéines de pois dans des milieux de digestion sans enzymes (libération inférieure à 10% pour des protéines de pois réticulées) (Djoullah and Saurel, 2021).

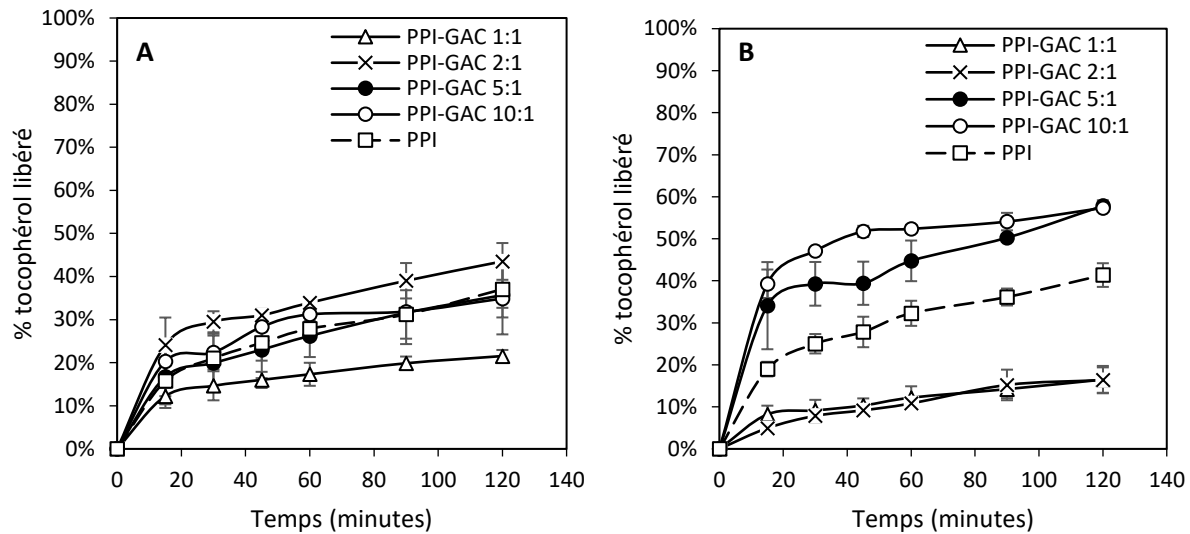


Figure 44: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-GAC sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).

Dans les deux milieux, la cinétique de libération peut être associée à un procédé biphasique en deux étapes, avec une première étape de libération rapide (ou « *burst effect* ») suivie d'une seconde étape de libération plus faible (Luo et al., 2011). Les mécanismes de libération de principes actifs au travers de matrices polymériques sont généralement basés sur deux phénomènes : la dégradation (dissolution ou érosion) de l'encapsulant et la diffusion du principe actif au travers du support. D'autres phénomènes doivent également être pris en compte tel que le gonflement (*swelling*), la transition vitreuse, la dégradation chimique, l'effet osmotique ou encore les réactions (Peppas and Narasimhan, 2014). Dans le cas de cette étude de cinétique de libération, seul le pH est ajusté. Par conséquent, les phénomènes de diffusion du principe actif et de déstructuration de la matrice encapsulante en fonction du pH dominant.

En présence de gomme arabique, des profils de libération différents sont obtenus. Dans un milieu à pH 6,8, une augmentation de la libération d' α -tocophérol est observée avec l'augmentation du ratio protéine - polysaccharide, à l'exception du ratio 2 :1 (Figure 44A). Les profils de libération aux ratios 5 :1 et 10 :1 sont proches du profil de libération de PPI. Le ratio 2 :1 présente la libération la plus importante (44% de libération).

Dans un milieu à pH acide (pH 2,0), le profil de libération est également différent des microsphères à base de PPI (**Figure 44B**). Tout comme pour le milieu à pH 6,8, il peut être observé que la libération du tocophérol augmente avec l'augmentation du ratio protéines-polysaccharides, passant d'une libération à 120 minutes de 16 à 57% d' α -tocophérol pour les ratios 1 :1 et 10 :1 respectivement. Les ratios 1 :1 et 2 :1 présentent un profil de libération similaire, avec une libération inférieure à 20% à pH acide. Le *burst effect* observé jusque t=30 minutes est nettement réduit pour les deux ratios par rapport au ratio 5 :1. L'ajout de gomme arabique dans le mélange semble améliorer la protection à pH acide. Cependant, l'augmentation du ratio (supérieur à 5 :1) entraîne une augmentation de la libération de l' α -tocophérol, supérieure au profil de libération obtenu avec PPI seul.

En comparant les profils de libération dans les deux milieux, il semble que la présence de la gomme arabique permette une protection partielle (15-20%) en milieu acide et une libération à pH 6,8 pour des ratios inférieurs à 5 :1. Dans le cas du ratio 2 :1 notamment, une protection acide partielle et une libération en milieu neutre forte sont ainsi observées. La différence de relargage entre le milieu acide et le milieu neutre peut être interprétée par la fragilité des microsphères en fonction du pH. A pH 2,0, les interactions électrostatiques entre les protéines de pois et la gomme arabique sont partiellement maintenues à ce pH, les biopolymères présentant des charges opposées. Toutefois à ce pH, on s'attend à une protonation des acides carboxyliques portés par les polysaccharides. La stabilité des microsphères peut dès lors s'expliquer par la stabilisation de la matrice encapsulante de par l'absence de charges au sein du polysaccharide. En milieu neutre, le pH est supérieur au point isoélectrique de la protéine de pois. Le système est dominé par la présence d'interactions électrostatiques répulsives, du fait de la prédominance des charges négatives entre les deux biopolymères (Bastos et al., 2020). Par conséquent, une déstabilisation des complexes est provoquée entraînant une libération plus importante d' α -tocophérol. Pour un comportement pH-dépendant adapté à la protection/libération d'un principe actif hydrophobe dans un système monogastrique, il semble que le ratio PPI-GAC 2 :1 soit le plus efficace avec une libération inférieure à 20% en milieu acide et une libération plus importante en milieu neutre (49% de libération). Pour des ratios supérieurs, la présence de la gomme arabique ne permet plus la protection en milieu acide. Le phénomène inverse est observé avec une libération plus importante en milieu acide

qu'en milieu neutre (58% de libération d' α -tocophérol à pH 2,0 contre 36% à pH 6,8 au bout de 120 minutes pour un ratio 5 :1) (**Figure 49**).

Les profils de libération de PPI-TRAG aux ratios 1 :1, 2 :1, 5 :1 et 10 :1 en milieu acide et neutre sont présentés dans la **Figure 45**.

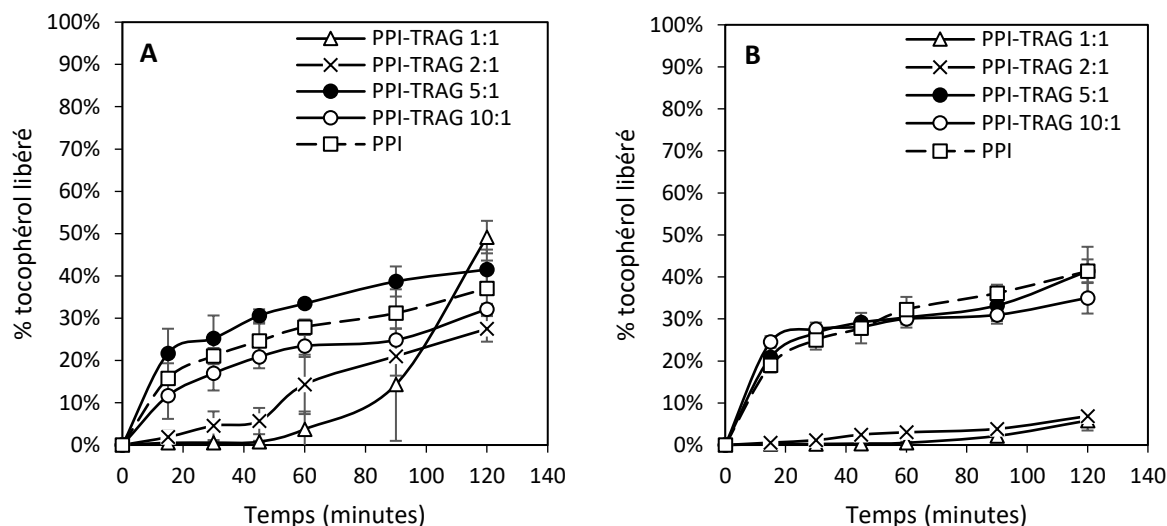


Figure 45: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-TRAG sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).

Tout comme pour la gomme arabique, la libération du tocophérol augmente à pH 6,8 avec l'augmentation du ratio protéine - polysaccharide, à l'exception du ratio 5 :1 (**Figure 45A**). Au ratio 5 :1, la libération d' α -tocophérol semble plus importante qu'en présence de PPI seul. Dans le cas des ratios 5 :1 et 10 :1, un système de relargage biphasique similaire à la protéine de pois seul est observé avec une première étape de relargage rapide et une seconde étape de libération lente. Le relargage rapide est constaté jusqu'à 60 minutes. Le phénomène a été constaté dans des travaux décrivant l'encapsulation du β -carotène par des coacervats complexes caséinate-gomme adragante (Jain et al., 2016). Dans leurs travaux, l'effet de libération rapide est associé à une libération rapide du principe actif adsorbé à la surface des microsphères ou à la perte d'intégrité de la paroi pendant le séchage des particules. La libération plus lente est associée aux mécanismes mixtes de pénétration, solubilisation et diffusion de la phase lipophile à travers la paroi polymérique caséinate-gomme adragante. Pour le ratio 1 :1 (m/m) de PPI-TRAG, il est constaté une libération retardée de l'actif dans le

temps. Une libération est observée à partir de 90 minutes pour atteindre un taux de 49% d' α -tocophérol libéré au bout de 120 minutes. Ce taux est plus important que pour les autres ratios observés. Cette libération retardée semble difficilement explicable.

A pH acide, la libération d' α -tocophérol augmente également avec le ratio protéines - polysaccharides (**Figure 45B**). Tout comme pour la gomme arabique, les ratios 1 :1 et 2 :1 présentent une faible libération à pH acide (libération inférieure à 10%). Pour des ratios supérieurs à 5 :1, le profil de libération est similaire à PPI seul avec une libération de l'actif au bout de 10 minutes. Il semble donc qu'en présence de gomme adragante, la protection en milieu acide soit améliorée. Cette étude pourrait être complétée en testant des ratios intermédiaires aux ratios 2 :1 et 5 :1 du couple PPI-TRAG.

La comparaison des profils de libération obtenus à 120 minutes dans les deux milieux met en évidence un comportement différent en fonction du ratio protéines - polysaccharides testé (**Figure 49**). Pour des ratios inférieurs à 5 :1, une libération plus importante est observée à pH 6,8 qu'à pH 2,0 (49% et 7% de libération d' α -tocophérol respectivement à pH 6,8 et 2,0 au ratio PPI-TRAG 1 :1). Il semble que le ratio 1 :1 permette d'obtenir un meilleur profil de protection/libération pour un système monogastrique avec un faible relargage à pH acide et un relargage plus important à pH 6,8. Cela s'explique principalement par le fait que la quantité en polysaccharide γ est la plus importante. La gomme adragante étant décrite dans la littérature comme stable en milieu acide, cette dernière assure la protection de l' α -tocophérol encapsulé. Pour un ratio supérieur à 5 :1, le phénomène inverse est constaté avec une libération plus importante en milieu acide qu'en milieu neutre (35% et 32% respectivement au ratio 10 :1). Pour des ratios supérieurs à 5 :1, la libération est similaire au profil de libération des microsphères PPI seules.

Les profils de libération de PPI-ALG aux ratios 1 :1, 2 :1, 5 :1 et 10 :1 en milieu acide et neutre sont présentés dans la **Figure 46**.

Dans le cas du mélange PPI-ALG, le phénomène inverse de la gomme arabique et de la gomme adragante est observé. A pH 6,8, la libération de l' α -tocophérol est équivalente à la formulation contenant les protéines de pois seules quel que soit le ratio considéré (**Figure 46A**). A pH 2,0, la libération est plus importante en présence d'alginate de sodium qu'avec les

protéines de pois seules (**Figure 46B**). Il ne semble pas y avoir d'influence entre le ratio protéines - polysaccharides et la libération du principe actif. Les propriétés de relargage du couple PPI-ALG ne sont pas celles attendues. En effet, les résultats attendus devaient suivre la même logique que PPI-GAC et PPI-TRAG, à savoir un caractère pH-dépendant avec une faible libération en milieu acide. Des études vont également dans le sens de la protection en milieu acide. L'encapsulation d'une huile essentielle de poivre noir par des coacervats complexes de β -lactoglobuline et d'alginate de sodium présente notamment un caractère gastroprotecteur avec un faible relargage en milieu gastrique et un relargage important en milieu intestinal ([Bastos et al., 2020](#)). La différence de profil de relargage observée entre le couple PPI-ALG et PPI-GAC et notamment la fragilité de la matrice PPI-ALG en milieu acide pourrait être liée à la morphologie des particules. En effet, les observations MEB précédentes ont mis en évidence la présence de nombreux pores à la surface des microsphères de PPI-ALG. Cette porosité explique la fragilité des microsphères, augmentant le relargage de l'actif en milieu acide.

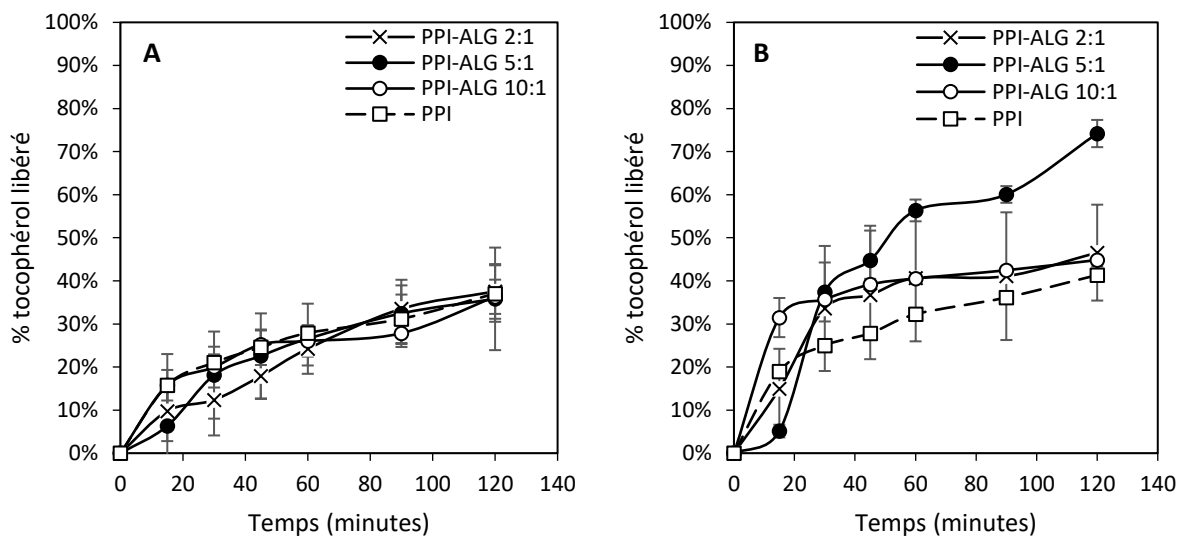


Figure 46: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-ALG sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).

La comparaison des différents ratios des mélanges PPI-ALG met en évidence un caractère pH-dépendant du ratio 5 :1 en se basant uniquement sur la différence de libération entre les ratios en milieu acide (**Figure 49**). Dans les travaux de Volić, l'augmentation de la proportion d'alginate dans un mélange de protéines de soja - alginate de sodium conduit à un plus faible relargage d'huile de thym ([Volić et al., 2018](#)).

La **Figure 47** présente les profils de libération du mélange PPI-TARA aux ratios 5 :1 et 10 :1 dans un milieu acide (pH2,0) et un milieu neutre (pH 6,8).

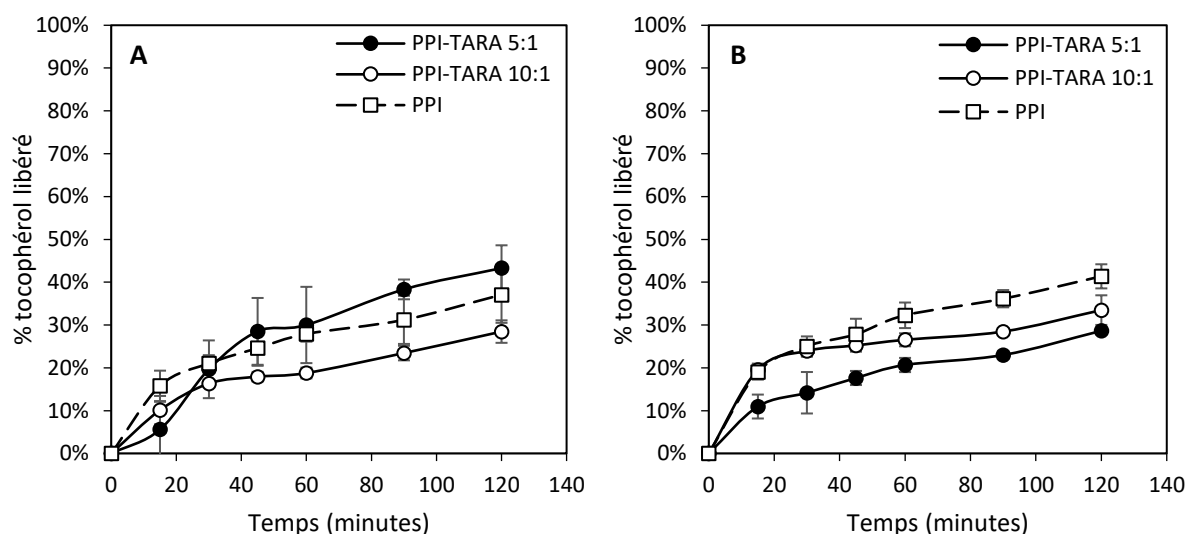


Figure 47: Influence du ratio protéine/polysaccharide dans les microsphères PPI-TARA sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B).

En présence de gomme tara, la libération de l' α -tocophérol semble varier en fonction du ratio. A pH 6,8, la libération d' α -tocophérol est plus importante pour un ratio PPI-TARA 5 :1 que PPI seule (43% et 37% respectivement au bout de 120 minutes d'incubation) (**Figure 47A**). Dans le cas du ratio 10 :1, la libération est plus faible (28% au bout de 120 minutes d'incubation). La différence de stabilité entre 5 :1 et 10 :1 peut être liée à la différence de granulométrie de l'émulsion entre les deux formulations. La formulation de PPI-TARA au ratio 10 :1 présentait un diamètre moyen de gouttelettes d'émulsion inférieur à celui du ratio 5 :1. Cette différence de taille d'émulsion pourrait améliorer la stabilité des microsphères PPI-TARA 10 :1 à pH 6,8 et ainsi limiter la libération du principe actif.

A pH 2,0, le relargage de l' α -tocophérol est plus faible en présence de gomme tara (**Figure 47B**).

On observe que plus la proportion en gomme tara est importante, plus le mélange permet de réduire la libération de l'actif en milieu acide. Dans une étude similaire, l'élaboration d'émulsions à partir de protéines de lait et de gomme guar a permis une libération retardée de vitamines dans des conditions gastriques simulées et une libération en milieu entérique

simulé avec des effets plus marqués qu'en présence de gomme arabique (Li et al., 2011). La gomme guar présente des similarités structurales avec la gomme tara de par sa composition en galactomannane, seul le ratio mannose/galactose diffère (Wu et al., 2017). Des travaux de microencapsulation du β -carotène dans un mélange caséine/gomme guar ont montré des résultats différents en présence d'un milieu à 0,1N d'acide chlorhydrique (pH 1,2). La libération du β -carotène semble augmenter avec la diminution du ratio protéines - polysaccharides (résultat non discuté dans l'article) (Thakur et al., 2017). Enfin, l'utilisation de la gomme tara comme hydrogel constitue un film protecteur permettant un relargage contrôlé d'actifs hydrosolubles, permettant une libération plus importante à pH neutre qu'acide (Rutz et al., 2013). Par comparaison des profils de libération obtenus avec PPI-TARA à pH 6,8 et 2,0 et ceux obtenus en présence de gomme arabique ou de gomme adragante, les propriétés de relargage pH-dépendantes des microsphères pour le couple PPI-TARA sont moins marquées.

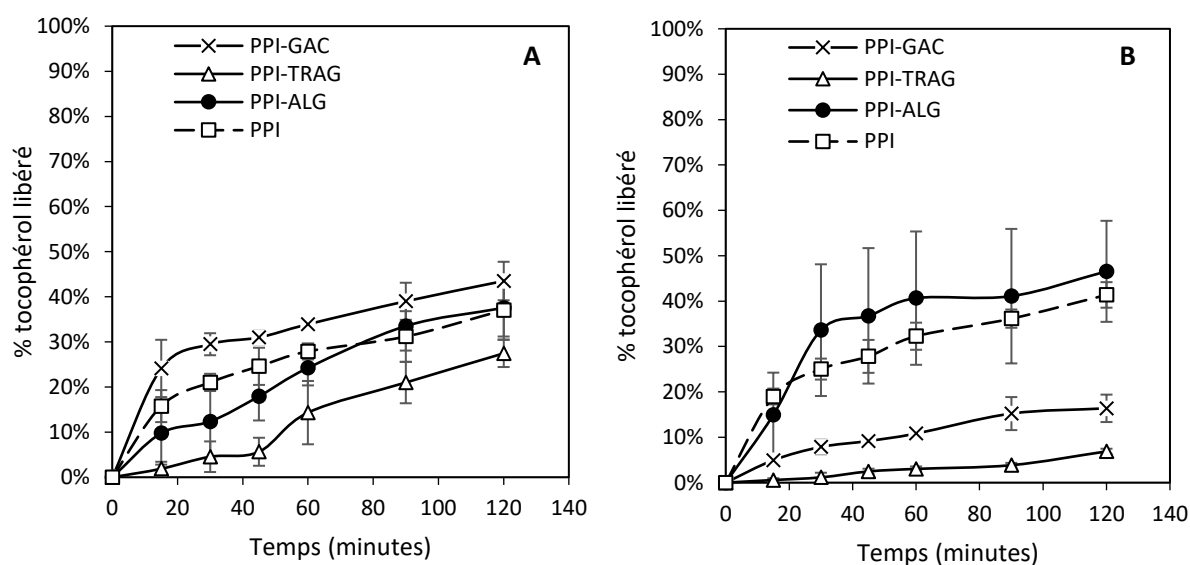


Figure 48: Influence de la nature du polysaccharide sur le profil de libération du tocophérol en fonction du temps dans une solution à pH 6.8 (A) et pH 2.0 (B). Les microsphères comparées correspondent à des microsphères PPI-polysaccharides au ratio 2 :1.

D'après la **Figure 48**, il est possible d'évaluer l'influence du polysaccharide chargé sur la libération du tocophérol pour un ratio protéines - polysaccharides 2 :1 dans les deux milieux de digestion. Ainsi, à pH 2,0, il semble que la gomme arabique et la gomme adragante permettent la meilleure protection de l'actif en milieu acide car ces modèles encapsulants

présentent les taux de libération les plus faibles (inférieurs à 20% au bout de deux heures) (**Figure 48B**). Parmi ces deux gommes, la gomme adragante montre une protection en milieu acide intéressante car son taux de libération n'excède pas 10%. Les microsphères générées à partir du couple protéines de pois – alginate de sodium, comme observé auparavant, ne permettent pas une protection à pH 2,0. A pH 6,8, la libération d' α -tocophérol la plus importante est obtenue pour la gomme arabique avec une libération de 45% de l'actif au bout de 120 minutes (**Figure 48A**). La gomme adragante présente encore une fois le taux de libération le plus faible avec une libération de 28% d' α -tocophérol au bout de 120 minutes. L'alginate de sodium associé à la protéine de pois ne modifie pas le profil de libération du tocophérol (profil de libération équivalent à celui de la protéine de pois).

Cette figure permet de mettre en évidence le potentiel intéressant de la gomme adragante associée à la protéine de pois pour la protection d'un actif lipophile en milieu acide. Malgré une libération plus faible à pH 6,8 que la gomme arabique, la coacervation complexe entre la protéine de pois et la gomme adragante constitue une alternative intéressante à la gomme arabique couramment utilisée pour la vectorisation d'actifs liposolubles avec une libération contrôlée en fonction du pH.

D'après la **Figure 49**, une tendance peut être constatée sur l'évolution des propriétés de relargage des microsphères en fonction de la nature du polysaccharide et le ratio protéine - polysaccharide utilisé. Dans le cas de la gomme arabique et de la gomme adragante, notamment, le couple semble se comporter de la même manière en fonction du ratio. Un comportement gastroprotecteur est constaté pour les ratios 1 : 1 et 2 : 1 et une inversion de ce comportement est observé en augmentant le ratio (à partir du ratio 5 : 1) avec une libération plus importante en milieu acide qu'en milieu neutre. Ce comportement ne semble pas avoir été constaté dans la littérature. Dans le cas de l'alginate, le comportement gastroprotecteur de l'alginate n'a pas été observé quel que soit le pH.

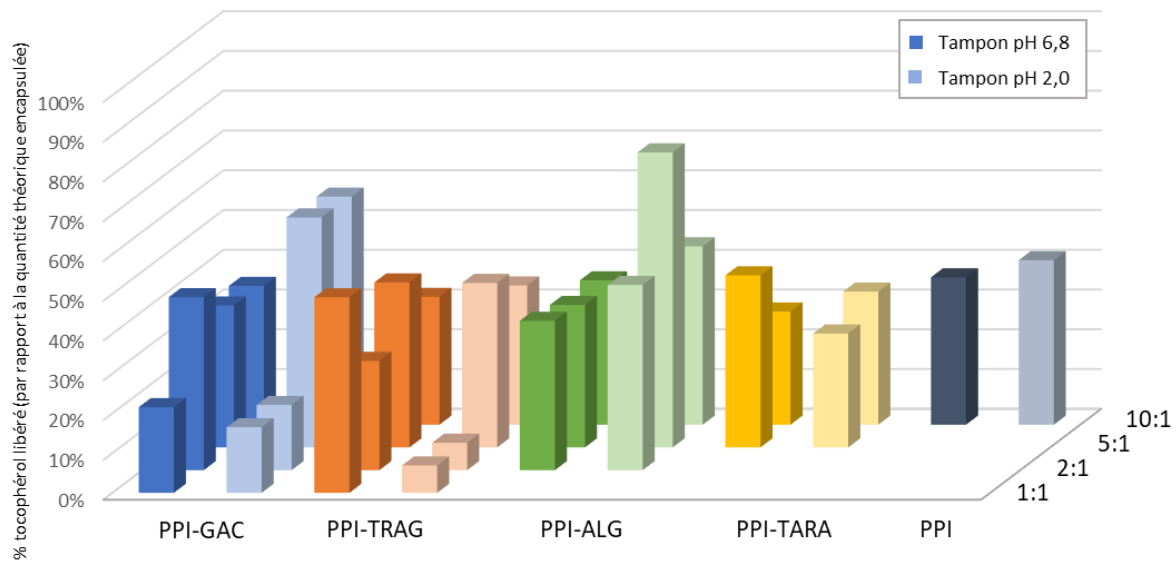


Figure 49: Libération de tocophérol dans les différents mélanges PPI, PPI-GAC, PPI-ALG, PPI-TRAG, PPI-TARA aux différents ratios (1 :1, 2 :1, 5 :1, 10:1) dans une solution à pH 6.8 et pH 2.0 à 120 minutes.

Points-clés :

- Microsphères de PPI seules : pas de différence de libération d'α-tocophérol encapsulé dans les milieux de digestion à pH 2.0 et 6.8
- PPI-GAC et PPI-TRAG : propriétés de relargage similaires
 - Ratios < 5 :1 (m/m) : libération retardée en milieu acide et plus importante en milieu neutre
 - Ajout de polysaccharide permet une protection en milieu acide (caractère gastroprotecteur)
 - Ratios ≥ 5 :1 (m/m) : changement de profil avec augmentation du relargage en milieu acide
- PPI-ALG :
 - Résultats non attendus avec une libération plus importante en milieu acide
 - Lien avec la surface poreuse des microsphères observée au MEB
- Formulation PPI-TARA : caractère pH-dépendant peu marqué

4. Conclusion

L'étude présentée dans ce chapitre avait pour objectif d'élaborer des microsphères complexes basées sur le principe de coacervation complexe entre les protéines de pois et un polysaccharide (gomme arabique, gomme adragante, alginate de sodium ou gomme tara) comme vecteur d'un actif lipophile. Ce mélange a pour avantage de combiner la sensibilité au pH des deux composés, les propriétés émulsifiantes des protéines de pois et présenter des capacités de libération sensibles au pH. Les microsphères produites ont permis d'encapsuler un actif modèle lipophile composé d'un mélange huile de tournesol/ α -tocophérol (90 :10) (m/m).

Les analyses de distribution de taille des émulsions ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'étape d'homogénéisation à haute pression sur l'homogénéité de la distribution de taille des gouttelettes d'émulsion protéines de pois / actif lipophile. L'étape de coacervation complexe, faisant suite à l'étape d'émulsification, semble augmenter la distribution de taille des particules après ajustement du pH. Par comparaison des différents polysaccharides, la gomme arabique permet de former une émulsion plus fine que la gomme adragante et l'alginate de sodium. Cela est à corréliser avec la nature du polysaccharide. L'alginate de sodium, présentant une structure linéaire, possède des charges plus accessibles à l'interaction avec les protéines et pouvant conduire à une précipitation des complexes (Ducel et al., 2004). La gomme arabique semble moins soumise à ces phénomènes de précipitation. Enfin, dans le cas de la gomme adragante, la nature des deux polysaccharides présents dans le mélange (tragacanthine et bassorine) semble affecter la qualité de la granulométrie en raison de la présence de la bassorine, polysaccharide insoluble augmentant la taille des particules observées. La gomme tara affecte peu la qualité de l'émulsion étant donné son caractère non-ionique. Dans le cas de ce modèle, la variation de granulométrie est associée à l'agrégation des protéines entre elles plutôt qu'au phénomène de coacervation complexe. Enfin, l'influence du ratio sur la distribution de tailles des particules en suspension a été montré pour les différents polysaccharides. Il semble que plus le ratio protéines - polysaccharides augmente, et plus le diamètre des particules diminue.

L'étude de viscosité a mis en évidence l'influence du ratio protéines - polysaccharides sur la viscosité de la solution finale avant séchage de la solution par atomisation. Il semble que plus

ce ratio augmente, et plus la viscosité de la solution diminue. Ce paramètre est important à considérer pour la bonne atomisation des gouttelettes de solutions au cours du procédé de séchage. Dans le cas de la gomme adragante et de la gomme tara, les solutions plus visqueuses peuvent affecter les propriétés fonctionnelles des microsphères séchées.

Les différentes formulations séchées par atomisation présentent une humidité relative inférieure à 5% démontrant la bonne qualité de séchage des formulations. L'évolution de l'humidité relative est indépendante de la nature du polysaccharide ou du ratio protéines-polysaccharides. L'humidité relative semble être principalement dépendante des paramètres du procédé de séchage par atomisation. L'analyse de la distribution de taille des microsphères séchées par atomisation met en évidence des particules variant de 10 à 80µm. Dans le cas de la gomme arabique et l'alginate, où les solutions étaient les moins visqueuses, la taille des particules ne varie pas avec le ratio protéines - polysaccharides. En revanche, dans le cas de la gomme adragante, les solutions plus visqueuses provoquent une augmentation de la distribution de la taille des particules. L'augmentation de la concentration en gomme adragante augmente la viscosité de la solution et par conséquent augmente la taille des particules sèches. La même tendance a été constatée pour le rendement d'atomisation. Ainsi, il semble que la viscosité soit un paramètre essentiel à la bonne séchabilité d'une formulation par atomisation. Ainsi, l'humidité et la taille des particules atomisées suivent les lois de l'atomisation en lien avec la viscosité des solutions, plutôt qu'à leur composition. L'efficacité d'encapsulation obtenue pour les différentes formulations varie en fonction de la nature du polysaccharide, avec une efficacité d'encapsulation plus importante dans le cas de l'alginate de sodium. Le ratio protéine-polysaccharide ne semble pas ici jouer un rôle sur l'efficacité d'encapsulation quel que soit le polysaccharide utilisé. Le rendement d'atomisation ne semble pas affecté entre les différents ratios d'un même mélange. Dans le cas de la gomme adragante et la gomme tara, les rendements d'atomisation semblent plus faibles. Cette diminution du rendement d'atomisation est certainement associée à la viscosité des émulsions, suivant les lois de l'atomisation plutôt que de la formulation.

Les particules séchées par atomisation ont été observées par microscopie électronique à balayage. Les microsphères présentent une morphologie sphérique lisse typique du procédé de séchage par atomisation. Les particules sont individualisées et présentent une taille entre

5 et 20µm. Des concavités sont observées à la surface des particules, en lien avec l'évaporation d'eau au cours de la seconde phase du séchage par atomisation. Cette évaporation induit également la formation de cavités internes au sein de la microsphère. Les microsphères présentent au sein de leur structure interne de nombreuses cavités liées à la présence de l'actif lipophile ou d'air emprisonné au cours du procédé d'émulsion. Dans le cas de la gomme adragante et de la gomme arabique, les particules de coacervats complexes sont lisses et ne présentent pas de pores à leur surface. Cette morphologie garantit la protection de l'actif encapsulé. La même observation a été faite pour les formulations PPI-TARA. Les particularités de surface observées pour les formulations en présence d'alginate de sodium mettent en évidence des particules poreuses pouvant altérer les propriétés de protection de l'actif encapsulé.

La formulation avec les protéines de pois seules ne présente pas de différences significatives sur les profils de libération d' α -tocophérol encapsulé à pH 2,0 et 6,8 en absence d'enzymes digestives. Les coacervats complexes PPI-GAC et PPI-TRAG présentent des propriétés similaires de libération d'actifs encapsulés. Pour des ratios protéines - polysaccharides inférieurs à 5 :1, une libération retardée à pH acide et une libération plus importante à pH neutre ont été constatées pour ces deux couples. L'ajout de polysaccharides permet une amélioration de la protection de l'actif en milieu acide aux ratios protéines : polysaccharides 1 :1 et 2 :1. Pour des ratios supérieurs, un changement de profil est constaté avec une augmentation de la libération en milieu acide. L'association protéines de pois-alginate de sodium n'a pas fourni les résultats attendus, à savoir un modèle de profil similaire à la gomme arabique et la gomme adragante. Une libération en milieu acide plus importante a été observée, contrairement aux descriptions dans la littérature pour des modèles semblables. L'ajout de gomme tara à la protéine de pois montre un caractère pH-dépendant peu marqué pour les ratios testés dans le cadre de cette étude. Ainsi, les coacervats complexes de protéines de pois associées à la gomme arabique ou à la gomme adragante ont permis d'établir des microsphères permettant l'encapsulation d'un actif lipophile et présentant des propriétés de libération de l'actif pH-dépendantes modulables en fonction du ratio utilisé.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Ces travaux de thèse avaient pour premier objectif d'étudier les phénomènes de coacervation complexe à partir de biopolymères d'origine végétale en vue de mettre au point un système de microencapsulation d'un actif lipophile permettant une protection et une libération pH-dépendante.

Ce travail de thèse se décompose en deux parties principales : l'une portant sur la caractérisation du phénomène de coacervation complexe entre les protéines de pois et différents polysaccharides, et la seconde portant sur l'application des différents systèmes de coacervats complexes à la microencapsulation d'un composé modèle lipophile, l' α -tocophérol.

Dans un premier temps, les effets du pH et du ratio de mélange protéines - polysaccharides sur la coacervation complexe entre les protéines de pois et trois polysaccharides chargés négativement (gomme arabique, gomme adragante, alginate de sodium) ont été étudiés comparativement à un polysaccharide non chargé (la gomme tara). **Un pH et un ratio optimum** ont été déterminés pour lesquels l'interaction entre les deux biopolymères est maximale. Des **propriétés d'interaction similaires ont été observées pour la gomme arabique et la gomme adragante**. A ce jour, les capacités de la gomme adragante à former des coacervats complexes avec les protéines sont **peu décrites**, notamment en présence de protéines végétales. Ce polymère constitue une **potentielle alternative** à la gomme arabique largement décrite. Le séchage par atomisation des coacervats complexes a permis l'élaboration de microparticules sphériques et lisses typiques du procédé de séchage.

Dans un second temps, après avoir caractérisé les interactions entre les protéines de pois et les différents polysaccharides, nous nous sommes intéressés à leur **application à la microencapsulation**.

Cette partie s'est concentrée sur la caractérisation de microsphères de coacervats complexes encapsulant l' α -tocophérol par séchage par atomisation. Quatorze formulations ont ainsi été caractérisées, correspondant aux différents couples protéines - polysaccharides : protéines de pois seules ou associées à la gomme arabique, la gomme adragante, l'alginate de sodium ou

la gomme tara. Ces formulations ont permis l'encapsulation d'un modèle d'actif lipophile à 25%, constitué à 90% d'huile de tournesol et 10% d' α -tocophérol (utilisé comme marqueur de suivi de libération d'actif). Les différentes formulations ont été séchées par atomisation.

Un suivi de la distribution de la taille des gouttelettes d'huile en émulsion et des particules de coacervats complexes en suspension a été réalisé tout au long du procédé. Les principaux résultats ont permis de démontrer **l'intérêt de l'étape d'homogénéisation à haute pression** des émulsions pour réduire la taille de l'émulsion à l'échelle micrométrique, supposée améliorer sa stabilité. L'addition d'un polysaccharide chargé négativement à l'émulsion entraîne l'augmentation de la taille des particules en suspension. Par comparaison des trois polysaccharides chargés, la gomme arabique semble permettre d'obtenir des particules plus fines qu'en présence de gomme adragante ou d'alginate de sodium. Une influence a également été mise en évidence en fonction du ratio protéines - polysaccharides. L'augmentation de la proportion en polysaccharides augmente la taille des particules en suspension. En présence d'un polysaccharide non-chargé (gomme tara), il n'a pas été observé d'incidence sur la taille des particules dans le mélange, en lien avec l'absence de formation de coacervats complexes.

Les particules en suspension ont été séchées par atomisation. La bonne qualité du séchage par atomisation des coacervats a été contrôlée par détermination de l'humidité relative et de la granulométrie des particules en voie sèche.

Les observations par microscopie électronique à balayage ont permis de mener une étude sur les caractéristiques de surface des microsphères d' α -tocophérol. Ces observations, en mode environnemental, ont permis de valider la qualité du séchage et l'efficacité d'encapsulation. Elles ont notamment permis l'observation des structures internes et externes des microsphères et de les corrélérer aux différentes étapes du séchage par atomisation. Elles ont, de plus, mis en évidence des **variations sur les propriétés de surface des microsphères en fonction du polysaccharide utilisé, ou de la nature de l'interaction** entre la protéine végétale et le polysaccharide.

Le relargage de l' α -tocophérol dans des milieux tamponnés a également été étudiée. Cette étude consistait à soumettre les microsphères à des solutions à pH 2,0 ou 6,8 en vue de dégager les comportements de relargage de l' α -tocophérol encapsulé. **Les résultats ont**

notamment permis de mettre en évidence le potentiel de la gomme arabique et de la gomme adragante comme vecteurs à libération pH-dépendante en fonction du ratio utilisé. Parmi les deux gommes sélectionnées, la **gomme adragante présente la meilleure protection en milieu acide.** Ils ont également permis de montrer une **évolution du comportement de relargage de l'actif des microsphères en fonction du rapport protéines - polysaccharides.** Il a ainsi pu être montré une protection en milieu acide très intéressante pour des ratios protéines - polysaccharides 1 :1 et 2 :1, tandis que pour des ratios supérieurs ou équivalents à 5 :1, une sensibilité au milieu acide est constatée. Dans le cas du couple protéines de pois/alginate de sodium, la sensibilité des microsphères en milieu acide a été corrélée avec la morphologie particulière des microsphères observées au MEB.

Finalement, ce travail de thèse participe à la **valorisation de protéines végétales** comme les protéines de pois. Les résultats obtenus ont montré la capacité des protéines de pois à s'associer avec des polysaccharides pour former un enrobant avec un caractère pH-dépendant intéressant pour la microencapsulation. Ces travaux ont fait l'objet d'une **étude simultanée de la formulation et du procédé** pour aboutir à des réponses pertinentes aux problèmes techniques rencontrés pour l'application de microencapsulation. Ces travaux permettent également d'étendre l'étude à un vaste choix de protéines et polysaccharides chargés d'origine végétale. Cette approche permet en outre d'adapter les conditions d'utilisation des biopolymères aux procédés industrialisables (problématique de viscosité, séchabilité, application visée).

Différentes perspectives peuvent être dégagées de ces travaux :

Tout d'abord, pour optimiser les différentes formulations produites, le ratio actif/encapsulant doit être exploré en augmentant notamment la charge d'actif dans la microsphère en vue de contrôler la stabilité de l'émulsion ou de déterminer les capacités encapsulantes des différentes formules. La formule pourrait également être adaptée en variant la source de protéines de pois. En effet, en fonction des conditions d'extraction des protéines de pois, leurs propriétés émulsifiantes, leur solubilité ou encore leurs propriétés d'interactions avec les polysaccharides se voient modifiées (décalage du point isoélectrique, augmentation/diminution de l'état de charge des protéines dans le mélange, ...).

La caractérisation du profil de libération de l' α -tocophérol encapsulé par les différentes formulations doit également faire l'objet d'une soumission des microsphères à des milieux de digestion différents, incluant notamment la présence d'enzymes (pepsine, pancréatine, trypsine, ...) ou encore d'une microflore. En effet, les protéines et polysaccharides utilisés peuvent être sensibles à l'action des enzymes gastrointestinales et de la microflore intestinale favorisant une dégradation des microsphères, engendrant la libération de l'actif encapsulé. Les protéines de pois, notamment, utilisées pour former ces microsphères sont constitués d'un mélange hétérogène de protéines variant par leur masse moléculaire et d'assemblages complexes de sous-unités liées entre elles par des ponts disulfures ou des liaisons de faible énergie. En présence de pepsine, la protéine de pois est sensible à l'hydrolyse entraînant la déstabilisation de sa structure à pH acide ([Perrot, 1995](#)). Selon les travaux de N. Joguet, des microsphères formulées avec des protéines de pois encapsulant de l'acétate de rétinol subissent une déstructuration de la matrice par hydrolyse des protéines de pois par la pepsine en milieu acide (pH 2,0), entraînant une libération rapide de l'actif ([Joguet, 2014](#)). En digestion entérique, la libération de l'actif est inférieure à celle observée en milieu acide. L'auteur précise que la rétention de l'actif au sein d'une matrice de protéines végétales dépend également de la présence de facteurs antinutritionnels pouvant diminuer la dégradation des protéines par les enzymes. Il pourrait également être intéressant d'observer le comportement des microsphères dans les milieux de digestion par microscopie électronique à balayage, notamment observer l'état de surface des particules après digestion.

En parallèle, pour améliorer la stabilité des microsphères dans les milieux de digestion, une étape de réticulation naturelle par l'utilisation de génipine ou de polyphénols pourra être envisagée. En effet, il a déjà été démontré dans des travaux précédents l'amélioration de la stabilité de microsphères de protéines de pois en présence de polyphénols ([Joguet, 2014](#)). Le choix d'un réticulant autre qu'un agent chimique comme le glutaraldéhyde est une stratégie à adopter pour poursuivre les travaux selon la thématique d'utilisation de biopolymères.

Enfin, les propriétés mucoadhésives des microsphères peuvent être explorées notamment en présence de gomme adragante. L'observation de propriétés mucoadhésives dans le cas des microsphères améliorerait l'efficacité de la vectorisation et de la libération en milieu intestinal en augmentant le temps de résidence des microsphères au niveau de la paroi intestinale.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abasalizadeh, F., Moghaddam, S.V., Alizadeh, E., akbari, E., Kashani, E., Fazljou, S.M.B., Torbati, M., Akbarzadeh, A., 2020. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *J. Biol. Eng.* 14, 8.
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1688–1713.
- Aberkane, L., Roudaut, G., Saurel, R., 2014. Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1505–1517.
- Adebiyi, A.P., Aluko, R.E., 2011. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chem.* 128, 902–908.
- Aditya, N.P., Espinosa, Y.G., Norton, I.T., 2017. Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. *Biotechnol. Adv.* 35, 450–457.
- Adler, G., 1997. Regulation of Human Pancreatic Secretion. *Digestion* 58, 39–41.
- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J.J., Jiménez-Aparicio, A.R., Gutiérrez-López, G.F., 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *J. Food Eng.* 67, 179–184.
- Aluko, R.E., Mofolasayo, O.A., Watts, B.M., 2009. Emulsifying and Foaming Properties of Commercial Yellow Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Flours. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9793–9800.
- Anderson, D.M.W., Bridgeman, M.M.E., 1985. The composition of the proteinaceous polysaccharides exuded by *astragalus microcephalus*, *A. Gummifer* and *A. Kurdicus*—The sources of turkish gum tragacanth. *Phytochemistry* 24, 2301–2304.
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Zhong, F., 2015. Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. *Food Hydrocoll.* 44, 309–319.
- Arpagaus, C., Collenberg, A., Rützi, D., Assadpour, E., Jafari, S.M., 2018. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 546, 194–214.
- Atgié, M., Garrigues, J.C., Chennevière, A., Masbernard, O., Roger, K., 2019. Gum Arabic in solution: Composition and multi-scale structures. *Food Hydrocoll.* 91, 319–330.
- Atkinson, J., Epand, R.F., Epand, R.M., 2008. Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 739–764.
- Azarikia, F., Abbasi, S., 2016. Mechanism of soluble complex formation of milk proteins with native gums (tragacanth and Persian gum). *Food Hydrocoll.* 59, 35–44.
- Bai, L., Liu, F., Xu, X., Huan, S., Gu, J., McClements, D.J., 2017. Impact of polysaccharide molecular characteristics on viscosity enhancement and depletion flocculation. *J. Food Eng.* 207, 35–45.
- Bajaj, P.R., Bhunia, K., Kleiner, L., Joyner (Melito), H.S., Smith, D., Ganjyal, G., Sablani, S.S., 2017. Improving functional properties of pea protein isolate for microencapsulation of flaxseed oil. *J. Microencapsul.* 34, 218–230.
- Balaghi, S., Mohammadifar, M.A., Zargaraan, A., 2010. Physicochemical and Rheological Characterization of Gum Tragacanth Exudates from Six Species of Iranian Astragalus. *Food Biophys.* 5, 59–71.
- Balaghi, S., Mohammadifar, M.A., Zargaraan, A., Gavlighi, H.A., Mohammadi, M., 2011. Compositional analysis and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian Astragalus. *Food Hydrocoll.* 25, 1775–1784.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., Ristic, N., 2010. Profile and Functional Properties of Seed Proteins from Six Pea (*Pisum sativum*) Genotypes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 4973–4990.

- Barbosa, J.A.C., Abdelsadig, M.S.E., Conway, B.R., Merchant, H.A., 2019. Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. *Int. J. Pharm.* X 1, 100024.
- Barrow, C.J., Nolan, C., Jin, Y., 2007. Stabilization of highly unsaturated fatty acids and delivery into foods. *Lipid Technol.* 19, 108–111.
- Bastos, L.P.H., de Sá Costa, B., Siqueira, R.P., Garcia-Rojas, E.E., 2020. Complex coacervates of β -lactoglobulin/sodium alginate for the microencapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil: Simulated gastrointestinal conditions and modeling release kinetics. *Int. J. Biol. Macromol.* 160, 861–870.
- Ben Amara, C., Eghbal, N., Degraeve, P., Gharsallaoui, A., 2016. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *J. Food Eng.* 183, 50–57.
- Botrel, D.A., de Barros Fernandes, R.V., Borges, S.V., Yoshida, M.I., 2014. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Res. Int.* 62, 344–352.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.-L., Agnely, F., 2012. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *Int. J. Pharm.* 436, 359–378.
- Braga, A.R.C., Murador, D.C., de Souza Mesquita, L.M., de Rosso, V.V., 2018. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *J. Food Compos. Anal.* 68, 31–40.
- Bungenberg de Jong, H.G., 1949. Crystallisation-coacervation-flocculation. Complex colloid systems. HR Kruyt Ed Colloid Sci. Elsevier Amst. 2.
- Bungenberg De Jong, H.G., Kruyt, H.R., 1929. Coacervation (partial miscibility in colloid systems). *Proc K Ned Akad Wet* 32, 849–856.
- Burgess, D.J., 1994. Complex Coacervation: Microcapsule Formation. In: Dubin, P., Bock, J., Davis, R., Schulz, D.N., Thies, C. (Eds.), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 285–300.
- Chai, J., Jiang, P., Wang, P., Jiang, Y., Li, D., Bao, W., Liu, Bingxue, Liu, Bin, Zhao, L., Norde, W., Yuan, Q., Ren, F., Li, Y., 2018. The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. *Trends Food Sci. Technol.* 78, 144–154.
- Chaiyasat, P., Chaiyasat, A., Teeka, P., Noppalit, S., Srinorachun, U., 2013. Preparation of Poly(L-Lactic Acid) Microencapsulated Vitamin E. *Energy Procedia*, 10th Eco-Energy and Materials Science and Engineering Symposium 34, 656–663.
- Champagne, C.P., Fustier, P., 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 184–190.
- Chang, C.-P., Leung, T.-K., Lin, S.-M., Hsu, C.-C., 2006. Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 50, 136–140.
- Choi, M.-J., Ruktanonchai, U., Min, S.-G., Chun, J.-Y., Soottitantawat, A., 2010. Physical characteristics of fish oil encapsulated by β -cyclodextrin using an aggregation method or polycaprolactone using an emulsion–diffusion method. *Food Chem.* 119, 1694–1703.
- Chourpa, I., Ducel, V., Richard, J., Dubois, P., Boury, F., 2006. Conformational Modifications of α Gliadin and Globulin Proteins upon Complex Coacervates Formation with Gum Arabic as Studied by Raman Microspectroscopy. *Biomacromolecules* 7, 2616–2623.
- Claessens, M., Calame, W., Siemensma, A.D., van Baak, M.A., Saris, W.H.M., 2009. The effect of different protein hydrolysate/carbohydrate mixtures on postprandial glucagon and insulin responses in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 48–56.
- Cocero, M.J., Martín, Á., Mattea, F., Varona, S., 2009. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *J. Supercrit. Fluids* 47, 546–555.

- Comunian, T.A., Favaro-Trindade, C.S., 2016. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocoll.* 61, 442–457.
- Conforto, E., Joguet, N., Buisson, P., Vendeville, J.-E., Chaigneau, C., Maugard, T., 2015. An optimized methodology to analyze biopolymer capsules by environmental scanning electron microscopy. *Mater. Sci. Eng. C* 47, 357–366.
- Costa, A.M.M., Nunes, J.C., Lima, B.N.B., Pedrosa, C., Calado, V., Torres, A.G., Pierucci, A.P.T.R., 2015. Effective stabilization of CLA by microencapsulation in pea protein. *Food Chem.* 168, 157–166.
- Cote, G.L., Krull, L.H., 1988. Characterization of the exocellular polysaccharides from *Azotobacter chroococcum*. *Carbohydr. Res.* 181, 143–152.
- Croy, R.R.D., Gatehouse, J.A., Evans, I.M., Boulter, D., 1980. Characterisation of the storage protein subunits synthesised in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (*Pisum sativum* L.): I. Legumin. *Planta* 148, 49–56.
- Csonka, F.A., Murphy, J.C., Jones, D.B., 1926. The iso-electric points of various proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 48, 763–768.
- Cuevas-Bernardino, J.C., Leyva-Gutierrez, F.M.A., Vernon-Carter, E.J., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Davidov-Pardo, G., 2018. Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum – Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. *Food Hydrocoll.* 77, 736–745.
- Cuillerier, E., Marteau, P., 2002. Physiologie gastrointestinale de l’homme. *Physiol. Gastrointestinale Homme* 21–39.
- Dakia, P.A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M., 2008. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocoll.* 22, 807–818.
- Damodaran, S., 2006. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *J. Food Sci.* 70, R54–R66.
- Daoub, R.M.A., Elmubarak, A.H., Misran, M., Hassan, E.A., Osman, M.E., 2018. Characterization and functional properties of some natural Acacia gums. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 17, 241–249.
- de Almeida Costa, G.E., da Silva Queiroz-Monici, K., Pissini Machado Reis, S.M., de Oliveira, A.C., 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.* 94, 327–330.
- de Conto, L.C., Grosso, C.R.F., Gonçalves, L.A.G., 2013. Chemometry as applied to the production of omega-3 microcapsules by complex coacervation with soy protein isolate and gum Arabic. *LWT - Food Sci. Technol.* 53, 218–224.
- de Farias, S.S., Siqueira, S.M.C., Cunha, A.P., de Souza, C.A.G., dos Santos Fontenelle, R.O., de Araújo, T.G., de Amorim, A.F.V., de Menezes, J.E.S.A., de Moraes, S.M., Ricardo, N.M.P.S., 2018. Microencapsulation of riboflavin with galactomannan biopolymer and F127: Physico-chemical characterization, antifungal activity and controlled release. *Ind. Crops Prod.* 118, 271–281.
- de Souza Simões, L., Madalena, D.A., Pinheiro, A.C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., Ramos, Ó.L., 2017. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Adv. Colloid Interface Sci.* 243, 23–45.
- Debenedetti, P.G., Tom, J.W., Kwauk, X., Yeo, S.-D., 1993. Rapid expansion of supercritical solutions (ress): fundamentals and applications. *Fluid Phase Equilibria* 82, 311–321.
- Desai, K.G.H., Jin Park, H., 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Dry. Technol.* 23, 1361–1394.
- Devi, N., Hazarika, D., Deka, C., Kakati, D.K., 2012. Study of Complex Coacervation of Gelatin A and Sodium Alginate for Microencapsulation of Olive Oil. *J. Macromol. Sci. Part A* 49, 936–945.
- Dhakal, S.P., He, J., 2020. Microencapsulation of vitamins in food applications to prevent losses in processing and storage: A review. *Food Res. Int.* 137, 109326.

- Dickinson, E., 1998. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 347–354.
- Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll.* 17, 25–39.
- Djoullah, A., Saurel, R., 2021. Controlled release of riboflavin encapsulated in pea protein microparticles prepared by emulsion-enzymatic gelation process. *J. Food Eng.* 292, 110276.
- Dolinsky, A.A., 2001. High-temperature spray drying. *Dry. Technol.* 19, 785–806.
- 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 Hydrocoll.* 46, 28–36.
- Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Jia, C., Xia, S., Zhang, X., 2011. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *J. Food Eng.* 104, 455–460.
- Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., Boury, F., 2004. Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 232, 239–247.
- Duclairoir, C., Orecchioni, A.M., Depraetere, P., Nakache, E., 2002. α -Tocopherol encapsulation and in vitro release from wheat gliadin nanoparticles. *J. Microencapsul.* 19, 53–60.
- Duhoranimana, 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 Hydrocoll.* 69, 111–120.
- Duhoranimana, E., Yu, J., Mukeshimana, O., Habinshuti, I., Karangwa, E., Xu, X., Muhoza, B., Xia, S., Zhang, X., 2018. Thermodynamic characterization of Gelatin–Sodium carboxymethyl cellulose complex coacervation encapsulating Conjugated Linoleic Acid (CLA). *Food Hydrocoll.* 80, 149–159.
- Dussert, E., 2020. Étude des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de métabolites secondaires bactériens produits directement dans l’eau, en modèles acellulaires, cellulaires et par la mise en place d’un modèle original de barrière intestinale. (Ingénierie des fonctions biologiques). Université de Lille, Lille.
- Ehlers, H., Räikkönen, H., Antikainen, O., Heinämäki, J., Yliruusi, J., 2009. Improving flow properties of ibuprofen by fluidized bed particle thin-coating. *Int. J. Pharm.* 368, 165–170.
- Elmer, C., Karaca, A.C., Low, N.H., Nickerson, M.T., 2011. Complex coacervation in pea protein isolate–chitosan mixtures. *Food Res. Int.* 44, 1441–1446.
- Ensign, L.M., Cone, R., Hanes, J., 2012. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 557–570.
- Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C.J., Adhikari, B., 2018. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 71, 121–131.
- 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. *J. Funct. Foods* 19, 882–892.
- Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J.G., Cruz-Sosa, F., Vernon-Carter, E.J., 2007. Gum Arabic–Chitosan Complex Coacervation. *Biomacromolecules* 8, 1313–1318.
- Estevinho, B.N., Rocha, F., Santos, L., Alves, A., 2013. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends Food Sci. Technol.* 31, 138–155.
- Fang, Z., Xu, X., Cheng, H., Li, J., Guang, C., Liang, L., 2019. Comparison of whey protein particles and emulsions for the encapsulation and protection of α -tocopherol. *J. Food Eng.* 247, 56–63.
- Farzi, M., Emam-Djomeh, Z., Mohammadifar, M.A., 2013. A comparative study on the emulsifying properties of various species of gum tragacanth. *Int. J. Biol. Macromol.* 57, 76–82.

- Farzi, M., Yarmand, M.S., Safari, M., Emam-Djomeh, Z., Mohammadifar, M.A., 2015. Gum tragacanth dispersions: Particle size and rheological properties affected by high-shear homogenization. *Int. J. Biol. Macromol.* 79, 433–439.
- Fathi, M., Donsi, F., McClements, D.J., 2018. Protein-Based Delivery Systems for the Nanoencapsulation of Food Ingredients: Nanoencapsulation of food ingredients.... *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 920–936.
- Fayazzadeh, E., Rahimpour, S., Ahmadi, S.M., Farzampour, S., Sotoudeh Anvari, M., Boroumand, M.A., Ahmadi, S.H., 2014. Acceleration of skin wound healing with tragacanth (*Astragalus*) preparation: an experimental pilot study in rats. *Acta Med. Iran.* 52, 3–8.
- Figueiro, S., Goes, J., Moreira, R., Sombra, A., 2004. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. *Carbohydr. Polym.* 56, 313–320.
- Fincher, G.B., Stone, B.A., Clarke, A.E., 1983. Arabinogalactan-Proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34, 47–70.
- Frascareli, E.C., Silva, V.M., Tonon, R.V., Hubinger, M.D., 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food Bioprod. Process.* 90, 413–424.
- Frugier, D., Audebert, R., 1994. Interaction Between Oppositely Charged Low Ionic Density Polyelectrolytes: Complex Formation or Simple Mixture? In: Dubin, P., Bock, J., Davis, R., Schulz, D.N., Thies, C. (Eds.), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 135–149.
- Fukushima, D., 1991. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Rev. Int.* 7, 353–381.
- Gamboa, O.D., Gonçalves, L.G., Grosso, C.F., 2011. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. *Procedia Food Sci.*, 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11) 1, 1732–1739.
- Ganza-González, A., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco Méndez, J., 1999. Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 48, 149–155.
- Gardner, M.L.G., 1988. Gastrointestinal Absorption of Intact Proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 8, 329–350.
- Gåserød, O., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G., 1998. Microcapsules of alginate-chitosan – I. *Biomaterials* 19, 1815–1825.
- Gatehouse, J.A., Gilroy, J., Hoque, M.S., Croy, R.R., 1985. Purification, properties and amino acid sequence of a low-Mr abundant seed protein from pea (*Pisum sativum* L.). *Biochem. J.* 225, 239–247.
- Gavlighi, H.A., Meyer, A.S., Zaidel, D.N.A., Mohammadifar, M.A., Mikkelsen, J.D., 2013. Stabilization of emulsions by gum tragacanth (*Astragalus* spp.) correlates to the galacturonic acid content and methoxylation degree of the gum. *Food Hydrocoll.* 31, 5–14.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40, 1107–1121.
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., Cayot, P., 2010. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chem.*, 5th Conference on Water in Food 122, 447–454.
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Voilley, A., 2012. Pea (*Pisum sativum*, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2211–2221.
- Ghayempour, S., Montazer, M., Mahmoudi Rad, M., 2016. Encapsulation of Aloe Vera extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 344–349.
- Ghorbani Gorji, S., Ghorbani Gorji, E., Mohammadifar, M.A., Zargaraan, A., 2014. Complexation of sodium caseinate with gum tragacanth: Effect of various species and rheology of coacervates. *Int. J. Biol. Macromol.* 67, 503–511.

- Gibbs, B., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C., 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50, 213–224.
- Goodarzi, F., Zendejboudi, S., 2019. A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *Can. J. Chem. Eng.* 97, 281–309.
- Gouin, S., 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 330–347.
- Gu, J.M., Robinson, J.R., Leung, S.H., 1988. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure-property relationships. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 5, 21–67.
- Gueguen, J., 1983. Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.* 32, 267–303.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M., 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* 30, 591–600.
- Gunder, W., Lippold, B.H., Lippold, B.C., 1995. Release of drugs from ethyl cellulose microcapsules (diffusion pellets) with pore formers and pore fusion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3, 203–214.
- Guo, H., Zhao, X., 2008. Preparation of microcapsules with narrow-size distribution by complex coacervation: Effect of sodium dodecyl sulphate concentration and agitation rate. *J. Microencapsul.* 25, 221–227.
- Guo, Q., Su, J., Yuan, F., Mao, L., Gao, Y., 2019. Preparation, characterization and stability of pea protein isolate and propylene glycol alginate soluble complexes. *LWT* 101, 476–482.
- Guzey, D., Kim, H.J., McClements, D.J., 2004. Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin–pectin membranes. *Food Hydrocoll.* 18, 967–975.
- Hadzieva, J., Mladenovska, K., Simonoska Crcarevska, M., Glavaš Dodov, M., Dimchevska, S., Geškovski, N., Grozdanov, A., Popovski, E., Petruševski, G., Chachorovska, M., Petreska Ivanovska, T., Petruševska-Tozi, L., Ugarkovic, S., Goracinova, K., 2017. Lactobacillus casei loaded Soy Protein-Alginate Microparticles prepared by Spray-Drying. *Food Technol. Biotechnol.* 55.
- Hampel, N., Bück, A., Peglow, M., Tsotsas, E., 2013. Continuous pellet coating in a Wurster fluidized bed process. *Chem. Eng. Sci.* 86, 87–98.
- Hategekimana, J., Masamba, K.G., Ma, J., Zhong, F., 2015. Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. *Carbohydr. Polym.* 124, 172–179.
- Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., Chiralt, A., 2004. Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocoll.* 18, 403–411.
- Herrero-Vanrell, R., Bravo-Osuna, I., Andrés-Guerrero, V., Vicario-de-la-Torre, M., Molina-Martínez, I.T., 2014. The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies. *Prog. Retin. Eye Res.* 42, 27–43.
- Higuchi, T., 1963. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.* 52, 1145–1149.
- Horniblow, R.D., Latunde-Dada, G.O., Harding, S.E., Schneider, M., Almutairi, F.M., Sahni, M., Bhatti, A., Ludwig, C., Norton, I.T., Iqbal, T.H., Tselepis, C., 2016. The chelation of colonic luminal iron by a unique sodium alginate for the improvement of gastrointestinal health. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 2098–2108.
- Hu, B., Liu, X., Zhang, C., Zeng, X., 2017. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *J. Food Drug Anal.* 25, 3–15.
- Idris, O.H.M., Williams, P.A., Phillips, G.O., 1998. Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocoll.* 12, 379–388.
- Islam, A.M., Phillips, G.O., Slijivo, A., Snowden, M.J., Williams, P.A., 1997. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocoll.* 11, 493–505.

- Jafari, S., Hojjati, M., Noshad, M., 2018. Influence of soluble soybean polysaccharide and tragacanth gum based edible coating to improve the quality of fresh-cut apple slices. *J. Food Process. Preserv.* 42, e13638.
- Jafari, S.M., Katouzian, I., Rajabi, H., Ganje, M., 2017. Bioavailability and release of bioactive components from nanocapsules. In: *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. Elsevier, pp. 494–523.
- Jain, A., Thakur, D., Ghoshal, G., Katare, O.P., Shivhare, U.S., 2016. Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. *Int. J. Biol. Macromol.* 87, 101–113.
- Joguet, N., 2014. Utilisation et fonctionnalisation de protéines pour la conception de nouvelles microsphères permettant la protection et le relargage contrôlé de vitamine A (Valorisation chimique et biologiques des agroressources). Université de la Rochelle, La rochelle.
- Jones, O.G., McClements, D.J., 2010. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 374–397.
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian, Y., 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem.* 125, 1267–1272.
- Juttulapa, M., Piriyaprasarth, S., Takeuchi, H., Sriamornsak, P., 2017. Effect of high-pressure homogenization on stability of emulsions containing zein and pectin. *Asian J. Pharm. Sci.* 12, 21–27.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, Colin.J., Adhikari, B., 2016. Microencapsulation of flaxseed oil in flaxseed protein and flaxseed gum complex coacervates. *Food Res. Int.* 86, 1–8.
- Khajavi, R., Pourgharbi, S.H.M., Kiumarsi, A., Rashidi, A., 2007. Gum Tragacanth Fibers from *Astragalus gummifer* Species: Effects of Influencing Factors on Mechanical Properties of Fibers. *J. Appl. Sci.* 7, 2861–2865.
- Klassen, D.R., Elmer, C.M., Nickerson, M.T., 2011. Associative phase separation involving canola protein isolate with both sulphated and carboxylated polysaccharides. *Food Chem.* 126, 1094–1101.
- Klassen, D.R., Nickerson, M.T., 2012. Effect of pH on the formation of electrostatic complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum Arabic polysaccharides. *Food Res. Int.* 46, 167–176.
- Klemmer, K.J., Waldner, L., Stone, A., Low, N.H., Nickerson, M.T., 2012. Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chem.* 130, 710–715.
- Kong, X.Z., Gu, X., Zhu, X., Zhang, Z., 2009. Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component molecule. *Biomed. Microdevices* 11, 275–285.
- Kora, A.J., Arunachalam, J., 2012. Green Fabrication of Silver Nanoparticles by Gum Tragacanth (*Astragalus gummifer*): A Dual Functional Reductant and Stabilizer. *J. Nanomater.* 2012, 1–8.
- Lai, S.K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., Hanes, J., 2009. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 86–100.
- Lamprecht, A., Schäfer, U., Lehr, C.-M., 2001. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for O - 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. *J. Microencapsul.* 18, 347–357.
- Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., Rao, J., 2020a. Microencapsulation of hemp seed oil by pea protein isolate–sugar beet pectin complex coacervation: Influence of coacervation pH and wall/core ratio. *Food Hydrocoll.* 106423.
- Lan, Y., Ohm, J.-B., Chen, B., Rao, J., 2020b. Phase behavior and complex coacervation of concentrated pea protein isolate-beet pectin solution. *Food Chem.* 307, 125536.
- Lazim N.A.M., Muhamad I.I., 2017. Encapsulation of vitamin e using maltodextrin/sodium caseinate/selenomethionine and its release study. *Chem. Eng. Trans.* 56, 1951–1956.
- Lemetter, C.Y.G., Meeuse, F.M., Zuidam, N.J., 2009. Control of the morphology and the size of complex coacervate microcapsules during scale-up. *AIChE J.* 55, 1487–1496.

- Leterme, P., Monmart, T., Baudart, E., 1990. Amino acid composition of pea (*Pisum sativum*) proteins and protein profile of pea flour. *J. Sci. Food Agric.* 53, 107–110.
- Li, B., Jiang, Y., Liu, F., Chai, Z., Li, Y., Leng, X., 2011. Study of the Encapsulation Efficiency and Controlled Release Property of Whey Protein Isolate--Polysaccharide Complexes in W1/O/W2 Double Emulsions. *Int. J. Food Eng.* 7.
- Li, Y., Huang, Q., 2015. Protein-polysaccharide complexes for effective delivery of bioactive functional food ingredients. In: Sabliov, C.M., Chen, H., Yada, R.Y. (Eds.), *Nanotechnology and Functional Foods*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 224–246.
- Liang, H.-C., Chang, W.-H., Liang, H.-F., Lee, M.-H., Sung, H.-W., 2004. Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, 4017–4026.
- Lin, W.-J., Kang, W.-W., 2003. Comparison of chitosan and gelatin coated microparticles: Prepared by hot-melt method. *J. Microencapsul.* 20, 169–177.
- Liu, J., Shim, Y.Y., Shen, J., Wang, Y., Reaney, M.J.T., 2017. Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic coacervates: Turbidity and rheology. *Food Hydrocoll.* 64, 18–27.
- Liu, L., Zhao, Q., Liu, T., Long, Z., Kong, J., Zhao, M., 2012. Sodium caseinate/xanthan gum interactions in aqueous solution: Effect on protein adsorption at the oil–water interface. *Food Hydrocoll.* 27, 339–346.
- Liu, S., Elmer, C., Low, N.H., Nickerson, M.T., 2010. Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. *Food Res. Int.* 43, 489–495.
- Liu, S., Low, N.H., Nickerson, M.T., 2009. Effect of pH, Salt, and Biopolymer Ratio on the Formation of Pea Protein Isolate–Gum Arabic Complexes. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1521–1526.
- López-Franco, Y., Higuera-Ciapara, I., Goycoolea, F.M., Wang, W., 2009. 18 - Other exudates: tragacanth, karaya, mesquite gum and larchwood arabinogalactan. In: Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 495–534.
- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. (Lucy), Wang, Q., 2011. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 85, 145–152.
- Madan, P.L., Luzzi, L.A., Price, J.C., 1972. Factors Influencing Microencapsulation of a Waxy Solid by Complex Coacervation. *J. Pharm. Sci.* 61, 1586–1588.
- Mahendran, T., Williams, P.A., Phillips, G.O., Al-Assaf, S., Baldwin, T.C., 2008. New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan–Protein (AGP) Fraction of Gum Arabic. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9269–9276.
- Malallah, O.S., Garcia, C.M.A., Proctor, G.B., Forbes, B., Royall, P.G., 2018. Buccal drug delivery technologies for patient-centred treatment of radiation-induced xerostomia (dry mouth). *Int. J. Pharm.* 541, 157–166.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., Mackie, A., 2011. The role of bile salts in digestion. *Adv. Colloid Interface Sci.* 165, 36–46.
- Marisa Ribeiro, A., Estevinho, B.N., Rocha, F., 2019. Microencapsulation of polyphenols - The specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review. *Trends Food Sci. Technol.*
- Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., Morales, M.E., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 15–25.
- Masters, Keith., 1968. SPRAY DRYING—The Unit Operation Today. *Ind. Eng. Chem.* 60, 53–63.
- Mayes, J.M., 2009. Gum Tragacanth and Karaya. In: Imeson, A. (Ed.), *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 167–179.
- McClements, D.J., 2006. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 24, 621–625.

- McDonald, S.W., MacFarlane, N.G., 2018. The mouth, stomach and intestines. *Anaesth. Intensive Care Med.* 19, 128–132.
- Medicine, I.O., 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. The National Academies Press, Washington (DC), USA.
- Mendanha, D.V., Molina Ortiz, S.E., Favaro-Trindade, C.S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E.S., Thomazini, M., 2009. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Res. Int.* 42, 1099–1104.
- Miró Specos, M.M., Escobar, G., Marino, P., Puggia, C., Defain Tesoriero, M.V., Hermida, L., 2010. Aroma Finishing of Cotton Fabrics by Means of Microencapsulation Techniques. *J. Ind. Text.* 40, 13–32.
- Molina Ortiz, S.E., Puppo, M.C., Wagner, J.R., 2004. Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates–carrageenan systems. *Food Hydrocoll.* 18, 1045–1053.
- Morais, C.A., de Rosso, V.V., Estadella, D., Pisani, L.P., 2016. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. *J. Nutr. Biochem.* 33, 1–7.
- Moschakis, T., Biliaderis, C.G., 2017. Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 28, 96–109.
- Mousazadeh, M., Mousavi, M., Askari, G., Kiani, H., Adt, I., Gharsallaoui, A., 2018. Thermodynamic and physiochemical insights into chickpea protein-Persian gum interactions and environmental effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 119, 1052–1058.
- Muhoza, B., Xia, S., Cai, J., Zhang, X., Duhoranimana, E., Su, J., 2019. Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability. *Food Hydrocoll.* 87, 712–722.
- Mujoo, R., Trinh, D.T., Ng, P.K.W., 2003. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chem.* 82, 265–273.
- Munialo, C.D., van der Linden, E., de Jongh, H.H.J., 2014. The ability to store energy in pea protein gels is set by network dimensions smaller than 50nm. *Food Res. Int.* 64, 482–491.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F., 2011. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* 3, 793–829.
- Nakajima, A., Sato, H., 1972. Phase relationships of an equivalent mixture of sulfated polyvinyl alcohol and aminoacetylated polyvinyl alcohol in microsalt aqueous solution. *Biopolymers* 11, 1345–1355.
- Nayak, A.K., Pal, D., 2011. Development of pH-sensitive tamarind seed polysaccharide–alginate composite beads for controlled diclofenac sodium delivery using response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 784–793.
- Nayak, N., Singh, H., 2019. Milk Protein–Polysaccharide Interactions in Food Systems. In: *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier, pp. 431–438.
- Nesterenko, Alla, 2012. Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation. *Sci. Agroressources* 40.
- Nesterenko, A., 2012. Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation (Science des Agroressources). Université de Toulouse, Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V., 2012. Influence of soy protein’s structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Res. Int.* 48, 387–396.
- Nesterenko, A., Alric, I., Violleau, F., Silvestre, F., Durrieu, V., 2013. A new way of valorizing biomaterials: The use of sunflower protein for α -tocopherol microencapsulation. *Food Res. Int.* 53, 115–124.
- Nori, M.P., Favaro-Trindade, C.S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J.C., Contreras Castillo, C.J., 2011. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Sci. Technol.* 44, 429–435.

- Nur, M., Ramchandran, L., Vasiljevic, T., 2016. Tragacanth as an oral peptide and protein delivery carrier: Characterization and mucoadhesion. *Carbohydr. Polym.* 143, 223–230.
- Nur, M., Vasiljevic, T., 2017. Can natural polymers assist in delivering insulin orally? *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 889–901.
- Oliveira, A.C., Moretti, T.S., Boschini, C., Baliero, J.C.C., Freitas, O., Favaro-Trindade, C.S., 2007. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *J. Microencapsul.* 24, 685–693.
- Osman, M.E., Williams, P.A., Menzies, A.R., Phillips, G.O., 1993. Characterization of commercial samples of gum arabic. *J. Agric. Food Chem.* 41, 71–77.
- Overbeek, J.T.G., Voorn, M.J., 1957. Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49, 7–26.
- Parthasarathi, S., Anandharamakrishnan, C., 2016. Enhancement of oral bioavailability of vitamin E by spray-freeze drying of whey protein microcapsules. *Food Bioprod. Process.* 100, 469–476.
- Peighambaroust, S.H., Golshan Tafti, A., Hesari, J., 2011. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 22, 215–224.
- Peppas, N.A., Narasimhan, B., 2014. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *J. Controlled Release* 190, 75–81.
- Pereira, H.V.R., Saraiva, K.P., Carvalho, L.M.J., Andrade, L.R., Pedrosa, C., Pierucci, A.P.T.R., 2009. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Res. Int.* 42, 115–121.
- Perrot, C., 1995. Les protéines de pois : de leur fonction dans la graine à leur utilisation en alimentation animale. *INRA Prod. Anim. Paris INRA* 8, 151–164.
- Pierucci, A.P.T.R., Andrade, L.R., Farina, M., Pedrosa, C., Rocha-Leão, M.H.M., 2007. Comparison of alpha-tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *J. Microencapsul.* 24, 201–213.
- Poncelet, D., 2006. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. In: Blitz, J.P., Gun'ko, V.M. (Eds.), *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*. Springer Netherlands, pp. 23–34.
- Quintanilla-Carvajal, M.X., Hernández-Sánchez, H., Alamilla-Beltrán, L., Zepeda-Vallejo, G., Jaramillo-Flores, M.E., de Jesús Perea-Flores, M., Jimenez-Aparicio, A., Gutiérrez-López, G.F., 2014. Effects of microfluidisation process on the amounts and distribution of encapsulated and non-encapsulated α -tocopherol microcapsules obtained by spray drying. *Food Res. Int.*, XVI IUFOST World Congress 63, 2–8.
- Raaijmakers, M.J.T., Benes, N.E., 2016. Current trends in interfacial polymerization chemistry. *Prog. Polym. Sci.* 63, 86–142.
- Rahim, S.N.A., Sulaiman, A., Hamzah, F., Hamid, K.H.K., Rodhi, M.N.M., Musa, M., Edama, N.A., 2013. Enzymes Encapsulation within Calcium Alginate-clay Beads: Characterization and Application for Cassava Slurry Saccharification. *Procedia Eng.* 68, 411–417.
- Ramos, O.L., Pereira, R.N., Rodrigues, R., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., Xavier Malcata, F., 2014. Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. *Food Res. Int.* 66, 344–355.
- Randall, R.C., Phillips, G.O., Williams, P.A., 1989. Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocoll.* 3, 65–75.
- Ranjbar-Mohammadi, M., Bahrami, S.H., 2016. Electrospun curcumin loaded poly(ϵ -caprolactone)/gum tragacanth nanofibers for biomedical application. *Int. J. Biol. Macromol.* 84, 448–456.
- Raoufi, N., Kadkhodaei, R., Phillips, G.O., Fang, Y., Najafi, M.N., 2016. Characterisation of whey protein isolate-gum tragacanth electrostatic interactions in aqueous solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51, 1220–1227.
- Reboul, E., 2017. Vitamin E Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants* 6, 95.

- Rehm, B.H.A., Valla, S., 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 281–288.
- Renard, D., Lavenant-Gourgeon, L., Ralet, M.-C., Sanchez, C., 2006. *Acacia senegal* Gum: Continuum of Molecular Species Differing by Their Protein to Sugar Ratio, Molecular Weight, and Charges. *Biomacromolecules* 7, 2637–2649.
- Richard, J., Benoit, J.P., 2000. Microencapsulation. *Tech. Ing.* 1–20.
- Rojas-Moreno, S., Osorio-Revilla, G., Gallardo-Velázquez, T., Cárdenas-Bailón, F., Meza-Márquez, G., 2018. Effect of the cross-linking agent and drying method on encapsulation efficiency of orange essential oil by complex coacervation using whey protein isolate with different polysaccharides. *J. Microencapsul.* 35, 165–180.
- Rutz, J.K., Zambiasi, R.C., Borges, C.D., Krumreich, F.D., da Luz, S.R., Hartwig, N., da Rosa, C.G., 2013. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. *Carbohydr. Polym.* 98, 1256–1265.
- Saffari, M.M., Farzi, M., Emam-Djomeh, Z., Moini, S., Mohammadifar, M.A., 2013. Applying Iranian Gum Tragacanth to Improve Textural Properties of Maltodextrin Microcapsules: Applying Iranian Gum Tragacanth for Microcapsules. *J. Texture Stud.* 44, 12–20.
- Salama, R., Traini, D., Chan, H., Young, P., 2008. Preparation and characterisation of controlled release co-spray dried drug–polymer microparticles for inhalation 2: Evaluation of in vitro release profiling methodologies for controlled release respiratory aerosols. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 145–152.
- Saldanha do Carmo, C., Maia, C., Poejo, J., Lychko, I., Gamito, P., Nogueira, I., Bronze, M.R., Serra, A.T., Duarte, C.M.M., 2017. Microencapsulation of α -tocopherol with zein and β -cyclodextrin using spray drying for colour stability and shelf-life improvement of fruit beverages. *RSC Adv.* 7, 32065–32075.
- Saldeen, K., Saldeen, T., 2005. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutr. Res.* 25, 877–889.
- Sanchez, C., Despond, S., Schmitt, C., Hardy, J., 2001. Effect of heat and shear on B-lactoglobulin-acacia gum complex coacervation. In: Dickinson, E., Miller, R. (Eds.), *Food Colloids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 332–342.
- Santos, M.B., dos Santos, C.H.C., de Carvalho, M.G., de Carvalho, C.W.P., Garcia-Rojas, E.E., 2019. Physicochemical, thermal and rheological properties of synthesized carboxymethyl tara gum (*Caesalpinia spinosa*). *Int. J. Biol. Macromol.* 134, 595–603.
- Schmitt, C., 2000. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between β -lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocoll.* 14, 403–413.
- Selamat, S.N., Mohamad, S.N.H., Muhamad, I.I., Khairuddin, N., Md Lazim, N.A., 2018. Characterization of Spray-Dried Palm Oil Vitamin E Concentrate. *Arab. J. Sci. Eng.* 43, 6165–6169.
- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., Huang, Q., 2018. Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *Int. J. Biol. Macromol.* 107, 1800–1810.
- Shahidi, F., Han, X., 1993. Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33, 501–547.
- Sheu, T.-Y., Rosenberg, M., 1998. Microstructure of Microcapsules Consisting of Whey Proteins and Carbohydrates. *J. Food Sci.* 63, 491–494.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2012. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J. Controlled Release* 161, 351–362.
- Silva, C., Torres, M.D., Chenlo, F., Moreira, R., 2017. Rheology of aqueous mixtures of tragacanth and guar gums: Effects of temperature and polymer ratio. *Food Hydrocoll.* 69, 293–300.
- Silva, C.M., Ribeiro, A.J., Figueiredo, I.V., Gonçalves, A.R., Veiga, F., 2006. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *Int. J. Pharm.* 311, 1–10.

- Silva, P.T. da, Fries, L.L.M., Menezes, C.R. de, Holkem, A.T., Schwan, C.L., Wigmann, É.F., Bastos, J. de O., Silva, C. de B. da, 2014. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciênc. Rural* 44, 1304–1311.
- Singh, J., Kaur, K., Kumar, P., 2018. Optimizing microencapsulation of α -tocopherol with pectin and sodium alginate. *J. Food Sci. Technol.* 55, 3625–3631.
- Singh, M.N., Hemant, K.S.Y., Ram, M., Shivakumar, H.G., 2010. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Res. Pharm. Sci.* 5, 65–77.
- Singh, O.N., Burgess, D.J., 1989. Characterization of Albumin-Alginic Acid Complex Coacervation. *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 670–673.
- Singh, S., 2018. Functional Food Ingredients Market worth 94.21 billion USD by 2023.
- Singh, S., Rao, K.V.R., Venugopal, K., Manikandan, R., 2002. Alteration in dissolution characteristics of gelatin-containing formulations. A reviews of the problem, test methods and solution. *Pharm. Technol.* 26, 36–58.
- Siow, L.-F., 2012. Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation. *J. Food Process. Technol.* 04.
- Strauss, G., Gibson, S.M., 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocoll.* 18, 81–89.
- Sudhakar, Y., Kuotsu, K., Bandyopadhyay, A.K., 2006. Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs. *J. Controlled Release* 114, 15–40.
- Syrbe, A., Bauer, W.J., Klostermeyer, H., 1998. Polymer Science Concepts in Dairy Systems—an Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction. *Int. Dairy J.* 8, 179–193.
- Tabernero, A., Martín del Valle, E.M., Galán, M.A., 2012. Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 60, 9–25.
- Tainaka, K., 1979. Study of Complex Coacervation in Low Concentration by Virial Expansion Method. I. Salt Free Systems. *J. Phys. Soc. Jpn.* 46, 1899–1906.
- Tainaka, K.-I., 1980. Effect of counterions on complex coacervation. *Biopolymers* 19, 1289–1298.
- Tamm, F., Herbst, S., Brodkorb, A., Drusch, S., 2016. Functional properties of pea protein hydrolysates in emulsions and spray-dried microcapsules. *Food Hydrocoll.* 58, 204–214.
- Tarigan, J.Br., Kaban, J., Zulmi, R., 2018. Microencapsulation of vitamin e from palm fatty acid distillate with galactomannan and gum acacia using spray drying method. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 309, 012095.
- 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.
- Tello, F., Prata, A.S., Rodrigues, R.A.F., Sartoratto, A., Grosso, C.R.F., 2016. Improving the performance of transglutaminase-crosslinked microparticles for enteric delivery. *Food Res. Int.* 88, 153–158.
- Teunou, E., Poncelet, D., 2002. Batch and continuous fluid bed coating – review and state of the art. *J. Food Eng.* 53, 325–340.
- Thakur, D., Jain, A., Ghoshal, G., Shivhare, U.S., Katore, O.P., 2017. Microencapsulation of β -Carotene Based on Casein/Guar Gum Blend Using Zeta Potential-Yield Stress Phenomenon: an Approach to Enhance Photo-stability and Retention of Functionality. *AAPS PharmSciTech* 18, 1447–1459.
- Timilsena, Y.P., Adhikari, R., Barrow, C.J., Adhikari, B., 2016. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 347–357.
- Timilsena, Y.P., Akanbi, T.O., Khalid, N., Adhikari, B., Barrow, C.J., 2019. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 121, 1276–1286.

- Tiwari, R., Takhistov, P., 2012. Nanotechnology-Enabled Delivery Systems for Food Functionalization and Fortification. In: Padua, G.W., Wang, Q. (Eds.), *Nanotechnology Research Methods for Foods and Bioproducts*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 55–101.
- Tolstoguzov, V.B., 1986. Functional properties of protein-polysaccharide mixtures. *Funct. Prop. Food Macromol. Elsevier Appl. Sci. Publ.* 385–415.
- Tzitzikas, E.N., Vincken, J.-P., de Groot, J., Gruppen, H., Visser, R.G.F., 2006. Genetic variation in pea seed globulin composition. *J. Agric. Food Chem.* 54, 425–433.
- Varankovich, N., Martinez, M.F., Nickerson, M.T., Korber, D.R., 2017. Survival of probiotics in pea protein-alginate microcapsules with or without chitosan coating during storage and in a simulated gastrointestinal environment. *Food Sci. Biotechnol.* 26, 189–194.
- Vargas, S.A., Delgado-Macuil, R.J., Ruiz-Espinosa, H., Rojas-López, M., Amador-Espejo, G.G., 2021. High-intensity ultrasound pretreatment influence on whey protein isolate and its use on complex coacervation with kappa carrageenan: Evaluation of selected functional properties. *Ultrason. Sonochem.* 70, 105340.
- Veis, A., Aranyi, C., 1960. Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. *J. Phys. Chem.* 64, 1203–1210.
- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K.-H., Kim, S.-K., 2015. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 269–281.
- Vergari, F., Tibuzzi, A., Basile, G., 2010. An Overview of the Functional Food Market: From Marketing Issues and Commercial Players to Future Demand from Life in Space. In: Giardi, M.T., Rea, G., Berra, B. (Eds.), *Bio-Farms for Nutraceuticals*. Springer US, Boston, MA, pp. 308–321.
- Vervaet, C., Baert, L., Remon, J.P., 1995. Extrusion-spheronisation A literature review. *Int. J. Pharm.* 116, 131–146.
- Volić, M., Pajić-Lijaković, I., Djordjević, V., Knežević-Jugović, Z., Pećinar, I., Stevanović-Dajić, Z., Veljović, Đ., Hadnadjev, M., Bugarski, B., 2018. Alginate/soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. *Carbohydr. Polym.* 200, 15–24.
- Walton, D.E., Mumford, C.J., 1999. The Morphology of Spray-Dried Particles. *Chem. Eng. Res. Des.* 77, 442–460.
- Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z., Li, D., 2011. Effect of Secondary Structure determined by FTIR Spectra on Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate. *Procedia Eng.* 15, 4819–4827.
- Wang, J., Nickerson, M.T., Low, N.H., Van Kessel, A.G., 2016. Efficacy of pea protein isolate–alginate encapsulation on viability of a probiotic bacterium in the porcine digestive tract. *Can. J. Anim. Sci.* 214–222.
- Wang, L., Cao, Y., Zhang, K., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O., 2015. Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between κ -carrageenan and gelatin. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 482, 604–610.
- Warnakulasuriya, S., Pillai, P.K.S., Stone, A.K., Nickerson, M.T., 2018. Effect of the degree of esterification and blockiness on the complex coacervation of pea protein isolate and commercial pectic polysaccharides. *Food Chem.* 264, 180–188.
- Warnakulasuriya, S.N., Nickerson, M.T., 2018. Review on plant protein-polysaccharide complex coacervation, and the functionality and applicability of formed complexes: Review on plant protein-polysaccharide complex coacervation. *J. Sci. Food Agric.* 98, 5559–5571.
- Wei, Y., Cai, Z., Wu, M., Guo, Y., Tao, R., Li, R., Wang, P., Ma, A., Zhang, H., 2020. Comparative studies on the stabilization of pea protein dispersions by using various polysaccharides. *Food Hydrocoll.* 98, 105233.
- 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., Minor, M., de Kruif, C.G., 2004. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. *J. Microencapsul.* 21, 667–679.

- Wong, S.W., Yu, B., Curran, P., Zhou, W., 2009. Characterising the release of flavour compounds from chewing gum through HS-SPME analysis and mathematical modelling. *Food Chem.* 114, 852–858.
- Wu, Q.-X., Yao, S.-J., 2013. Novel NaCS–CS–PPS microcapsules as a potential enzyme-triggered release carrier for highly-loading 5-ASA. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 109, 147–153.
- Wu, Y., Ding, W., He, Q., 2017. Molecular characteristics of tara galactomannans: Effect of degradation with hydrogen peroxide. *Int. J. Food Prop.* 20, 3014–3022.
- Wu, Y., Ding, W., He, Q., 2018. The gelation properties of tara gum blended with κ -carrageenan or xanthan. *Food Hydrocoll.* 77, 764–771.
- Xie, Y., Wang, A., Lu, Q., Hui, M., 2010. The effects of rheological properties of wall materials on morphology and particle size distribution of microcapsule. *Czech J. Food Sci.* 28, 433–439.
- Yeo, Y., Bellas, E., Firestone, W., Langer, R., Kohane, D.S., 2005. Complex Coacervates for Thermally Sensitive Controlled Release of Flavor Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7518–7525.
- Yi, J., Huang, H., Liu, Y., Lu, Y., Fan, Y., Zhang, Y., 2020. Fabrication of curcumin-loaded pea protein-pectin ternary complex for the stabilization and delivery of β -carotene emulsions. *Food Chem.* 313, 126118.

Etude de la coacervation complexe de biopolymères d'origine végétale pour l'élaboration de systèmes d'encapsulation à libération contrôlée d'actifs lipophiles

Résumé :

Ce travail de thèse repose sur l'étude de la coacervation complexe entre des biopolymères d'origine végétale (protéines de pois et polysaccharides chargés) appliquée à la microencapsulation et le relargage contrôlé d'un actif liposoluble (α -tocophérol). Les systèmes d'encapsulation ont été formulés à partir de quatre couples de protéines-polysaccharides d'origine végétale : les protéines de pois associées à la gomme adragante, la gomme arabique, l'alginate de sodium et la gomme tara. Dans une première partie est décrite l'influence de la nature du polysaccharide (chargé négativement ou non) sur le comportement en phase associative du couple protéine-polysaccharide ainsi que les facteurs physico-chimiques optimaux (pH, ratio) favorisant la coacervation complexe du couple. Les paramètres optimaux ont ainsi été déterminés pour chacun des couples. La seconde partie s'est concentrée sur la formulation de microsphères permettant l'encapsulation de l' α -tocophérol à partir d'une matrice composée des coacervats complexes étudiés précédemment. Cette partie fait l'objet dans un premier temps d'une étude sur l'influence du couple protéine-polysaccharide et de ces facteurs sur la qualité de l'encapsulation de l'actif émulsionné. Dans un second temps, l'influence du couple protéine-polysaccharide des solutions séchées par atomisation est étudiée sur la formation des microsphères, leurs propriétés de surface et la libération de l' α -tocophérol dans des milieux de digestion simulés. Le potentiel gastroprotecteur de la gomme adragante en association avec les protéines de pois a été mis en évidence en fonction du ratio utilisé. Une évolution du comportement de relargage de l'actif des microsphères en fonction du rapport protéine/polysaccharide a également été observée. Ce travail a permis une meilleure compréhension des mécanismes permettant la formation de coacervats complexes à partir de biopolymères d'origine végétale et leur capacité à encapsuler et libérer de manière contrôlée une substance active.

Mots-clés : Protéines végétales, Polysaccharides, Coacervation complexe, Interactions électrostatiques, α -tocophérol, Emulsion, Séchage par atomisation, MEB, Relargage

Study of the complex coacervation of plant biopolymers for the development of encapsulation systems with controlled release of a lipophilic active ingredient

Abstract:

This work is based on the study of the complex coacervation of plant biopolymers applied to microencapsulation for the controlled release of a lipophilic active ingredient (α -tocopherol). The encapsulation systems were formulated through four plant-based protein/polysaccharides couples: pea proteins associated with respectively tragacanth gum, gum arabic, sodium alginate and tara gum. The first part describes the influence of the polysaccharide features (negatively charged or not) on their behavior in the associative phase, as well as the optimal physicochemical factors (pH, ratio) promoting the complex coacervation of the couple. The second part focuses on the formulation of microspheres allowing the encapsulation of α -tocopherol from a matrix composed of the different combinations of the complex coacervates studied previously. To begin with, the effects of the protein-polysaccharide couple and the physicochemical factors on the encapsulation quality of the emulsified active ingredient were studied in solution. Then, the solutions were spray-dried to study the formation of microspheres, their surface properties and the release of α -tocopherol in simulated digestion media. The gastroprotective potential of tragacanth gum in combination with pea proteins has been established at given ratios. An evolution of the release behavior of microencapsulated α -tocopherol according to the protein/polysaccharide ratio was also observed. This work has enabled a better understanding of the mechanisms allowing the formation of complex coacervates from plant biopolymers, and their ability to encapsulate and release an active substance in a controlled manner.

Keywords: Plant proteins, Polysaccharides, Complex coacervation, Electrostatic interactions, α -tocopherol, Emulsion, Spray drying, SEM, Release

