UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE

Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Année 2011

 N° attribué par la bibliothèque

					1

Construction raisonnée d'interfaces pour protéger les lipides émulsionnés contre l'oxydation

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences Agroalimentaires Spécialité : Biochimie

> *Présentée et soutenue publiquement par*

Claire BERTON

Le 21 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

PrésidentM. Jean-Marie Bard, Professeur, Université de NantesRapporteursM. Fernando Leal Calderon, Professeur, ENSCBP, BordeauxM. Olivier Dangles, Professeur, Université d'AvignonExaminateursMme Marie-Elisabeth Cuvelier, Ingénieur de recherche, AgroParisTech, Massy
Mme Karin Schwarz, Professeur, Université de Kiel, Allemagne

Directrice de thèse : Mme Claude Genot, Directrice de recherche, INRA, Nantes Co-encadrante : Mme Marie-Hélène Ropers, Chargée de recherche, INRA, Nantes

UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE

Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Année 2011

 N° attribué par la bibliothèque

					1

Construction raisonnée d'interfaces pour protéger les lipides émulsionnés contre l'oxydation

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences Agroalimentaires Spécialité : Biochimie

> *Présentée et soutenue publiquement par*

Claire BERTON

Le 21 octobre 2011, devant le jury ci-dessous

PrésidentM. Jean-Marie Bard, Professeur, Université de NantesRapporteursM. Fernando Leal Calderon, Professeur, ENSCBP, BordeauxM. Olivier Dangles, Professeur, Université d'AvignonExaminateursMme Marie-Elisabeth Cuvelier, Ingénieur de recherche, AgroParisTech, Massy
Mme Karin Schwarz, Professeur, Université de Kiel, Allemagne

Directrice de thèse : Mme Claude Genot, Directrice de recherche, INRA, Nantes Co-encadrante : Mme Marie-Hélène Ropers, Chargée de recherche, INRA, Nantes

Remerciements

Au cours de ces trois ans, on m'a régulièrement demandé si j'avais commencé à écrire mes remerciements de thèse, question à laquelle je répondais invariablement par la négative. En vérité, si rien encore n'était écrit au sens propre du terme, cela faisait longtemps que je pensais aux lignes qui vont suivre, et au travers desquelles j'espère retranscrire ma reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont entourée et aidée au cours de ces trois ans.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'avoir établi une discussion intéressante et constructive lors de ce moment important qu'est l'exercice de la soutenance. Ainsi, je remercie Monsieur Jean-Marie Bard, président du jury, ainsi que Monsieur Fernando Leal Calderon et Monsieur Olivier Dangles, rapporteurs de cette thèse, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit. Je remercie également Madame Marie-Elisabeth Cuvelier et Madame Karin Schwarz, examinatrices.

Mes remerciements vont également à Monsieur Jacques Guéguen et Monsieur Marc Anton, respectivement directeur de l'unité Biopolymères Interactions Assemblages et responsable de l'équipe Interfaces et Systèmes Dispersés, structures au sein desquelles j'ai été accueillie pendant ces trois ans. Marc, je te remercie également pour ton intérêt pour mon travail, tes conseils et ton aide dans ma préparation de l'« après-thèse ».

Bien sûr, je tiens à remercier tout particulièrement Madame Claude Genot, directrice de cette thèse, et Madame Marie-Hélène Ropers, co-encadrante. Merci à toutes deux pour votre accueil, votre encadrement au quotidien, votre disponibilité, nos discussions scientifiques. Grâce à vous, j'ai réellement vécu cette thèse comme une formation à la recherche, par la recherche. Merci aussi pour les bons moments passés au sein du laboratoire mais aussi à Grenade ou à Cincinnati !

Au cours de ces trois ans passés à l'INRA, vous êtes nombreux et nombreuses à m'avoir accueillie, entourée et à avoir contribué à l'aboutissement de ce travail. Aussi, je tiens tout d'abord à remercier les personnes qui m'ont aidée à mener à bien la réalisation de la partie expérimentale de ce projet, avec bonne humeur, gentillesse, motivation et rigueur : merci à Dominique Guibert pour son aide précieuse dans la réalisation des expériences de fluorimétrie et d'étude des films interfaciaux, à Michèle Viau pour son implication dans l'ensemble des mesures liées à l'oxydation des lipides, à Véronique Solé pour sa persévérance dans la réalisation des expériences d'électrophorèses. Dominique, Michèle, Véronique, merci aussi de votre écoute et de vos encouragements dans les moments un peu difficiles... Un grand merci aussi à Cédric Gaillard qui m'a fait découvrir l'AFM et a toujours répondu présent à mes (nombreuses) sollicitations ! Je remercie aussi Michèle Dalgalarrondo pour ses conseils judicieux en matière d'étude des protéines, et Dominique Bertrand qui nous a aidées dans le traitement des données et nous a ainsi permis d'apporter un éclairage nouveau à certains de nos résultats expérimentaux. Je tiens aussi à remercier Valérie Beaumal et Elisabeth David-Briand pour leurs conseils, leur gentillesse et leur disponibilité. Enfin, je remercie aussi Dominique L'Hostis qui m'a beaucoup aidée dans la gestion de ma bibliographie.

Durant cette thèse, j'ai aussi eu la chance de participer à l'encadrement de Nadège Wicker et Quentin Pottiez, venus découvrir le monde de la recherche au travers d'un stage à l'INRA. Pour ma part, cette expérience a été enrichissante à la fois sur les plans professionnel et humain, et je tiens à les remercier pour leur motivation et la qualité de leur travail.

Enfin, un grand merci également à Lucie Ribourg qui a toujours été disponible pour m'initier au fonctionnement de différents appareils du laboratoire, et qui a surveillé régulièrement et avec vigilance mon « taux de tocophérols » !

Lucie, à toi ainsi qu'à Bérénice, je vous adresse un immense merci pour votre amitié et votre soutien sans faille pendant ces trois ans ; merci les filles de m'avoir rendue « plus belle la vie » ! Vous allez vraiment me manquer, j'attendrai avec impatience nos retrouvailles outre Atlantique ! Vous serez toujours les bienvenues alors surtout, n'hésitez pas !

Je ne peux écrire ces lignes sans avoir une pensée pour les autres personnes de l'équipe ISD : je souhaite notamment remercier Anne Meynier pour nos discussions scientifiques toujours agréables et constructives, mais aussi pour son humour et sa gentillesse. Je remercie également Alain Riaublanc pour ses conseils judicieux, ainsi que Patricia, Geneviève, Jean-Paul, Catherine et Oscar.

Je tiens bien entendu à remercier tout particulièrement mes « colocataires de bureau », Caroline et Jean-Marc, pour leur bonne humeur et l'ambiance agréable qui en a résulté ; merci beaucoup à Bruno qui y a aussi fortement contribué ! Bruno, cela a été un plaisir que d'être ta voisine de bureau et je te remercie pour ta disponibilité et ton humour percutant mais jamais péremptoire !

Merci aussi à tous les doctorants, stagiaires et jeunes chercheurs que j'ai eu la chance de croiser pendant ces trois années. Et tout d'abord, un grand merci à Mathieu qui m'a toujours écoutée dans mes périodes d'enthousiasme ou de doute ; merci à mon *alter ego* Claire pour tous les bons moments partagés et en attendant de nouvelles aventures... Merci à Saliha pour ta bonne humeur et ton rire communicatif, à Pauline et Anne-Laure qui ont réalisé leur thèse durant ces trois mêmes années... Et merci aussi à Agustin, Axelle, Bénédicte, Carole, Cécile, Céline, Chloé, Christelle, Christian, Fabien, Floriane, Hernan, Jean-Luc, Jocya, Judith, Julie, Maëlla, Mélanie, Pierre, Sandrine, Sonia, Tin-hinan, Valérie et Ying.

Enfin, merci à toutes les autres personnes qui, par leur sympathie, ont contribué à rendre ma vie à l'INRA agréable : je pense notamment à Marlène, Sylvaine, Chantal, Maryse et Nadine.

A l'issue de ces trois ans, je souhaite également remercier de nombreuses personnes que j'ai eu la chance de rencontrer en dehors de l'INRA de Nantes. En premier lieu, j'ai une pensée particulière pour Françoise Leroi et Maud Cansell qui m'ont fait découvrir et apprécier le travail en laboratoire de recherche, il y a déjà quelques années.

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres de mon comité de thèse : Christian Sanchez, Claire Dufour, Véronique Vié et Khadija Ougerram. Ces réunions régulières m'ont permis de faire le point, de prendre du recul par rapport à mon travail et de bénéficier de leurs commentaires et conseils constructifs.

Je tiens aussi à remercier Chantal Houée-Levin et Filippo Rusconi, du Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris-Sud 11, pour leurs conseils et leur aide dans l'étude des modifications des protéines.

Je remercie également Philippe Courcoux, d'ONIRIS, qui nous a conseillées de façon tout à fait judicieuse en matière d'ajustement mathématique de nos données expérimentales. Ce projet de thèse m'a par ailleurs permis de participer à différents colloques et congrès, au cours desquels j'ai eu la chance de bénéficier des commentaires et conseils de nombreux chercheurs, parmi lesquels je souhaite notamment remercier Charlotte Jacobsen, Julian McClements et Christophe Schmitt.

Au cours de cette thèse, j'ai également eu la chance d'exercer une activité d'enseignement à l'IUT d'Angers, et je remercie à cet effet mes collègues de l'IUT qui m'ont accueillie avec gentillesse et bonne humeur ! J'ai notamment une pensée particulière pour Sophie Fagot, responsable des TP de biochimie, qui m'a beaucoup aidée dans la préparation des séances. Merci aussi à Christine Megneaud pour ses conseils et nos fréquentes discussions.

Enfin, c'est avec émotion que je remercie du fond du cœur ma famille et mes proches... Ainsi, je tiens à remercier Catherine, Agnès, Malie, Eric, Sylvie, Diane, Marie, Jacqueline, Philippe et Alexandre. Merci Daddy pour tes discours inoubliables sur les oméga 3... et pour tout.

Papa, Maman, Pierre, François, je vous adresse un immense merci pour votre soutien, votre confiance, vos encouragements.

Steve, merci d'avoir toujours été là ; merci pour ta patience et ton soutien dans les moments de doute durant ces trois années chargées en évènements... mais aussi pour tous les merveilleux moments partagés et à venir...

Communications scientifiques

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont été valorisés au travers des publications et communications suivantes :

Publications

Berton, C., Genot, C., Viau, M., Ribourg, L., Ropers, M.H. "Controlled design of oil-in-water emulsions enables to investigate the effect of the structure of the interfacial layer on lipid oxidation", *Congrès Mondial de l'Emulsion (CME)* $5^{ème}$ édition, **2010**, Proceedings.

Berton, C., Genot, C., Ropers, M.H. "Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions", *Journal of Colloid and Interface Science*, **2011**, 354, (2), 739-748.

Berton, C., Ropers, M.H., Viau, M., Genot, C. "Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, (9), 5052-5061.

Berton, C., Ropers, M.H., Bertrand, D., Viau, M., Genot, C. "Oxidative stability of oil-inwater emulsions stabilized with protein or surfactant emulsifiers in various oxidation conditions", *Food Chemistry*, sous presse (doi : 10.1016/j.foodchem.2011.09.137).

Berton, C., Ropers, M.H., Guibert, D., Solé, V., Genot, C. "Modifications of interfacial proteins in oil-in-water emulsions prior to and during lipid oxidation", soumis à *Free Radical Biology and Medicine*.

Berton, C., Genot, C., Guibert, D., Ropers, M.H. "Effect of the structural heterogeneity of mixed surfactant-stabilized interfaces on lipid oxidation in oil-in-water emulsions", en cours de rédaction pour soumission à *Journal of Colloid and Interface Science*.

Berton, C., Genot, C., Gaillard C., Guibert, D., Ropers, M.H. "Effect of structural modifications of protein-stabilized interfaces on lipid oxidation in oil-in-water emulsions", en cours de rédaction pour soumission à *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Berton, C., Genot, C., Ropers, M.H. "Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer", en cours de rédaction pour soumission à *Progress in Lipid Research*.

Communications orales

<u>Berton, C.</u>, Viau, M., Genot, C., Ropers, M.H. **Mars 2010**, *Congrès Food Colloids*, Grenade (Espagne), "Controlled design of oil-in-water emulsions enables to investigate the effect of the composition of the interfacial layer on lipid oxidation".

<u>Berton, C.</u>, Genot, C., Viau, M., Ribourg, L., Ropers, M.H. **Octobre 2010**, *Congrès Mondial de l'Emulsion (CME)* $5^{\acute{e}me}$ *édition*, Lyon (69), "Controlled design of oil-in-water emulsions enables to investigate the effect of the structure of the interfacial layer on lipid oxidation".

Berton, C., Ropers, M.H., Guibert, D., Viau, M., <u>Genot, C.</u> Novembre 2010, δ^{eme} Congrès *Euro Fed Lipid*, Munich (Allemagne), "Controlled design of oil-in-water emulsions enables to investigate the relationship between interface and lipid oxidation".

<u>Berton, C.</u>, Ropers, M.H., Guibert, D., Viau, M., Genot, C. **Décembre 2010**, *Congrès Biopolymères*', Le Croisic (44), "Adsorbed biopolymers do not protect oil-in-water emulsions against oxidation".

<u>Berton, C.</u>, Ropers, M.H., Genot, C. **Mai 2011**, 102^{ime} Congrès de l'AOCS, Cincinnati (Etats-Unis), "Protein-stabilized interfaces do not protect emulsified lipids against oxidation in comparison with surfactant-stabilized interfaces".

Berton, C., Genot, C., Guibert, D., Viau, M., <u>Ropers, M.H.</u> Juin 2011, *Cinquièmes Rencontres de Biologie-Physique du Grand Ouest*, Rennes (35), "Contrôler la structure de la couche interfaciale : un facteur clé dans la protection des émulsions huile dans eau contre l'oxydation lipidique".

Présentation de posters

Berton, C., Viau, M., Ribourg, L., <u>Genot, C.</u>, Ropers, M.H. **Octobre 2009**, 7^{ème} Congrès Euro *Fed Lipid*, Graz (Autriche), "Quantification of nonionic surfactants solubilized in the aqueous phase of emulsions after transesterification with boron fluoride-methanol".

<u>Berton, C.</u>, Genot, C., Viau, M., Ribourg, L., Ropers, M.H. **Octobre 2010**, *Congrès Mondial de l'Emulsion (CME)* $5^{\grave{e}me}$ *édition*, Lyon (69), "Controlled design of oil-in-water emulsions enables to investigate the effect of the structure of the interfacial layer on lipid oxidation".

Berton, C., <u>Ropers, M.H.</u>, Genot, C. Avril 2011, δ^{eme} Symposium Technique International du CIGR, Nantes (44), "Lipid oxidation in rapeseed-oil based food matrices: new formulation insights".

<u>Berton, C.</u>, Ropers, M.H., Guibert, D., Pottiez, Q., Genot, C. **Mai 2011**, *102^{ème} Congrès de l'AOCS*, Cincinnati (Etats-Unis), "Influence of the oxidation catalyst on the oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized with protein and surfactant emulsifiers".

Avant-propos

L'unité Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA) de l'INRA de Nantes axe ses recherches sur les facteurs déterminant la qualité des produits alimentaires et non alimentaires issus de l'agriculture. Les objectifs des travaux de recherche menés au sein de l'unité sont de maîtriser la variabilité des matières premières et des produits transformés, et de maîtriser la qualité des aliments en intégrant les recommandations nutritionnelles actuelles, notamment dans la conception même des aliments. Au sein de cette unité, les objectifs de l'équipe Interfaces et Systèmes Dispersés (ISD) sont de comprendre les propriétés des assemblages de biopolymères dans des systèmes dispersés se présentant sous forme de matrices hydratées complexes, gélifiées ou non : des émulsions, des émulsions foisonnées et des mousses. La compréhension des structures des molécules impliquées et de leur niveau d'assemblage dans les conditions physico-chimiques du milieu permet de maîtriser la stabilité physique et chimique des systèmes dispersés, de contrôler la dynamique, la réactivité et la libération de micro/nano constituants d'intérêt et de concevoir des nano-objets présentant de nouvelles fonctionnalités en s'inspirant d'assemblages naturels.

Dans ce contexte global, ce projet de thèse avait pour but d'élaborer une nouvelle stratégie de maîtrise de l'oxydation des lipides dans les matrices alimentaires, en précisant les caractéristiques physico-chimiques des films interfaciaux (composition, structure, organisation, homogénéité, etc.) qui permettraient le mieux de protéger contre l'oxydation des lipides alimentaires riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) dispersés sous forme d'émulsions huile dans eau (H/E). Ce projet a fait l'objet d'un co-financement par l'INRA et la région Pays de la Loire.

Ce manuscrit est en partie constitué de publications et de projets de publications rédigés en anglais. Un projet d'article de synthèse est présenté dans la section 'Etude bibliographique' et six articles de recherche acceptés, soumis ou en projet sont présentés dans la section 'Résultats et discussion'. Au sein de chaque article, une numérotation indépendante est utilisée pour les titres, figures, tableaux et équations.

Table des matières

Introduction générale	1
Etude bibliographique	5
1. L'oxydation des lipides – Aspects généraux	5
 1.1. Initiation ou amorçage de l'oxydation des lipides 1.1.1. Auto-oxydation et température 1.1.2. Initiation par les ions métalliques 1.1.3. Initiation par la myoglobine 1.1.4. Initiation par les azo-initiateurs 1.1.5. Autres mécanismes possibles de l'initiation de l'oxydation 	7 7 8 10 12 13
1.2. Propagation de l'oxydation des lipides	13
1.3. Réactions de terminaison	13
 1.4. Formation et décomposition des hydroperoxydes : synthèse comparative des ca l'acide linoléique (n-6) et de l'acide α-linolénique (n-3) 1.4.1. Formation des hydroperoxydes	as de 14 14 15 17
 1.6. Conséquences de l'oxydation des lipides sur les protéines 1.6.1. Réactions entre les protéines et les radicaux libres 1.6.2. Réactions entre les protéines et les hydroperoxydes 1.6.3. Réactions entre les protéines et les aldéhydes 	18 20 21 21
2. Les émulsions et les interfaces	23
 2.1. Emulsions 2.1.1. Emulsification 2.1.2. Mécanismes de déstabilisation des émulsions 2.1.3. Stabilisation des émulsions 2.1.4. Etude des interfaces in situ 	23 23 25 27 28
 2.2. Interfaces modèles 2.2.1. Activité de surface des émulsifiants 2.2.2. Mécanismes d'adsorption aux interfaces des émulsifiants hydrosolubles 2.2.3. Etude de l'activité de surface des émulsifiants hydrophobes 2.2.4. Méthodes de caractérisation physique des interfaces 	30 30 31 34 35
3. Rôle de l'interface sur l'oxydation des lipides dans les émulsions (pr d'article de synthèse)	rojet 37

Démarche adoptée	75
Matériel et méthodes	79
1. Matières premières et réactifs	79
1.1. Huile de colza purifiée	79
1.2. Eau et solutions tampons	
 1.3. Emulsifiants 1.3.1. Protéines 1.3.2. Tensioactifs ou émulsifiants moléculaires 	
1.4. Initiateurs d'oxydation	
2. Préparation et caractérisation physico-chimique des émulsions	90
 2.1. Préparation des émulsions 2.1.1. Préparation des solutions d'émulsifiants 2.1.2. Emulsification 	90 90 91
2.2. Conditions d'incubation des émulsions	
 2.3. Caractérisation physique des émulsions	
3. Mesure de l'oxydation des émulsions	100
3.1. Mesure de la consommation d'oxygène	100
 3.2. Méthodes de mesure de l'oxydation des lipides 3.2.1. Formation des diènes conjugués	101 101 101 103
 3.3. Evaluation de l'altération des protéines	104 104 105 106 107
4. Etude des films interfaciaux impliqués dans les émulsions	108
 4.1. Préparation de films de Langmuir et établissement d'isothermes de compression 4.2. Prélèvements de films par la technique de Langmuir-Blodgett 4.3. Etude des films par microscopie à force atomique (AFM) 	on 108 110 111
5. Traitement des données	112
5.1. Analyse de variance	
5.2. Ajustement des données d'oxydation et de fluorimétrie	
5.3. Analyse en composantes principales	113

Résultats et discussion115
Introduction
1. Formulation et caractérisation physique des émulsions (Article 1)117
2. Oxydation d'émulsions stabilisées par des protéines ou des tensioactifs 143
 2.2. Etude en présence de fer chélaté de la stabilité oxydative d'émulsions stabilisées par des tensioactifs ou des protéines
 2.3. Généralisation de l'effet protecteur des tensioactifs contre l'oxydation des lipides dans des conditions d'incubation variées
3. Modifications des protéines dans les émulsions au cours de l'oxydation 197
3.1. Modifications des protéines interfaciales au cours de l'oxydation d'émulsions huile dans eau (Article 4)
3.2. Test de consommation d'oxygène dans les solutions aqueuses de protéines
4. Modulation de la structure de l'interface : conséquences sur l'oxydation des émulsions et caractérisation des films interfaciaux impliqués
4.1. Effet de l'hétérogénéité structurale d'interfaces mixtes tensioactif/tensioactif sur l'oxydation des lipides en émulsion (Article 5)
4.2. Effet de la modulation de la structure d'interfaces protéiques sur l'oxydation des lipides en émulsion (Article 6)
5. Synthèse de la démarche scientifique et des résultats majeurs
Conclusion générale et perspectives
Références bibliographiques
Annexes

Introduction générale

L'enrichissement de certains produits alimentaires en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 constitue une réponse aux apports alimentaires insuffisants actuellement observés pour une partie importante de la population (Astorg et al., 2006; Combe, 2002). Cependant, ces nouvelles formulations représentent un défi pour les industriels du secteur agroalimentaire, dans la mesure où les AGPI sont particulièrement sensibles à l'oxydation.

La première conséquence de l'oxydation des lipides est l'altération des propriétés organoleptiques des aliments. En effet, certains composés volatils issus de l'oxydation sont des molécules odorantes qui conduisent à la perception d'arômes désagréables très caractéristiques (Frankel, 1985; Grosch, 1982; Villière & Genot, 2006; Villière et al., 2007). Ces composés odorants sont perçus à des stades précoces de l'oxydation des lipides, rendant le produit non acceptable pour les consommateurs. L'oxydation des lipides dans les aliments peut également induire des modifications de coloration (oxydation de pigments) et de texture (oxydation des protéines). Sur le plan nutritionnel, l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires ne conduit généralement pas à une diminution significative de la teneur en acides linoléique (LA, C18:2 n-6) et α-linolénique (ALA, C18:3 n-3), présents en quantité importante dans les aliments. En revanche, une proportion conséquente des acides gras très insaturés tels que l'acide eicosapentaenoïque (EPA, C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3), présents à des teneurs faibles dans les aliments, peut être dégradée au cours de l'oxydation des lipides (Prior, 2003). Hormis les réactions impliquant uniquement les lipides, les radicaux libres et les aldéhydes formés au cours de l'oxydation des lipides entraînent l'altération d'autres molécules présentes dans les systèmes, comme les antioxydants et les protéines (Genot et al., 2003; Pokorny, 2003), ce qui peut aussi conduire à une diminution de la valeur nutritionnelle des aliments. La toxicité de certains composés issus de l'oxydation des lipides est également suspectée (Riemersma, 2002). Celle des hydroperoxydes et des radicaux libres formés lors des premières étapes de la réaction est avérée (Kanazawa et al., 2002; Ursini et al., 1998). Celle des produits secondaires tels que les hydroxyalkénals, notamment le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) et le 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE), qui peuvent former des adduits avec des résidus d'acides aminés, se traduirait par des dysfonctionnements hépatiques (Petersen & Doorn, 2004), et serait impliquée dans la maladie d'Alzeimer (Liu et al., 2003; Long et al., 2008).

Face à ces enjeux, l'industrie a mis en place des stratégies permettant de préserver la qualité nutritionnelle et organoleptique des produits contenant des AGPI. Les méthodes classiquement mises en œuvre consistent à conserver les produits sous atmosphère protectrice et/ou à ajouter des antioxydants dans les formulations. Cependant, les solutions adoptées sont souvent largement empiriques, peu optimisées en termes qualitatifs et quantitatifs, et surtout non prédictives. Elles ne conviennent pas non plus à toutes les conditions d'utilisation ou de conservation des produits, en particulier lors de leur utilisation domestique. Pour mieux maîtriser le phénomène d'oxydation dans toutes les conditions d'utilisation des aliments formulés, il est donc nécessaire de mieux comprendre son déroulement en fonction de la nature, des propriétés physico-chimiques et de la structure des aliments concernés. Les matrices alimentaires sont en général des milieux dispersés complexes. Les émulsions huile dans eau (H/E) sont couramment employées en tant que matrices alimentaires modèles. Dans ces systèmes, l'interface, zone de contact entre les lipides et la phase aqueuse, est stabilisée par des émulsifiants (protéines, polysaccharides, phospholipides ou tensioactifs) (Dickinson, 1992; McClements, 2005). Elle peut aussi intégrer des composés tels que des antioxydants (Gunaseelan et al., 2006). L'interface, lieu de contact entre les différentes phases en présence et entre de nombreux réactants, est considérée comme le siège de l'initiation de l'oxydation des lipides et constitue une zone critique du système (Genot et al., 2003; Waraho et al., 2011b). De nombreux travaux réalisés sur des émulsions modèles ont montré que la nature de l'émulsifiant modifie la cinétique d'oxydation des lipides (Fomuso et al., 2002a; Haahr & Jacobsen, 2008; Kiokias et al., 2006; Osborn & Akoh, 2004). Ces différences d'oxydabilité ont souvent été attribuées aux différences de composition et de structure des interfaces impliquées. Cependant, aucune étude n'a formellement relié l'oxydation d'émulsions et les caractéristiques des interfaces impliquées.

L'objectif de cette thèse était de montrer que la structure de l'interface entre l'huile et la phase aqueuse peut être maîtrisée de façon à protéger les lipides en émulsion contre l'oxydation. Pour atteindre notre objectif, deux échelles d'étude, les émulsions et les interfaces planes, ont été considérées. Notre analyse approfondie de la littérature concernant les facteurs influençant l'oxydation des lipides en émulsion, et en particulier ceux relatifs à l'interface, est présentée dans la section 'Etude bibliographique'. La première étape de ce projet, décrite en première partie de la section 'Résultats et discussion', a consisté à formuler des émulsions modèles constituées d'ingrédients alimentaires et caractérisées par la présence de quantités minimales d'émulsifiants résiduels en phase aqueuse. Les émulsifiants choisis appartenaient aux deux principales classes d'émulsifiants alimentaires : les protéines et les tensioactifs. Utilisés seuls ou en mélanges, et pour les protéines, à l'état natif, dénaturé ou agrégé, ils ont permis de moduler les caractéristiques physico-chimiques des interfaces impliquées. Par la suite, les cinétiques d'oxydation de ces émulsions ont été suivies en évaluant les différents stades de l'oxydation des lipides (deuxième partie de la section 'Résultats et discussion') ainsi que les modifications subies par les protéines (troisième partie de la section 'Résultats et discussion'). Enfin, les interfaces des émulsions dans lesquelles la modulation de la composition en émulsifiants influençait notablement le développement de l'oxydation ont été reconstruites sur des films plans. Leur homogénéité en termes de structure ou de répartition des émulsions correspondantes (quatrième partie de la section 'Résultats et discussion'). La cinquième et dernière partie de cette section reprend de manière synthétique l'ensemble de cette démarche, les principaux résultats obtenus et leur discussion ; les principales conclusions de cette étude sont finalement rassemblées dans la conclusion générale dans laquelle des perspectives et applications possibles de cette thèse sont proposées.

Etude bibliographique

1. L'oxydation des lipides – Aspects généraux

L'oxydation des lipides provoque une perte des qualités nutritionnelles et organoleptiques de produits alimentaires. C'est un phénomène chimique, spontané, évolutif et irréversible qui se caractérise par l'attaque des acides gras insaturés portés par les molécules lipidiques, par l'oxygène atmosphérique. Cette réaction, qui peut être appelée rancissement oxydatif des acides gras, implique :

- Un substrat : les acides gras insaturés, se trouvant généralement estérifiés au sein des triglycérides et des phospholipides qui sont les principales classes de lipides alimentaires.

- Un réactif : l'oxygène de l'air.

- Des catalyseurs (enzymes pro-oxydantes), des initiateurs (générateurs de radicaux libres, ions métalliques, radicaux libres déjà présents dans la matrice), des sources d'énergie facilitant la production des radicaux libres et autres espèces réactives de l'oxygène (température, lumière).

L'oxydation des lipides consiste en un ensemble de réactions radicalaires en chaîne classiquement décomposées en trois étapes principales : amorçage ou initiation, propagation et terminaison. Ces trois étapes ont généralement été décrites comme se déroulant successivement, impliquant un ordre d'apparition précis des composés d'oxydation. Néanmoins, des travaux suggèrent que le phasage de ces différentes étapes est probablement plus complexe, et que certains composés d'oxydation, dits secondaires, pourraient en réalité apparaître dès les premières étapes de l'oxydation des lipides, simultanément avec les composés d'oxydation dits primaires (Figure 1) (Schaich, 2005).



Figure 1. Schéma général de l'oxydation des lipides se déroulant *via* des réactions multiples et simultanées : une alternative à l'abstraction d'hydrogène sur les acides gras insaturés en tant qu'étape pré-requise de la réaction, d'après Schaich (2005).

Cette vision du phénomène d'oxydation implique notamment que certains produits réactionnels comme les composés volatils puissent en réalité se former indépendamment des hydroperoxydes, classiquement considérés comme des produits intermédiaires incontournables. Bien que cette approche originale semble en cohérence avec certaines observations expérimentales, nous décrirons dans ce manuscrit, pour des raisons de clarté, successivement les étapes d'initiation, de propagation et de terminaison de l'oxydation des lipides classiquement décrites dans la littérature (Frankel, 2005; Pokorny, 2003).

1.1. Initiation ou amorçage de l'oxydation des lipides

L'initiation ou amorçage de l'oxydation des lipides consiste en la formation de radicaux libres par rupture homolytique d'un atome d'hydrogène adjacent à une double liaison allylique :

 $LH \rightarrow L^{\bullet} + H$ (1) L'oxydation des lipides peut être favorisée par différentes conditions environnementales, aboutissant à la formation de composés radicalaires et de produits primaires d'oxydation des lipides par différentes voies chimiques ou enzymatiques. Dans la présente étude bibliographique, nous nous sommes focalisés sur les mécanismes chimiques (auto-oxydation) de l'initiation de l'oxydation des lipides. En effet, une partie expérimentale de ce projet de thèse a porté sur l'influence du mode d'initiation de l'auto-oxydation sur la stabilité oxydative d'émulsions H/E.

1.1.1. Auto-oxydation et température

L'auto-oxydation est la réaction directe de l'oxygène moléculaire (oxygène triplet ${}^{3}O_{2}$) avec des produits organiques en l'absence de lumière. Dans le cas des lipides, la présence d'initiateurs, tels que des traces métalliques, des composés radicalaires ou des hydroperoxydes préexistants, est nécessaire pour vaincre la barrière de spin entre les molécules lipidiques et l'oxygène triplet. En effet, l'oxygène triplet ne se fixe pas directement sur un composé lipidique natif, mais sur un composé radicalaire (Frankel, 2005).

La température est l'un des facteurs principaux régissant l'oxydation des lipides car elle favorise les réactions endothermiques impliquées dans la formation et la décomposition des hydroperoxydes. La vitesse d'oxydation augmente de façon exponentielle avec la température. En l'absence d'antioxydants, l'énergie d'activation de l'oxydation des lipides est d'environ 18 kcal mol⁻¹ (Frankel, 2005).

La décomposition thermique des hydroperoxydes peut théoriquement se produire *via* deux réactions (Frankel, 2005) :

- La rupture homolytique de la liaison O-O :

 $LOOH \rightarrow LO^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$ (2)

Cependant, cette réaction est peu favorable thermodynamiquement car elle nécessite une énergie d'activation élevée.

- La production de radicaux libres par réaction entre deux molécules d'hydroperoxydes :

 $2 \operatorname{LOOH} \to \operatorname{LO}^{\bullet} + \operatorname{H}_2\operatorname{O} + \operatorname{LOO}^{\bullet}$ (3)

En l'absence de métaux, la réaction (3) est plus favorable d'un point de vue énergétique.

1.1.2. Initiation par les ions métalliques

Les ions des métaux de transition comme le fer, le cuivre, le cobalt, le manganèse ou le nickel sont des initiateurs efficaces de l'oxydation des lipides. Ces ions métalliques peuvent être naturellement présents dans les matrices alimentaires et les systèmes biologiques et sont actifs même présents à l'état de traces (Frankel, 2005; Pokorny, 1987). Leur efficacité en fait des initiateurs largement utilisés pour accélérer l'oxydation des lipides dans des systèmes modèles. A cet effet, le fer est le métal le plus largement utilisé dans la littérature (Chaiyasit et al., 2000; Donnelly et al., 1998; Fomuso et al., 2002b; Guzun-Cojocaru et al., 2011; Haahr & Jacobsen, 2008; Mei et al., 1998b; Ponginebbi et al., 1999; Shimada et al., 1994; Silvestre et al., 2000; Sirendi et al., 1998). D'autres métaux, comme le cuivre, sont également mais plus rarement utilisés (Fomuso et al., 2002b; Osborn-Barnes & Akoh, 2003).

Selon les mécanismes généralement proposés, les ions métalliques peuvent provoquer la formation d'espèces radicalaires par deux voies :

- L'attaque directe des acides gras insaturés :

 $M^{(n+1)} + LH \rightarrow M^{n+} + L^{\bullet} + H^{+}$ (4)

Cette réaction implique l'ion métallique dans son état de valence le plus élevé et conduit à la formation d'un radical alkyle (L^{\bullet}).

- La décomposition homolytique des hydroperoxydes :

 $M^{n} + LOOH \rightarrow M^{(n+1)} + LO^{\bullet} + OH^{-}$ (5) $M^{(n+1)} + LOOH \rightarrow M^{n} + LOO^{\bullet} + H^{+}$ (6)

Ces réactions nécessitent que les ions métalliques soient présents dans deux états de valence avec un potentiel rédox approprié. La réaction (5) est généralement plus rapide que la réaction (6) et le métal est principalement converti vers son état le plus oxydé, ce qui implique que la vitesse de la réaction en chaîne dépend de la réaction (5).

La Figure 2 schématise les principales voies de formation de radicaux lipidiques en présence du fer dans ses deux états principaux de valence.



Figure 2. Représentation schématique de l'oxydation des lipides initiée par du fer.

Il a été mis en évidence, notamment dans le cas du fer (Minotti & Aust, 1992), que l'activité pro-oxydante des métaux est optimale lorsque les deux états de valence coexistent. La présence simultanée de fer ferreux (Fe^{2+}) et de fer ferrique (Fe^{3+}) peut être obtenue en ajoutant des composés réducteurs tels que l'acide ascorbique ou son sel dans des concentrations faibles (Buettner & Jurkiewicz, 1996; Cheng & Li, 2007; Halliwell, 1996; Minotti & Aust, 1992). Ceci permet de régénérer les ions Fe^{2+} à partir de la forme oxydée Fe^{3+} :

 $Fe^{3+} + ascorbate \rightarrow Fe^{2+} + ascorbate^{\bullet}$ (7)

Une autre voie consiste à utiliser le fer en présence d'agents chélatants tels que l'acide tétraacétique d'éthylène diamine (EDTA) qui favorisent l'oxydation des ions Fe²⁺ en présence d'oxygène (Gambardella et al., 2005; Mahoney & Graf, 1986; Minotti & Aust, 1992; Samokyszyn et al., 1990) :

 $O_2 + 4Fe^{2+}(EDTA) + 2H_2O \rightarrow 4Fe^{3+}(EDTA) + 4OH^-$ (8)

Ces études ont montré que, comme dans le cas des agents réducteurs, l'efficacité prooxydante du complexe dépend majoritairement du rapport molaire entre le métal et l'agent chélatant. Ainsi, dans le cas du complexe Fe²⁺/EDTA, un rapport équimolaire conduit à une oxydation du fer et à une initiation efficace de l'oxydation des lipides. En revanche, lorsque la molarité de l'EDTA est 20 fois supérieure à celle du fer, l'auto-oxydation du fer est encore plus importante mais l'activité d'initiation de l'oxydation des lipides est très fortement diminuée.

1.1.3. Initiation par la myoglobine

Certains composés héminiques présents naturellement dans des aliments tels que la viande, sont reconnus pour leur activité pro-oxydante élevée par rapport à celle des ions ferreux ou ferriques. Ainsi, à température ambiante et à pH neutre, l'efficacité de la myoglobine à décomposer des hydroperoxydes d'acide linoléique est 14 fois plus importante que celle d'un mélange Fe^{3+} /ascorbate et 80 fois plus importante que celle des ions Fe^{2+} (Frankel, 2005; O'Brien, 1969).

La myoglobine existe dans différents états de valence (Figure 3a). La metmyoglobine (MetMb), qui fixe une molécule d'eau sur l'un des sites de coordination du fer héminique, (Figure 3b), est la forme impliquée dans l'oxydation des lipides alimentaires.



Figure 3. Mécanismes de conversion entre les différents états de valence de la myoglobine (a) et représentation schématique de la metmyoglobine (MetMb) avec une molécule d'eau liée au fer héminique (b) (Baron & Andersen, 2002).

Le mécanisme par lequel la MetMb est impliquée dans l'initiation de l'oxydation des lipides est encore aujourd'hui sujet à controverse. Pour rédiger ce paragraphe, nous nous sommes principalement inspirés des travaux de Baron & Andersen (2002), Carlsen et al. (2005) et Lorrain et al. (2010a). A pH neutre ou physiologique, la MetMb doit être activée par la présence d'hydroperoxydes ou d'espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène pour être un pro-oxydant efficace. Un mécanisme similaire à celui de la réaction de Fenton a d'ailleurs été proposé (Figure 4a). Cette réaction, thermodynamiquement favorable, entraîne la formation d'un radical hydroxyle. L'oxydation de la MetMb en fer

hypervalent (ferrylmyoglobine) se produit par réaction avec des hydroperoxydes préalablement formés (Figure 4b). Cette réaction implique le transfert d'un électron et d'un atome d'oxygène (notés O⁻) de l'hydroperoxyde vers le groupement héminique. Lorsque le pH est plus faible (5,5 à 6,5), l'activité pro-oxydante de la MetMb serait plus importante.



Figure 4. Mécanismes généraux d'initiation de l'oxydation des lipides par la myoglobine dans différents états de valence : réaction MbFe^{III}/MbFe^{III} dite de type Fenton (a) et réaction MbFe^{III}/MbFe^{IV} (b) (Carlsen et al., 2005).

Un mécanisme radicalaire impliquant une forme intermédiaire de MetMb oxydée par perte d'un électron a été récemment proposé (Figure 5) (Lorrain et al., 2010a). D'après ce mécanisme, la MetMb réagirait rapidement avec un hydroperoxyde (LOOH) pour former une molécule L=O, une espèce oxydée par perte d'un électron (par exemple, un radical hydroperoxyle) et une nouvelle molécule héminique (MetMb oxydée par perte d'un électron, notée MbFe^{III} -1e⁻). Cette espèce pourrait à son tour oxyder une seconde molécule d'hydroperoxyde en radical LOO[•] en régénérant la MetMb.



Figure 5. Mécanisme radicalaire de décomposition des hydroperoxydes par la MetMb impliquant un intermédiaire de MetMb oxydée par perte d'un électron (Lorrain et al., 2010a).

Ainsi, les mécanismes par lesquels la myoglobine, notamment dans son état de valence MbFe^{III} ou MetMb, initie l'oxydation des lipides, ne sont pas totalement élucidés. Les facteurs environnementaux tels que le pH du milieu, la température et la présence d'espèces réactives

de l'oxygène ou d'hydroperoxydes pré-existants semblent être déterminants dans l'initiation de l'oxydation par cette forme de fer.

1.1.4. Initiation par les azo-initiateurs

Les azo-initiateurs sont des composés thermolabiles générateurs de radicaux utilisés dans de nombreuses études de l'oxydation des lipides *in vitro* dans divers systèmes tels que des micelles, des liposomes, des cellules ou des lipoprotéines (Culbertson & Porter, 2000; Gotoh et al., 2010; Kubouchi et al., 2002; Mosca et al., 2010; Yokozawa et al., 2000). Ces composés produisent des radicaux libres avec une vitesse constante et facilement estimable (Frankel, 2005; Hanlon & Seybert, 1997). Le mécanisme d'oxydation des lipides par les azo-initiateurs communément admis est le suivant :

 $RN=NR \rightarrow 2R^{\bullet} + N_2$ (9) $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ (10)

 $\text{ROO}^{\bullet} + \text{LH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{L}^{\bullet}$ (11)

La réaction (10) est très rapide pour la plupart des radicaux carbonés, avec une constante de vitesse de l'ordre de 10^9 1 mol⁻¹ s⁻¹. Les radicaux peroxyle (ROO[•]) sont généralement considérés comme les espèces responsables de l'abstraction d'atomes d'hydrogène aux lipides insaturés (Hanlon & Seybert, 1997). Cependant, la diffusion spatiale des radicaux peroxyle peut être ralentie par l'établissement d'interactions avec les molécules du solvant, ce qui peut favoriser des recombinaisons entre espèces radicalaires (Frankel, 2005).

Dans des systèmes modèles, la vitesse d'initiation (R_i) est généralement mesurée en déterminant la phase de latence (τ) observée en présence d'un antioxydant (AH) ayant un facteur stoechiométrique connu noté *n*, ce facteur étant défini comme le nombre de radicaux piégés par chaque molécule d'antioxydant.

$$\mathbf{R}_{\mathrm{i}} = n \left[\mathrm{AH} \right] / \tau \tag{12}$$

Cependant, si les azo-initiateurs sont très utilisés dans des systèmes modèles simples, leur efficacité peut être fortement affectée par la complexité structurale des systèmes dispersés et par la nature et la viscosité du solvant. D'un point de vue mécanistique, il est intéressant de noter que, contrairement aux ions métalliques, les azo-initiateurs provoquent la formation de radicaux peroxyle et, par voie de conséquence, d'hydroperoxydes, mais ne provoquent pas la décomposition de ces hydroperoxydes. Ainsi, les azo-initiateurs ne sont pas les initiateurs les plus pertinents pour étudier l'oxydation des lipides dans des matrices alimentaires ou

biologiques, qui contiennent naturellement des traces de métaux et d'hydroperoxydes. La molécule la plus souvent utilisée parmi les azo-initiateurs est le 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH), qui est une molécule hydrophile. Les études nécessitant plutôt un initiateur liposoluble utilisent en général le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (AMVN).

1.1.5. Autres mécanismes possibles de l'initiation de l'oxydation

D'autres mécanismes de l'initiation de l'oxydation des lipides sont décrits dans la littérature. On peut citer tout d'abord la photo-oxydation, qui se produit dans les matrices exposées à la lumière visible et ultraviolette. En présence d'un photosensibilisateur, l'énergie lumineuse convertit l'oxygène triplet (³O₂) en oxygène singulet (¹O₂), qui peut réagir directement sur les doubles liaisons insaturées des chaînes grasses. L'oxydation enzymatique est également un mécanisme courant de l'oxydation des lipides, notamment *in situ* dans les tissus animaux et végétaux. Les enzymes impliquées sont les lipoxygénases et les cycloxygénases. Elles contiennent du fer dans leur site actif et attaquent les AGPI, notamment des séries n-3 et n-6 (Pokorny, 2003).

1.2. Propagation de l'oxydation des lipides

La propagation de l'oxydation lipidique s'effectue par un enchaînement de réactions radicalaires. Les radicaux alkyle L[•] produits lors de l'étape d'initiation réagissent avec l'oxygène triplet pour former des radicaux peroxyle LOO[•] (réaction 13). Ces radicaux peuvent à leur tour arracher un hydrogène à d'autres acides gras insaturés (réaction 14), formant un hydroperoxyde LOOH et un nouveau radical alkyle. La réaction radicalaire en chaîne est ainsi engagée.

 $L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$ (13) $LOO^{\bullet} + L'H \rightarrow LOOH + L'^{\bullet}$ (14)

1.3. Réactions de terminaison

Lorsque les radicaux peroxyle s'accumulent en quantité suffisante, ils peuvent interagir entre eux et se recombiner pour former des espèces non radicalaires :

 $LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow espèces non radicalaires$ (15)

Un intermédiaire tétroxyde instable pourrait également se former puis se décomposer selon le mécanisme dit de Russel, conduisant à la formation non seulement d'espèces non radicalaires mais aussi de dioxygène :

 $LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow [LOOOOL] \rightarrow espèces non radicalaires + O_2$ (16)

D'autres recombinaisons impliquant des radicaux peroxyle, alkoxyle et alkyle peuvent également conduire à la formation d'espèces non radicalaires.

1.4. Formation et décomposition des hydroperoxydes : synthèse comparative des cas de l'acide linoléique (n-6) et de l'acide α -linolénique (n-3)

1.4.1. Formation des hydroperoxydes

Les acides linoléique et α -linolénique présentent respectivement une et deux fonctions bisallyliques dans leur chaîne grasse insaturée, ce qui est favorable à l'arrachement d'un atome d'hydrogène (Frankel, 2005).

Dans le cas de l'acide linoléique (C18:2 n-6), l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le carbone 11 conduit à la formation d'un radical délocalisé pentadiényle (Figure 6a). La réaction d'oxygène avec ce radical, au niveau des carbones 9 ou 13, conduit à la formation d'un mélange de deux hydroperoxydes conjugués, chacun présentant deux isomères *cis, trans* et *trans, trans* :

- 9-hydroperoxy-trans-10, cis-12-octadécadiénoate (cis, trans-9-OOH)
- 9-hydroperoxy-trans-10, trans-12- octadécadiénoate (trans, trans-9-OOH)
- 13-hydroperoxy-cis-9, trans-11- octadécadiénoate (cis, trans-13-OOH)
- 13-hydroperoxy-trans-9, trans-11- octadécadiénoate (trans, trans-13-OOH)

Dans le cas de l'acide α -linolénique (C18:3 n-3), deux radicaux délocalisés pentadiényle sont formés par arrachement d'un atome d'hydrogène sur les carbones 11 et 14 (Figure 6b). La fixation d'oxygène sur les carbones 9 et 13 ou 12 et 16, respectivement, conduit à la formation d'un mélange d'hydroperoxydes conjugués contenant tous une double liaison isolée en configuration *cis* :

- 9-hydroperoxy-trans-10, cis-12, cis-15-octadécatriénoate (trans, cis, cis-9-OOH)
- 13-hydroperoxy-cis-9, trans-11, cis-15-octadécatriénoate (cis, trans, cis-13-OOH)
- 12-hydroperoxy-cis-9, trans-13, cis-15-octadécatriénoate (cis,trans,cis-12-OOH)
- 16-hydroperoxy-cis-9, cis-12, trans-14-octadécatriénoate (cis, cis, trans-16-OOH)



Figure 6. Mécanismes de formation d'hydroperoxydes à partir de l'acide linoléique (a) et de l'acide α -linolénique (b), adaptés de Frankel (2005).

1.4.2. Décomposition des hydroperoxydes et produits secondaires formés

La décomposition des hydroperoxydes implique des réactions radicalaires et conduit à la formation de produits non radicalaires, volatils ou non (Genot et al., 2003). La réaction débute par une rupture homolytique conduisant à la formation d'un radical alkoxyle (RO^{\bullet}) et d'un radical hydroxyle (O^{\bullet}), et se poursuit par la rupture de la chaîne grasse en une position adjacente au radical alkoxyle, soit une β -scission. La nature des produits formés dépend de la nature de la chaîne grasse impliquée et de la position à laquelle la β -scission a lieu (Figure 7) (Frankel, 2005).



Figure 7. Mécanisme de décomposition des hydroperoxydes, d'après Frankel (2005).

Le Tableau I présente les principaux produits volatils issus de l'oxydation de l'acide linoléique et de l'acide α -linolénique. Ces composés volatils ont un impact important sur la qualité sensorielle des produits alimentaires (Genot et al., 2003).

Tableau I. Principaux composés volatils produits lors de l'oxydation des acides linoléique ou α -linolénique (Genot et al., 2003).

	Acides gras polyinsaturés			
	Acide linoléique (C18:2 n-6)	Acide α -linolénique (C18:3 n-3)		
	Pentane	Propanal		
	Pentanal	2-propenal		
	Hexanal	2-butenal		
Composés volatils issus de l'oxydation	2-heptenal	1-penten-3-ol		
	2-octenal	1-penten-3-one		
	1-octen-3-ol	2-pentenal		
	1-octen-3-one	2-penten-1-ol		
	2,3-octanedione	3-hexenal		
	2,4-décadiénal	2-hexenal		
	2-pentylfuranne	2,4-hexadiénal		
		2,4-heptadiénal		
		1,5-octadien-3-ol		
		1,5-octadien-3-one		
		2,6-nonadiénal		
		2-éthylfuranne		

1.5. Aspect cinétique de l'oxydation des lipides

La Figure 8 représente schématiquement l'évolution cinétique des substrats et des produits d'oxydation des lipides classiquement proposée, même si nous avons précédemment évoqué le fait que certains auteurs remettent en cause ce phasage. D'après ce schéma, on peut distinguer plusieurs étapes :

- La phase de latence pendant laquelle aucune apparition de produits d'oxydation n'est détectée. On constate cependant une disparition progressive des antioxydants et la formation de radicaux libres en quantités faibles.

- La disparition progressive des substrats de l'oxydation des lipides : acides gras insaturés et oxygène.

- La formation de produits primaires d'oxydation tels que les hydroperoxydes et leur décomposition simultanée.

- La formation de produits secondaires, parmi lesquels les composés volatils d'oxydation.

La durée de la phase d'initiation dépend de nombreux facteurs comme la quantité d'antioxydants initialement présents dans la matrice, la présence de traces pro-oxydantes ou de catalyseurs d'oxydation, l'état physique de la phase lipidique, etc.



Temps d'oxydation

Figure 8. Représentation schématique de l'évolution cinétique des marqueurs de l'oxydation des lipides (Labuza, 1971).

Du fait de la complexité de la réaction d'oxydation des lipides, il est nécessaire de coupler plusieurs méthodes de mesure pour caractériser de façon fiable l'état d'oxydation d'un échantillon. De nombreuses méthodes existent et ont été largement décrites et comparées en termes de sensibilité, de précision, de niveau d'information apportée (Frankel, 1998; Frankel, 2005), mais aussi de facilité de mise en œuvre. D'un point de vue cinétique, on peut regrouper les méthodes d'analyse de l'oxydation des lipides en trois principaux groupes : les méthodes permettant de mesurer une disparition des substrats d'oxydation (antioxydants, acides gras insaturés et oxygène) ; les méthodes permettant de mesurer l'apparition des produits primaires d'oxydation lipidique (hydroperoxydes, diènes conjugués) ; et les méthodes permettant de mesurer l'apparition des produits secondaires d'oxydation des lipides (composés volatils, aldéhydes).

Cette représentation schématique du phénomène d'oxydation des lipides met en évidence l'implication de composés non lipidiques comme les antioxydants; dans des matrices complexes, d'autres composés tels que les protéines peuvent également subir des modifications liées à l'oxydation des lipides, comme développé dans le paragraphe suivant.

1.6. Conséquences de l'oxydation des lipides sur les protéines

Au delà des conséquences nutritionnelles et organoleptiques décrites ci-avant, l'oxydation des lipides dans les systèmes complexes s'accompagne de réactions impliquant d'autres molécules d'intérêt nutritionnel et/ou fonctionnel, telles que les protéines. D'après le schéma général proposé par Schaich (2008), les produits d'oxydation des lipides pouvant potentiellement réagir avec les protéines sont :

- Les radicaux peroxyle et alkoxyle, qui peuvent transférer leur radical à la chaîne peptidique et conduire à diverses modifications telles que des réticulations des polymérisations ou encore des scissions.

- Les hydroperoxydes.

- Les époxydes, qui forment des adduits avec les protéines.

- Les aldéhydes, qui sont impliqués dans diverses réactions menant à la formation d'adduits et aboutissent à des réticulations, la formation de composés fluorescents, et sont responsables de brunissements.

En conditions oxydantes, particulièrement en présence de métaux, des groupements carbonyles peuvent se former sur les chaînes latérales des résidus prolyle, arginyle, lysyle et thréonyle (Figure 9). La formation de groupements carbonyles peut aussi se produire lors de réactions des résidus d'acides aminés nucléophiles (cystéine, histidine, lysine) avec des aldéhydes provenant de l'oxydation des lipides (Dalle-Donne et al., 2003; Nyström, 2005).



Figure 9. Représentation schématique de la formation d'un groupement carbonyle à partir de la chaîne latérale d'un résidu arginyle en conditions oxydantes, adapté de Nyström (2003).

Les protéines peuvent également subir des réactions de polymérisation ou de réticulation conduisant à la formation de produits de très hauts poids moléculaires et à une forte diminution de leur solubilité (Gerrard, 2002; Schaich, 2008). Si la formation de ponts disulfures est un mécanisme majeur de réticulation pour les protéines contenant au moins un groupement cystéyle libre (Figure 10, haut), la formation de dityrosine est également impliquée (Figure 10, bas). Ce mécanisme fait intervenir deux radicaux phénoxyle tyrosyle intermédiaires (Lund et al., 2011). D'autres propriétés des protéines, telles que leur conformation et leur hydrophobicité, sont également modifiées au cours de l'oxydation (Schaich, 2008).



Figure 10. Représentation schématique de la formation d'un pont disulfure à partir de résidus cystéyle (haut) et de la formation d'une dityrosine à partir de résidus tyrosyle (bas), en conditions oxydantes, adapté de Lund et al. (2011).

Si les mécanismes et conséquences des réactions des produits d'oxydation des lipides avec les protéines ont fait l'objet de nombreux travaux, certaines études posent la question du phasage entre ces deux phénomènes, et évoquent la possibilité d'un transfert des réactions radicalaires des protéines vers les lipides aussi bien que l'inverse (Lund et al., 2011; Viljanen et al., 2004). Il a notamment été montré que la mise en présence de radicaux d'albumine de sérum bovin (SAB) préalablement formés et d'acide linoléique provoquait une formation significative d'hydroperoxydes d'acide linoléique (Ostdal et al., 2002).

1.6.1. Réactions entre les protéines et les radicaux libres

Dans les matrices complexes, les protéines peuvent être attaquées par des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou des radicaux lipidiques déjà formés. De par la nature variée des résidus d'acides aminés, un grand nombre de radicaux peut être formé lors de l'attaque radicalaire des protéines ou des peptides. D'après Gardner (1979), les processus radicalaires impliqués consistent en une abstraction d'hydrogène suivie d'une β -scission du radical d'acide aminé et/ou d'une addition d'un radical libre. Excepté lorsque l'abstraction d'hydrogène concerne le groupement thiol d'un résidu cystéyle, cette réaction est généralement moins rapide que les réactions d'addition avec les résidus d'acides aminés aromatiques ou soufrés (Hawkins & Davies, 2001). Ainsi, les acides aminés les plus sensibles aux attaques radicalaires sont la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, la cystéine, la méthionine et la lysine (Gardner, 1979). L'abstraction d'hydrogène à un résidu cystéyle (RSH) conduit à la formation
d'un radical thiyle (RS[•]). Les radicaux thiyle peuvent non seulement être à l'origine de la formation de ponts disulfures, conduisant à la réticulation des protéines, mais peuvent aussi s'additionner sur les doubles liaisons des lipides insaturés, propageant l'oxydation (Schaich, 2008). L'abstraction d'hydrogène par des radicaux libres concernerait ensuite préférentiellement les sites adjacents aux groupements permettant une délocalisation d'électrons, c'est-à-dire les groupements hydroxyle (résidus séryle et thréonyle), carboxyle et amide (résidus asparagyle, glutamyle, acide glutamique et acide aspartique) et le groupement guanidine de l'arginine. Le carbone en α du groupement amine des résidus lysyle peut également subir une abstraction d'hydrogène.

1.6.2. Réactions entre les protéines et les hydroperoxydes

La décomposition des hydroperoxydes conduit à la formation de radicaux LO[•] et LOO[•], qui peuvent réagir avec les acides aminés. Selon Schaich (2008), les hydroperoxydes pourraient former des liaisons hydrogène avec certains sites protéiques et se décomposer ainsi à proximité d'acides aminés cibles. Les protéines pouvant former des interactions avec les lipides, comme la SAB, seraient particulièrement concernées.

1.6.3. Réactions entre les protéines et les aldéhydes

Parmi les nombreux produits secondaires d'oxydation des lipides, les aldéhydes sont les plus réactifs vis à vis des protéines (Genot et al., 2003; Schaich, 2008). Ces composés réagissent avec les groupements thiol, amine et les résidus histidyle portés par les protéines pour former des adduits (bases de Schiff, produits d'addition de Michael, produits cycliques, réticulations intra et intermoléculaires) (Figure 11). Les alkanals sont modérément réactifs ; par contre, les aldéhydes sont d'autant plus réactifs qu'ils sont insaturés ou lorsqu'ils comportent des fonctions augmentant leur caractère électrophile, comme c'est le cas des hydroxyalkénals. Aisni, le 4-hydroxynonénal et le 4-oxononénal peuvent former des adduits covalents avec les acides aminés nucléophiles (cystéine, histidine, lysine et arginine) (Doorn & Petersen, 2003). Il a également été démontré que le *trans*-2-hexenal provoquait une perte de résidus histidyle et lysyle dans différentes protéines laitières en solutions, ainsi qu'une diminution du signal de fluorescence du tryptophane (Meynier et al., 2004). Des modifications covalentes de β -

caséine dans des émulsions en cours d'oxydation ont été mises en évidence, avec une augmentation du poids moléculaire de la protéine de l'ordre de 300 Da (Leaver et al., 1999).



Figure 11. Réactions pouvant être impliquées dans la réticulation des protéines en présence d'aldéhydes, adapté de Genot et al. (2003). Légende : Imine = base de Schiff.

2. Les émulsions et les interfaces

Une émulsion est constituée de deux liquides non miscibles, la phase dispersée étant fractionnée dans la phase continue sous forme de gouttelettes. Les émulsions sont communément différenciées selon la nature de la phase continue et de la phase dispersée. Ainsi, un système constitué de gouttelettes d'huile dispersées dans une phase aqueuse est appelé émulsion huile dans eau (H/E) tandis qu'un système constitué de gouttelettes d'eau dispersées dans une phase grasse est une émulsion eau dans huile (E/H), ce qui est par exemple le cas du beurre ou de la margarine. La zone de contact entre la phase continue et la phase dispersée constitue l'interface. Les émulsions huile dans eau (H/E) sont à la base de nombreux systèmes alimentaires natifs ou formulés tels que le lait, la crème, les vinaigrettes industrielles ou encore la mayonnaise. Elles sont couramment utilisées en tant que systèmes alimentaires modèles. De nombreux ouvrages et articles de synthèse ont été publiés concernant les caractéristiques physico-chimiques de ces systèmes dispersés et celles des interfaces impliquées. Pour rédiger ces paragraphes, nous nous sommes principalement appuyés sur les ouvrages de Dickinson (1992), de McClements (2005), de Birdi (1999) et sur les travaux de Dalgleish (Dalgleish, 1997a; Dalgleish, 1997b).

2.1. Emulsions

2.1.1. Emulsification

Le procédé de préparation d'une émulsion à partir de deux liquides non miscibles est appelé émulsification. Au sein d'une phase liquide, chaque molécule est entourée par des molécules de même nature, la résultante des forces d'attraction intermoléculaires est donc nulle. En revanche, pour les molécules situées à l'interface entre ce liquide et un autre fluide non miscible (liquide ou gaz), la résultante des forces attractives n'est pas nulle, mais orientée vers le volume du premier fluide (Figure 12). Cette force attractive engendre l'existence au niveau de l'interface d'une tension interfaciale ou tension de surface, notée γ (équation 17).

$$\gamma = \frac{\Delta G}{\Delta A} \tag{17}$$

où ΔG est l'énergie libre nécessaire pour augmenter d'une surface ΔA la surface de contact entre les deux phases immiscibles (pour une température et une pression données). La tension de surface γ peut être exprimée en J m⁻² ou en N m⁻¹.



Figure 12. Représentation schématique de molécules dans deux phases fluides immiscibles ou à l'interface (Birdi, 1999). Les flèches représentent les forces d'interaction entre molécules adjacentes.

Lors de la fabrication d'une émulsion, l'augmentation de la surface de contact entre les deux liquides augmente l'entropie (E_I) du système (équation 18), ce qui doit être contrebalancé par un apport en énergie (E_2 , équation 19).

$$E_I = V \frac{kT}{R^3} \phi_{\rm d} \ln(\phi_{\rm d}) \tag{18}$$

$$E_2 = 3V \,\frac{\gamma}{R} \,\phi_{\rm d} \tag{19}$$

où *V* est le volume de la phase dispersée, *k* est la constante de Maxwell-Boltzmann, *T* est la température, *R* est le rayon des gouttelettes, ϕ_d est la fraction de phase dispersée et γ est la tension interfaciale.

Cet apport est réalisé sous la forme d'énergie mécanique. L'émulsification est réalisée grâce à différents dispositifs tels que des sondes à ultrasons, des mixers ou des homogénéisateurs hautes pressions. Les émulsions obtenues ont généralement un profil de taille de gouttelettes hétérogène. Afin de réduire la dispersion des tailles des gouttelettes, une étape supplémentaire d'homogénéisation est nécessaire. Cette fragmentation supplémentaire de la phase dispersée est réalisée suivant une contrainte de cisaillement sous forme d'un écoulement qui peut être laminaire ou turbulent. Différents appareils peuvent être utilisés,

comme les homogénéisateurs haute pression, les mélangeurs rotor/stator, les sondes à ultrasons, les microfluidiseurs, les membranes ou les cellules de Couette. Au cours de ce procédé, la taille des gouttelettes est réduite et l'aire interfaciale augmente.

2.1.2. Mécanismes de déstabilisation des émulsions

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables. En effet, la somme de la contribution entropique E_1 et de la contribution de l'énergie de surface E_2 reste positive. La déstabilisation physique de ces systèmes peut se produire *via* différents mécanismes (Figure 13).



Figure 13. Principaux mécanismes de déstabilisation physique des émulsions, d'après McClements (2005).

Crémage ou sédimentation :

La vitesse de crémage ou de sédimentation (v) est définie selon la loi de Stokes (équation 20) :

$$v = \frac{2\left(\rho_d - \rho_c\right) g R^2}{9 \eta_c} \tag{20}$$

où ρ_d et ρ_c sont les masses volumiques des phases dispersée et continue, respectivement, g est l'accélération de la pesanteur, *R* est le rayon des gouttelettes et η_c est la viscosité de la phase continue. D'après cette équation, il est donc possible de diminuer la vitesse de crémage ou de

sédimentation en diminuant la taille des gouttelettes ou en augmentant la viscosité de la phase continue. Une solution efficace pour éviter ce phénomène consiste à incuber les émulsions sous agitation lente.

Floculation :

Le phénomène de floculation consiste en une agrégation des gouttelettes due à des interactions attractives, les gouttelettes restant toutefois individualisées. La floculation est favorisée par les collisions entre gouttelettes, qui se produisent sous l'effet du mouvement brownien, des forces gravitationnelles et des forces hydrodynamiques. On peut distinguer différents cas de figure conduisant à une floculation des gouttelettes.

La floculation par déplétion est due à la présence d'objets colloïdaux dans la phase continue (polymères, micelles de tensioactifs). Ces objets sont exclus d'une étroite région entourant chaque gouttelette, appelée zone de déplétion, ce qui provoque une différence de potentiel osmotique. Cette différence favorise la migration des molécules de solvant (phase continue) hors de la zone de déplétion pour diminuer le gradient de concentration en objets colloïdaux. Cette migration implique une diminution de la zone de déplétion, permise par l'agrégation de deux gouttelettes. La floculation par déplétion repose donc sur une force osmotique, qui augmente avec la concentration en objets colloïdaux dans la phase continue.

La floculation par ajout de sels est due à l'écrantage des charges électrostatiques portées par les gouttelettes. Ces charges permettent une répulsion électrostatique entre les gouttelettes, empêchant leur floculation. Lorsqu'on ajoute des électrolytes dans l'émulsion, ceux-ci forment des interactions avec les charges de signe opposé portées par les gouttelettes, réduisant ainsi la charge globale des gouttelettes et la barrière énergétique empêchant leur floculation.

La floculation dite par « mauvais solvant » ou par interactions stériques concerne les émulsions stabilisées par des polymères. Généralement, ces émulsifiants peuvent former des couches interfaciales épaisses et induisent une répulsion stérique entre les gouttelettes. Cependant, si les polymères ont peu d'affinité pour le solvant, les interactions polymères-polymères sont plus favorables que les interactions polymères-solvant, ce qui conduit à un rapprochement et une floculation des gouttelettes.

Coalescence :

La coalescence est le processus par lequel deux gouttelettes fusionnent pour former une seule gouttelette plus grosse. Ce phénomène implique une proximité physique des gouttelettes et une rupture du film interfacial stabilisant chaque gouttelette. La coalescence dépend donc fortement des caractéristiques et de la résistance du film interfacial. D'un point de vue cinétique, la coalescence est un processus auto-accéléré car la fréquence de coalescence est liée à la taille des gouttelettes. Ce mécanisme de déstabilisation, qui accélère le crémage, peut conduire, *in fine*, à une séparation totale des phases continue et dispersée.

<u>Mûrissement d'Ostwald</u> :

Le mûrissement d'Ostwald est un processus par lequel les plus grosses gouttelettes grossissent aux dépens des plus petites, et implique le transfert de phase dispersée d'une gouttelette à l'autre *via* la phase continue. C'est donc un phénomène peu rencontré dans les émulsions alimentaires constituées d'une phase aqueuse et d'une phase grasse triglycéridique, la solubilité de ces deux phases l'une dans l'autre étant très faible.

2.1.3. Stabilisation des émulsions

Il est possible, par des stratégies de formulation, de retarder la déstabilisation physique des émulsions et de former ainsi des émulsions métastables, c'est à dire stables physiquement pendant une durée compatible avec leur utilisation. Pour cela, il faut utiliser des agents stabilisants parmi lesquels on distingue deux catégories : les émulsifiants et les texturants.

Les texturants augmentent la viscosité de la phase aqueuse continue, voire forment un gel dans cette même phase, ce qui ralentit le mouvement des gouttelettes. Parmi les texturants alimentaires, on trouve les polysaccharides neutres tels que l'amidon et la cellulose, les polysaccharides chargés tels que la pectine, l'alginate et les carraghénanes, et certaines protéines comme la gélatine.

Les émulsifiants sont des molécules qui présentent une activité de surface et peuvent donc s'adsorber aux interfaces huile/eau au cours de l'homogénéisation, réduisant l'énergie libre du système. On peut séparer les émulsifiants en deux grandes catégories :

Les émulsifiants de faible poids moléculaire :

Ces émulsifiants sont des molécules de petite taille présentant une activité de surface. On les désigne également sous le terme de tensioactifs. Ces molécules sont constituées d'une tête polaire hydrophile ayant une forte affinité pour l'eau et d'une queue hydrophobe ayant une forte affinité pour l'huile. La tête polaire peut être anionique, cationique, zwitterionique ou non ionique. La queue hydrophobe est en général constituée d'une ou plusieurs chaînes

carbonées contenant 10 à 20 atomes de carbone. En fonction de l'importance relative de sa partie hydrophile et de sa partie hydrophobe, un tensioactif sera soluble plutôt dans des milieux aqueux ou des milieux apolaires. Il existe une grande variété de tensioactifs de qualité alimentaire : on peut citer par exemple les lécithines, les esters d'acides gras et de saccharose, d'acide citrique ou d'acide lactique, les mono et diglycérides d'acides gras, les esters d'acides gras et de sorbitane ou de polyoxyéthylène sorbitane.

Les biopolymères amphiphiles :

Cette catégorie d'émulsifiants regroupe deux grands types de biopolymères : les polysaccharides et les protéines. Les polysaccharides amphiphiles tels que la gomme arabique comportent un squelette osidique lié à des unités peptidiques qui lui confèrent des propriétés tensioactives. Les protéines laitières (caséines et protéines du lactosérum) sont très couramment utilisées dans l'industrie agro-alimentaire. Elles comportent des séquences d'acides aminés de même nature (hydrophobes ou hydrophiles) ou des zones flexibles qui permettent de former des parties hydrophiles/hydrophobes homogènes. La β -caséine en est un exemple évident, avec une chaîne peptidique qui peut être assimilée à un polymère dibloc (Douillard et al., 2003) et qui participe activement à la stabilisation d'émulsions (Dickinson, 1997; Fang & Dalgleish, 1993b). En association avec des polysaccharides chargés comme le sulfate de dextran ou les pectines, les protéines peuvent former des couches plus épaisses voire plus rigides à la surface des gouttelettes, ce qui améliore la stabilité physique des émulsions (Grigoriev & Miller, 2009).

L'association des émulsifiants de faible poids moléculaire aux protéines ne permet d'augmenter la stabilité physique des émulsions car les émulsifiants de faible poids moléculaire déplacent les protéines de l'interface (Mackie et al., 2000).

2.1.4. Etude des interfaces in situ

La formation et la stabilisation physique des émulsions dépendent de la structure et de la composition de la couche interfaciale séparant les phases grasse et aqueuse. Caractériser les interfaces dans les émulsions est donc essentiel pour maîtriser la stabilité physique et les propriétés fonctionnelles des émulsions. Pourtant, caractériser les interfaces *in situ* est complexe du fait de la turbidité du milieu, de la faible épaisseur de la couche par rapport aux échelles de mesure des méthodes physico-chimiques courantes et de la potentielle contribution des composés présents dans les phases dispersée et continue. Quelques

techniques analytiques permettent néanmoins de pallier, au moins en partie, ces contraintes. La spectroscopie de fluorescence frontale, par exemple est une méthode adaptée aux milieux turbides ou opaques, permettant de différencier les signaux correspondants aux protéines adsorbées ou non adsorbées in situ dans des émulsions (Granger et al., 2005; Rampon et al., 2003a; Rampon et al., 2003b; Rampon et al., 2001; Rampon et al., 2003c). En effet, les dérivées quatrièmes des spectres montrent des pics d'émission de fluorescence du tryptophane distincts selon la localisation des protéines dans l'émulsion. L'analyse calorimétrique différencielle (DSC) a également été utilisée pour caractériser les phénomènes de transition de phase dans des émulsions, et notamment au niveau de l'interface et/ou en lien avec la composition interfaciale (Arima et al., 2009; Ghosh & Rousseau, 2009; Grande & Carvalho, 2011; Jorgensen et al., 2009; Zhu et al., 2011). L'analyse des thermogrammes permet en effet de mettre en évidence l'influence de composés tensioactifs sur la cristallisation de la phase grasse, ou de détecter des changements de conformation des protéines adsorbées. La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet d'obtenir des informations sur la localisation et la mobilité de certains constituants des émulsions (Barros et al., 2006; Shen et al., 2005). Les changements de conformation des protéines lors de leur adsorption à l'interface dans des émulsions peuvent être mis en évidence par spectroscopie de dichroïsme circulaire (Zhai et al., 2010) ou par des techniques utilisant les rayonnements infrarouges (Jorgensen et al., 2009), qui permettent de détecter des modifications de la structure secondaire des protéines en solution ou en émulsion. L'isolement des interfaces des émulsions peut également être réalisé avant analyse par le lavage de l'émulsion (McClements, 2005). Les gouttelettes lipidiques, de densité inférieure, sont séparées de la phase aqueuse plus dense par centrifugation, récupérées sous forme d'une phase supérieure crémée concentrée et éventuellement redispersées dans le solvant aqueux. Les conditions de centrifugation doivent être bien choisies au regard de l'instabilité des émulsions. De plus, la centrifugation peut générer la formation de flocs qui sont alors difficilement dispersables. Il subsiste néanmoins des doutes quant à l'absence de conséquences du lavage sur les caractéristiques physiques et les équilibres thermodynamiques des émulsions.

Ainsi, si l'étude macroscopique et microscopique des émulsions peut être menée *in situ*, l'analyse détaillée des propriétés de la couche interfaciale à une échelle mésoscopique et moléculaire requiert généralement la reconstruction des films impliqués sur des modèles d'interfaces air/eau ou huile/eau.

2.2. Interfaces modèles

Les interfaces modèles miment des interfaces isolées : il n'y a pas d'interactions à courte ou longue distance entre interfaces. De plus, les géométries mises en œuvre, qu'elles soient planes ou courbes, ont dans tous les cas des rayons de courbure supérieurs au rayon de courbure de la gouttelette dans l'émulsion. En outre, même si l'air et l'huile n'ont pas de propriétés communes, les études à l'interface air/eau sont largement usitées car elles sont expérimentalement beaucoup plus simples à mettre en œuvre. Elles fournissent toutefois des informations pertinentes sur la structure des couches formées (Lu & Rhodes, 2000; Maldonado-Valderrama et al., 2010; Morris & Gunning, 2008). L'objet des paragraphes qui suivent est de fournir les éléments nécessaires à la compréhension des principes physiques régissant l'organisation et la dynamique d'interfaces planes, notamment des interfaces air/eau stabilisées par différents types d'émulsifiants. Ces paragraphes ont été rédigés principalement d'après les ouvrages de Birdi (1999) et de McClements (2005).

2.2.1. Activité de surface des émulsifiants

La tension de surface est le premier paramètre mesuré pour caractériser l'activité interfaciale des émulsifiants. Elle diminue lors de l'adsorption à l'interface de molécules présentant une activité de surface. La diminution de la tension de surface induite par la présence de molécules tensioactives est appelée *pression de surface*, notée π (équation 21).

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \tag{21}$$

où γ_0 est la tension interfaciale à l'interface air/eau ou huile/eau en absence de molécules tensioactives.

La frontière séparant deux phases homogènes non miscibles peut être considérée comme un film de dimension moléculaire présentant une nature dynamique. Le concept de surface séparatrice de Gibbs permet de définir la quantité de molécules présentant une activité de surface pouvant s'adsorber à l'interface (Figure 14). La zone interfaciale est modélisée par une surface séparatrice d'épaisseur nulle. Cette surface séparatrice est localisée au sein du film interfacial de façon à ce que l'excès de surface du solvant seul (par exemple de l'eau pure) soit nul, c'est-à-dire que l'excès de concentration d'un côté de l'interface soit égal au déficit de concentration de l'autre côté de l'interface. L'accumulation de molécules présentant

une activité de surface à l'interface est caractérisée par la *concentration surfacique* ou *excès de surface*, Γ , généralement exprimé(e) en mg m⁻² et défini(e) selon l'équation 22 :

$$\Gamma = \frac{\mathbf{n}_{\mathrm{i}}}{A} \tag{22}$$

où (n_i) est l'excès de concentration des molécules à la surface et A l'aire interfaciale.



Figure 14. Représentation schématique des variations des concentrations en solvant (eau) et en molécules tensioactives de part et d'autre d'une interface air/eau, adaptée de McClements (2005).

2.2.2. Mécanismes d'adsorption aux interfaces des émulsifiants hydrosolubles

Les films formés par diffusion des molécules de la phase aqueuse vers l'interface sont appelés films de Gibbs. L'adsorption des molécules amphiphiles à une interface est étudiée par tensiométrie à l'aide de gouttes microscopiques ou de films plans, en conditions statiques (sans écoulement), sur des échelles de temps supérieures à celle de la formation d'une émulsion. Le mécanisme peut se décomposer en trois étapes : la *diffusion*, l'*adsorption* et le *réarrangement* des molécules adsorbées à l'interface. Dans le cas des protéines, une quatrième et dernière étape de l'adsorption peut consister en la formation de multicouches à l'interface.

Diffusion des émulsifiants vers l'interface :

La vitesse à laquelle un émulsifiant accède et s'adsorbe à l'interface huile/eau ou air/eau est un élément important de son efficacité fonctionnelle. Cette vitesse d'adsorption dépend des caractéristiques moléculaires de l'émulsifiant (taille, solubilité, flexibilité, conformation), de la nature de la (des) phase(s) liquide(s) (viscosité, polarité) et des conditions environnementales (température, profil d'écoulement). La vitesse d'adsorption par diffusion moléculaire de molécules présentant une activité de surface suit l'équation 23 :

$$\frac{d\Gamma}{dt} = c \sqrt{\frac{D}{\pi t}}$$
(23)

où D est le coefficient de diffusion translationnel de la molécule, Γ est sa concentration surfacique, t est le temps et c est la concentration initiale de la molécule dans la phase liquide. Cette équation s'applique au début de l'étape d'adsorption, lorsque la concentration en émulsifiants adsorbés est très inférieure à la concentration en émulsifiants dans la phase liquide. La variation de la concentration surfacique au cours de l'adsorption est calculée en intégrant l'équation (23) par rapport au temps :

$$\Gamma(t) = 2c \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \qquad (24)$$

Cette équation indique que l'adsorption des émulsifiants à l'interface est d'autant plus rapide que la concentration initiale en émulsifiants dans la phase liquide est importante, et que le coefficient de diffusion de l'émulsifiant est élevé. Ce coefficient de diffusion est d'autant plus élevé que le poids moléculaire des molécules est faible. Dans un second temps, la vitesse d'adsorption diminue du fait de la saturation de l'interface par les émulsifiants adsorbés.

Ces équations, qui permettent d'accéder aux vitesses d'adsorption des tensioactifs dans des systèmes statiques, ne sont pas applicables en conditions dynamiques et donc au cours de procédés impliquant des profils d'écoulement turbulents, comme c'est le cas lors des procédés d'homogénéisation.

Adsorption des émulsifiants à l'interface :

Les équations décrites dans le paragraphe précédent impliquent une adsorption immédiate des émulsifiants dès leur arrivée à l'interface. En réalité, il peut exister une barrière énergétique à l'absorption, pouvant être due à :

- La répulsion entre les émulsifiants déjà adsorbés à l'interface et ceux diffusant vers l'interface (répulsions stériques, électrostatiques),

- Une orientation défavorable des parties hydrophile et hydrophobe des molécules tensioactives vis à vis de l'interface,

- La propension des tensioactifs à former des micelles en milieu liquide ; or, ces structures présentent une activité de surface faible comparée à celle des monomères de tensioactifs.

Organisation et réarrangements des émulsifiants à l'interface :

Dans le cas des tensioactifs, les couches interfaciales formées subissent peu de réarrangements d'ordre structural ou conformationnel *post* adsorption. Dans le cas des protéines, divers changements/réarrangements peuvent advenir *post* adsorption.

A une interface air/eau, seule une partie des segments des protéines adsorbées est directement en contact avec l'interface (Figure 15). Lorsque l'interface est saturée, seule une fraction de l'aire disponible (30 à 40%) est occupée par les segments protéiques, alors que dans le cas d'une monocouche de tensioactifs, quasiment 100% de l'aire interfaciale est couverte (Dickinson, 1992). Ce taux de couverture relativement faible des protéines à l'interface est dû aux enchevêtrements et aux contraintes topologiques imposées par les liaisons de la chaîne peptidique.



Figure 15. Représentation schématique de l'adsorption d'une protéine à une interface air/eau selon le modèle zone d'ancrage-boucle-queue (Belhomme, 2007).

La conformation adoptée par les protéines à une interface air/eau dépend des conditions environnementales (pH, force ionique et température), de la concentration en protéines et de la conformation native de la protéine (globulaire ou flexible) (Figure 16). La flexibilité des protéines est un paramètre important dans la vitesse des réarrangements conformationnels se produisant *post* adsorption. Plus la flexibilité de la protéine est importante, plus son réarrangement lors de l'adsorption à l'interface sera rapide. Les protéines flexibles, comme la β -caséine, se déplient et abaissent rapidement la tension de surface alors que les protéines globulaires, comme la β -lactoglobuline, dont la structure tertiaire est stabilisée par des liaisons covalentes telles que des ponts disulfures, subissent un changement de conformation beaucoup plus lent et partiel. Les protéines flexibles forment ainsi des films peu visqueux alors que les protéines globulaires forment des films très visqueux et constituent un réseau cohésif et continu (McClements, 2005).



Figure 16. Représentation schématique des conformations adoptées par des protéines flexibles ou globulaires en fonction de leur concentration surfacique à l'interface air/eau (Belhomme, 2007).

Par ailleurs, de très nombreuses études ont mis en évidence que les protéines adsorbées à une interface air/eau ou huile/eau peuvent être désorbées par compétition avec des molécules de petite taille fortement tensioactives (Courthaudon et al., 1991a; Courthaudon et al., 1991b; Courthaudon et al., 1991c; Dickinson, 2001; Dickinson & Tanai, 1992; Mackie et al., 2000; Wilde et al., 2004).

2.2.3. Etude de l'activité de surface des émulsifiants hydrophobes

Les activités de surface des acides gras, des mono et diglycérides d'acides gras, de certains dérivés d'acides gras et des phospholipides sont étudiées en formant directement un film à partir d'une solution organique à la surface de l'eau. Cette méthode, qui consiste ainsi à former des films monomoléculaires dits films de Langmuir, emploie classiquement une balance de Langmuir qui se compose d'une cuve contenant une sous-phase aqueuse surmontée de deux barrières mobiles et d'un tensiomètre. La position des barrières mobiles est contrôlée pour moduler la densité de molécules à l'interface. En fonction de l'aire disponible par molécule, de la présence de cations divalents et de la température, l'organisation des molécules est polymorphe (Figure 17). Cependant, en présence de tensioactifs à chaîne insaturée ou courte, ou de mélanges de tensioactifs, le polymorphisme est généralement limité à une seule phase de type liquide.



Figure 17. Représentation schématique d'une isotherme de compression représentant la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire d'un tensioactif pur à longue chaîne saturée à une interface air/eau (Schwartz, 1997). Les différentes pentes de l'isotherme permettent d'identifier les différentes phases structurales adoptées par les chaînes alkyle à l'interface et les zones de transitions entre ces phases.

2.2.4. Méthodes de caractérisation physique des interfaces

Il existe beaucoup plus de techniques de caractérisation des films interfaciaux formés aux interfaces air/eau qu'aux interfaces huile/eau. Sans en faire une liste exhaustive, ce paragraphe reprend les principales techniques pouvant être utilisées, leurs caractéristiques et le type d'informations pouvant en être obtenues (Tableau II) (Dynarowicz-Latka et al., 2001). Le principe et la mise en place des techniques utilisées au cours de ce projet de thèse seront détaillés dans la section 'Matériel et Méthodes' (cf. 4. Etude des films interfaciaux impliqués dans les émulsions).

Les techniques de *diffusion/diffraction* de rayonnements X ou neutrons permettent d'obtenir des informations sur l'organisation structurale de molécules adsorbées à une interface et sur l'épaisseur de cette interface. Les techniques de *réflexion* consistent à étudier la façon dont est réfléchi un faisceau de lumière polarisée ou de neutrons à la surface d'une interface. Un traitement mathématique du signal de l'onde réfléchie permet d'obtenir des informations sur l'épaisseur et le profil de concentration du film interfacial. Les techniques *spectroscopiques* sont basées sur l'absorption de radiations électromagnétiques par les molécules localisées à l'interface, et peuvent être utilisées pour étudier la transmission des radiations au travers du film interfacial ou la réflexion de ces radiations à la surface du film. Ces techniques peuvent permettre de déterminer la concentration surfacique des émulsifiants ainsi que d'étudier leur cinétique d'adsorption et les réarrangements structuraux se produisant *post* adsorption. Les techniques de *microscopie* permettent d'observer des modifications structurales et d'organisation dans le film interfacial à des échelles très variables. Par exemple, la *microscopie à force atomique* (AFM) fournit des informations sur la structure des films à une échelle moléculaire voire atomique. Cette technique s'applique à des films interfaciaux déposés sur un support solide dont la topographie est étudiée grâce au déplacement d'une pointe à la surface du film.

Tableau II. Principales techniques de caractérisation des propriétés des interfaces, d'après Dynarowicz-Latka et al. (2001) et McClements (2005).

Technique	Application, informations obtenues							
Techniques de mesure de la tension interfaciale et des paramètres rhéologiques								
Anneau de Du Nouy ou Lame de Wilhelmy	Tension interfaciale en fonction de la concentration en solution							
Balance de Langmuir couplée à la lame de Wilhelmy Goutte pendante/ montante	Tension interfaciale en fonction de la densité des molécules (isothermes de compression), modules visqueux et élastiques sous cisaillement ou module visco-élastique apparent Tension interfaciale, modules visqueux et élastiques (en rhéologie dilatationnelle)							
Techniques de diffusion et diffraction de rayonnement								
Ellipsométrie Réflectivité des neutrons/rayons X	Epaisseur du film, profil de concentration Epaisseur du film, profil de concentration							
Diffraction sous incidence rasante	Structure cristalline des chaînes alkyle							
Techniques de spectroscopie								
Spectroscopie infrarouge d'absorption-réflexion	Composition du film, orientation et changements conformationnels, structure secondaire des protéines							
Spectroscopies optiques non linéaires	Orientation et conformation des molécules							
Microscopie								
Microscopie à force atomique	Topologie de l'interface							
Microscopie électronique Microscopie à angle de Brewster	Structure et topologie de l'interface Homogénéité structurale du film (identification des phases fluides et condensées dans le film)							
fluorescence	condensées dans le film)							

3. Rôle de l'interface sur l'oxydation des lipides dans les émulsions (projet d'article de synthèse)

La partie bibliographique présentée ci-après fait la revue des facteurs évoqués dans la littérature comme influençant l'oxydation des lipides dans des émulsions H/E. Nous y insistons plus particulièrement sur les éléments permettant de relier l'oxydation des lipides aux propriétés physiques et chimiques de la couche interfaciale.

L'objectif étant in fine de valoriser cette synthèse en la publiant sous la forme d'un article de synthèse, elle a été rédigée en anglais. La version définitive de cet article intégrera les résultats obtenus au cours de cette thèse et portant sur l'effet de la modulation de la composition et de la structure des interfaces sur la stabilité oxydative des émulsions. Néanmoins, pour conserver l'enchaînement logique de ce manuscrit, de l'état de l'art aux résultats expérimentaux et à leur discussion, le texte ci-après ne comporte pas de citation relative aux travaux réalisés au cours cette thèse.

Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer

En préparation pour soumission à Progress in Lipid Research

Claire Berton, Marie-Hélène Ropers, Claude Genot*

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes, France

Contents

1. Introduction
2. Prerequisites on food emulsions and lipid oxidation
2.1. Physical organization of oil-in-water emulsions41
2.2. Lipid oxidation
2.2.1. General mechanisms of lipid oxidation46
2.2.2. Factors influencing lipid oxidation in bulk oils
3. Influence of emulsification of the oil phase on lipid oxidation
4. Specific factors related to the oil phase that influence lipid oxidation in emulsions52
4.1. Droplet size
4.2. Oil phase volume fraction
4.3. Composition of the oil phase
5. Physico-chemical factors related to the aqueous phase involved in lipid oxidation
5.1. pH57
5.2. Salts and small solutes
5.3. Metal chelators
6. The interface and the oxidative aqueous phase-interface interrelationships
6.1. Droplet charge60
6.2. Monolayer interfaces
6.2.1. Emulsifier type62
6.2.2. Emulsifier concentration
6.2.3. Emulsifiers and other biopolymers in the aqueous phase
6.3. Multilayer interfaces69
6.4. Antioxidant compounds located at the interface
7. Conclusion

1. Introduction

Numerous formulated foods consist in a lipid phase dispersed in an aqueous medium and can be described as oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by surface-active molecules that adsorb at the oil-water interface. Before they reach their final user, i.e. the consumer's plate, these dispersed systems undergo various thermal or mechanical treatments and are stored in various conditions. Under these conditions and in the presence of oxygen, the most chemically reactive species may oxidize. Among them, polyunsaturated fatty acids (PUFA), which are the main nutritional components of the oils, are considered as a major substrate for oxidation in food formulations. Their oxidation has a noticeable and negative influence on food technological, sensory, and nutritional qualities.

PUFA are fatty acids with two or more double bonds in *cis* configuration. The two main families of PUFA are n-6 and n-3 PUFA, according to the numbering of the first double bond from the terminal (omega- or n-) methyl function of the fatty acid chain. The former family is represented by fatty acids such as linoleic acid (9-*cis*,12-*cis*-octadecadienoic acid, LA, C18:2 n-6) and arachidonic acid (*all-cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid, ARA, C20:4 n-6), while the latter family is represented by fatty acids such as α -linolenic acid (*all-cis*-9,12,15-octadecatrienoic acid, ALA, C18:3 n-3), *all-cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 n-3) and *all-cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3). n-6 and n-3 PUFA are of nutritional importance for their physiological functions. For instance, n-3 fatty acids play a role in the brain and nerve development of growing foetuses and infants and in the modulation and prevention of human diseases, in particular cardiovascular disease and in diseases involving an immunoinflammatory component (Connor, 2000; Trautwein, 2001). It is nowadays admitted that in several countries the intake of n-3 PUFA is insufficient. It seems therefore important to provide diets with increased levels of these fatty acids (Legrand, 2004; Razanamahefa et al., 2005; Simopoulos, 2006).

However, PUFA are particularly sensitive to oxidation because of the unsaturation of their hydrocarbon chain. Lipid oxidation generates odorants characterized by low detection threshold and unpleasant perception, which damages the sensory quality of the products. It also possibly provokes a loss of nutritional components and causes the formation of free radicals and toxic compounds which are harmful for cells. It results that one of the important challenges for the food industry is to be able to delay lipid oxidation in PUFA-enriched food formulations. The different strategies currently carried out by the industry, namely vacuum packaging, low temperature storage, encapsulation or addition of antioxidant compounds

revealed themselves to be subject to high risks of unpredicted development of oxidation at a stage or another of the product lifespan. These costly troubles highlighted the need for a deeper understanding of the oxidation reaction in food systems.

The mechanisms of lipid oxidation have been extensively studied and documented for years (Chan, 1987; Cheng & Li, 2007; Frankel, 1985; Frankel, 2005; Gardner, 1989; Hammond & White, 2011; Hsieh & Kinsella, 1989; Porter, 1986; Schaich, 2005). On the same way, since the late 80's, a consistent work has been performed regarding lipid oxidation in emulsions and in multiphase systems. It made possible to propose several cognitive models regarding the main compositional and structural factors that influence lipid oxidation in emulsion and food formulations (Coupland & McClements, 1996; Frankel, 2005; Genot et al., 2003; Jacobsen, 2008; Jacobsen, 2010a; Jacobsen, 2010b; McClements & Decker, 2000; Waraho et al., 2011b). Among these factors, it is admitted that the interfacial region, which is the contact region between the oil phase and the aqueous phase, represents a particularly critical area in the system.

This review intends to sum up the available data about the influence of the interfacial layer on oxidation of emulsified lipids. We first summarized the essential/minimum basic knowledge regarding (i) the structure of interfaces and of O/W emulsions and (ii) the mechanism of lipid oxidation. Then we detailed the factors involved in the development of lipid oxidation in O/W emulsions with a special focus on the role played by the interfacial region and by the emulsifiers.

2. Prerequisites on food emulsions and lipid oxidation

2.1. Physical organization of oil-in-water emulsions

Several review articles and books describe the physical organization of emulsions and more generally of multiphase systems. Among them, we took a leaf out of the work of Dickinson (1992) and McClements (2005). Emulsions are constituted of two immiscible liquids, one being dispersed in the other in the form of droplets. These droplets constitute the *dispersed phase* while the liquid around them constitutes the *continuous phase*. The area between the dispersed and continuous phase is the *interface*.

Food emulsions are generally distinguished according to the composition of the dispersed and continuous phases. A system constituted of oil droplets dispersed in an aqueous phase is an

oil-in-water (O/W) emulsion, for example dressing or mayonnaise. On the opposite, a system constituted of water droplets dispersed in an oil phase is a water-in-oil (W/O) emulsion, for example butter or margarine. In this work, we focus on O/W emulsions. The *droplet size distribution*, often characterized by an *average diameter*, is a main characteristic of O/W emulsions. It determines the number of droplets and the *surface area* of the interface, smaller the droplets, higher their number and the developed surface for the same oil amount. A large range of droplet sizes, from less than 0.1 μ m to 20 μ m or more can usually be encountered in food emulsions. Applications of nanoemulsions (droplet diameter < 100 nm) is another emerging domain (Lee et al., 2011; Mason et al., 2006; Tadros et al., 2004).

Emulsions are thus prepared through emulsification of two immiscible liquids; within a liquid phase, each molecule is surrounded by same nature molecules, i.e. the sum of the intermolecular attractive forces is null. On the opposite, when molecules are located at the interface between the two immiscible liquids, the sum of the intermolecular attractive forces is non-null and oriented towards the former liquid volume. This attractive force generates a surface tension (γ , J m⁻² or N m⁻¹, eq. 1).

$$\gamma = \frac{\Delta G}{\Delta A} \tag{1}$$

where ΔG (J or N m) is the free energy required to increase of a ΔA surface (m²) the interfacial area between the two immiscible liquids, at a given temperature and pressure.

O/W emulsions are thermodynamically unstable systems. Thus, oil droplets have to be stabilized physically to avoid the separation between the oil and aqueous phases. Stabilizing agents include texture modifiers and emulsifiers. Texture modifiers stabilize the emulsions by increasing the viscosity of the continuous phase, which limits the creaming of oil droplets and then their eventual flocculation and coalescence. *Emulsifiers* adsorb at the oil/water interface during the homogenization process, which decreases the surface tension between the oil and the water phases and the total free energy of the system. They can prevent the flocculation and coalescence of oil droplets *via* steric or electrostatic repulsions.

Emulsifiers may be classified among low molecular weight emulsifiers, high molecular weight emulsifiers and solid particles.

Low molecular weight emulsifiers. This category comprises first surfactants, which are small surface-active molecules constituted of a hydrophilic headgroup and a hydrophobic tail. The headgroup may be anionic, cationic, zwitterionic or non-ionic. The hydrophobic tail is

generally constituted of one or several hydrocarbon chains with 10 to 20 carbon atoms. Several food-grade surfactants exist, including mono and diglycerides, Tweens (polyoxyethylene sorbitan esters), polysorbates, Spans (sorbitan esters), sucrose esters, citric, lactic, acetic acid esters, etc.

Phospholipids belong as well to the category of low molecular weight emulsifiers. They are widely used as food emulsifiers, generally in the form of mixtures of phospholipids, and possibly triacyglycerols, called *lecithins*. The most common phospholipids encountered in foods are phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE). In addition, sphingolipids are encountered in a variety of food sources (Vesper et al., 1999).

High molecular weight emulsifiers. High molecular weight amphiphilic biopolymers are also widely used to stabilize O/W emulsions. In this category, we can distinguish *proteins* from *hydrocolloids* (gum arabic [*Acacia Senegal*], modified starches, modified celluloses, some kinds of pectin and galactomannans) (Dickinson, 2009). Their interfacial activity results from the fact that these molecules have both hydrophobic and hydrophilic domains distributed along their polymeric chain. When biopolymers adsorb at an oil/water interface, they adopt a conformation allowing the hydrophobic parts to locate in or into contact with the oil phase and the hydrophilic parts to locate in the aqueous phase. Depending on their intrinsic characteristics, especially their flexible or rigid structure, biopolymers adopt at the interface an expended or globular conformation. Biomolecule aggregates such as protein aggregates usually generated during food processes, can also adsorb at the interface and participate to emulsion stabilisation (Chapleau & de Lamballerie-Anton, 2003; Euston & Hirst, 1999; Relkin et al., 2006).

Solid particles. Oil droplets can be stabilized by particles that adsorb at the interface (Aveyard et al., 2003; Dickinson, 2010; Leal-Calderon & Schmitt, 2008). An example is the stabilization of O/W food emulsions with fat crystals (Frasch-Melnik et al., 2010). In other studies silica particles were mixed with protein or surfactant emulsifiers to stabilize emulsions (Kargar et al., 2011; Pichot et al., 2010). Indeed, the food applications of solid particles as emulsifiers are limited nowadays, if any, but stabilization by solid particles could constitute an emerging strategy in the formulation of food emulsions.

Emulsifiers can be used alone or mixed together to stabilize physically O/W emulsions. They generally form a *monolayer* at the oil/water interface. However, biopolymers as caseins, when

present in sufficient amounts, can naturally form *multilayers* at the interface. Multilayer interfaces can also be constructed by the consecutive electrostatic deposition of various emulsifiers.

The use of emulsifier mixtures must be carefully considered as *competitive adsorption* phenomena may occur. For instance, low molecular weight emulsifiers can compete with proteins for the adsorption at the oil/water interface as they are more surface-active (Courthaudon et al., 1991b; Courthaudon et al., 1991c; Damodaran, 2004; Damodaran, 2005; Day et al., 2010; Dickinson, 1992; Dickinson, 1998; Dickinson & Tanai, 1992; Kotsmar et al., 2008; van Aken, 2003). Low molecular weight emulsifiers can even displace already adsorbed proteins from the interface, which is known as *orogenic displacement* (Mackie et al., 2000; Morris & Gunning, 2008).

The composition and the physical characteristics of the interface depend in a great extent on the nature and concentration of the adsorbed emulsifier molecules. Surfactants are more surface-active than proteins: they decrease the surface tension at the air/water interface by 30-50 mN m⁻¹ whereas proteins decrease the surface tension only by 15-25 mN m⁻¹ (Bos & van Vliet, 2001; Dickinson, 1992). In addition, the adsorption rate is usually faster for surfactants than for proteins during the emulsification process (Tcholakova et al., 2008). When proteins are used as emulsifiers, only a part of the polypeptidic chain is actually in direct contact with the oil/water interface, the other protein segments being located in the aqueous phase. Accordingly, only 30-40% of the interface are covered with proteins whereas nearly 100% are covered with surfactants (Dickinson, 1992). Hence, surfactant molecules are more tightly packed at the interface than proteins, which is particularly marked for polyoxyethylene sorbitan esters as Tween 20 (Grigoriev & Miller, 2009; Wilde et al., 2004). Typical surface *loads* encountered for protein-stabilized interfaces range from 1.5 to 4.5 mg m⁻², depending on the protein type and the pH (Atkinson et al., 1995; Bos & van Vliet, 2001). Surface loads are lower for surfactant-stabilized interfaces, i.e. 1-2 mg m⁻² (Bos & van Vliet, 2001). Proteins form immobile, viscoelastic interfacial films exhibiting non-Newtonian behavior. Surface viscosity increases with intra- and intermolecular cohesion within the film, and is greater for proteins which can easily aggregate as β -lactoglobulin (BLG) than for disordered proteins as β-casein (BCN) (Damodaran, 2004; Dickinson, 1992; Murray & Dickinson, 1996; Wilde et al., 2004). Surfactants form *fluid interfaces* with a substantial surface lateral diffusion coefficient (Wilde et al., 2004). Typically, for monolayer- and/or single emulsifier-covered interfaces, the interface thickness varies from 0.5-1 nm for surfactant-stabilized interface to 1-15 nm for protein emulsifiers (Atkinson et al., 1995; Dalgleish, 1993; Dickinson, 2009; Fang & Dalgleish, 1993b; Singh, 2011). One special feature of protein-stabilized interfaces is that they can undergo structural and conformational rearrangements *post* adsorption, which implies that their physical properties may evolve (Dickinson, 1992; Tcholakova et al., 2008). Parameters of huge significance for emulsion stability are the *electrostatic charge* and the interface thickness. Accordingly, two main phenomena allow the physical stability of oil droplets, i.e. prevent them from flocculation and coalescence: steric repulsion and electrostatic repulsion. Interfacial proteins generate both steric and electrostatic repulsion, and can therefore form a physical barrier to droplet coalescence (Dickinson, 1992; Grigoriev & Miller, 2009; Tcholakova et al., 2008; Wilde et al., 2004). Depending on the protein type, various repulsive interactions were observed. Bovine serum albumin (BSA) was shown to generate long-ranged steric repulsion, whereas BCN exerted mainly electrostatic repulsion. BLG exhibited an intermediate behavior, with electrostatic repulsion at larges distances and steric repulsion at short distances between both nearby interfaces (Dimitrova & Leal-Calderon, 1999; Dimitrova et al., 2001; Dimitrova et al., 2004). However, proteins may in some cases favor the physical destabilization of emulsions through either droplet-droplet bridging which leads to flocculation, or depletion flocculation (Dickinson, 1992; Dimitrova & Leal-Calderon, 1999; Grigoriev & Miller, 2009; Tcholakova et al., 2008). Surfactant are generally considered as less efficient than proteins in avoiding the interfacial film breaking and droplet coalescence (Dickinson, 1992; Wilde et al., 2004). Ionic surfactants induce electrostatic repulsion whereas non-ionic surfactants as Tween 20 can exert steric repulsion because of their polyoxyethylene chains. Surprisingly, Tween 20-stabilized interfaces have been also shown to fit well with a model of electrostatic repulsion (Dimitrova & Leal-Calderon, 1999; Dimitrova et al., 2001), which might be explained by the interface ionic environment.

Beyond their effect on the physical stability of emulsions, the composition and structure of the interfacial layer can impact the diffusion phenomena within the systems. For instance, the gas permeability of emulsifier films at the air/water interface has been shown to increase in the following order: mono-, diglycerides, sodium stearoyl lactylate << whey protein isolate (WPI) < Tween 80, which was related to differences in the ability of emulsifiers to form compact and tight interfacial layers (Bezelgues et al., 2008). In O/W emulsions, the oxygen diffusion coefficient at the oil/water interface was found to be higher for SDS-stabilized emulsions than for WPI-stabilized emulsions, indicating a lower gas permeability of the protein interface (Tikekar et al., 2011). The gas permeability of interfaces could be of importance in the lipid oxidation rate in emulsions.

45

Finally, it must be pointed out that the interface composition and structure also depends on the presence of compounds other than emulsifiers, for instance amphiphilic molecules and solutes that partition between the phases of the system, including the interface (antioxidants, lipid oxidation products such as hydroperoxides, etc.).

In food formulations as in model emulsions, the amounts of emulsifiers used to stabilize O/W emulsions are generally widely higher than the actual amounts required to cover the entire interfacial surface. As a consequence, a substantial fraction of the water-soluble emulsifiers often remains in the aqueous phase of O/W emulsions. This is of importance since unadsorbed emulsifiers affect the physical and chemical stability of emulsions (Casanova & Dickinson, 1998; Dauphas et al., 2008; Dickinson & Golding, 1997; Dickinson et al., 2003; Donnelly et al., 1998; Faraji et al., 2004; Hu et al., 2003b; Nuchi et al., 2002; Ponginebbi et al., 1999; Villière et al., 2005; Ye, 2008).

2.2. Lipid oxidation

2.2.1. General mechanisms of lipid oxidation

Lipid oxidation consists in the reaction of molecular oxygen with unsaturated fatty acids. It has been extensively studied and, even if some reaction pathways are not completely elucidated, the main mechanisms are well described. The general reaction schemes for oxidation of unsaturated fatty acids and bulk oils and fats can be found in several books and reviews (Chan, 1987; Cheng & Li, 2007; Frankel, 1985; Frankel, 2005; Gardner, 1989; Hsieh & Kinsella, 1989; Laguerre et al., 2007; Porter, 1986; Schaich, 2005).

Lipid oxidation is a free radical chain reaction usually divided into three stages: initiation, propagation and termination.

Initiation. The direct reaction between LH and triplet oxygen $({}^{3}O_{2})$ can not occur spontaneously because the lipid ground state has an opposite spin direction from that of ${}^{3}O_{2}$. The activation energy of this direct reaction would therefore be too high (Belitz et al., 2004; Chan, 1987). The spin barrier can be overcome in the presence of initiators that produce lipid radicals or convert ${}^{3}O_{2}$ in reactive oxygen species (ROS), including hydroxyl radical (OH[•]) and singlet oxygen (${}^{1}O_{2}$).

According to the initiation mechanism, lipid oxidation occurs through different pathways: autoxidation, enzymatic oxidation and singlet oxygen (${}^{1}O_{2}$) oxidation. The last pathway is encountered during photoinitiation, the system being exposed to light in the presence of a sensitizer. It is a non-radical reaction at the initiation step because ${}^{1}O_{2}$ reacts directly with the double bonds. The enzymatic oxidation is not usual in food emulsions and therefore not under the scope of this review. Both enzymatic and singlet oxygen reaction have specificities regarding to primary reaction products, but the latest stages of the reactions are similar to autoxidation.

The first step of autoxidation is described as follows. In the presence of initiators, unsaturated fatty acids (LH) lose a hydrogen atom (H) in an allylic position relative to a fatty acid double bond. It forms a lipoyl or alkyl free radical (L^{\bullet}), according to reaction (2).

 $LH \rightarrow H + L^{\bullet}$ (2)

This reaction is supposed to occur via different mechanisms:

- Direct reaction between LH and transition metal ions (M): $LH + M^{3+} \rightarrow L^{\bullet} + H^{+} + M^{2+}$ (3)

- Reaction between LH and oxygen radicals arising from metal (e.g. iron) autoxidation (Schaich, 2005):

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet} \leftrightarrows HOO^{\bullet} + H^+ \rightarrow L^{\bullet} + H_2O_2 \qquad (4)$$

$$2 O_2^{\bullet} \text{ or } O_2^{\bullet} / HOO^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (5)$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+} \qquad (6)$$

$$HO^{\bullet} + LH \rightarrow H_2O + L^{\bullet} \qquad (7)$$

Lipid matrices often contain trace hydroperoxides (LOOH) which can undergo oxidation, reduction or decomposition, leading to lipid radicals involved in the early stages of lipid oxidation:

- Oxidation or reduction of hydroperoxides (LOOH) catalyzed by metals:

$$LOOH + M^{2+} \rightarrow LO^{\bullet} + OH^{-} + M^{3+}$$
(8)

$$LOOH + M^{3+} \rightarrow LOO^{\bullet} + H^{+} + M^{2+}$$
(9)

- Thermal decomposition of hydroperoxides:

 $LOOH \rightarrow LO^{\bullet} + {}^{\bullet}OH$ (10)

The activation energy of this reaction is high (Frankel, 2005); another mechanism, in agreement with kinetic observations, involves two molecules of hydroperoxides:

 $2 \operatorname{LOOH} \to \operatorname{LO}^{\bullet} + \operatorname{H}_2\operatorname{O} + \operatorname{LOO}^{\bullet}$ (11)

Propagation. The alkyl radicals (L^{\bullet}) produced during initiation react very quickly with triplet oxygen to generate peroxyl radicals (LOO[•]), according to reaction (12).

 $L^{\bullet} + O_2 \to LOO^{\bullet} \tag{12}$

Since peroxyl radicals are unstable, they abstract hydrogen atoms from other unsaturated fatty acids to form hydroperoxides and other alkyl radicals:

 $LOO^{\bullet} + L'H \rightarrow LOOH + L'^{\bullet}$ (13)

The newly formed alkyl radicals can then react with triplet oxygen, and so on. The radical chain reaction thereby engaged propagates at a high rate and the increase of hydroperoxides formation becomes exponential. The formation of hydroperoxides from non-conjugated polyunsaturated fatty acids goes with the stabilization of free radicals *via* double bond rearrangement, which gives rise to conjugated dienes.

The next step, which involves radical and non-radical reactions is the *decomposition of hydroperoxides*. The reaction is favored by the presence of metal catalysts and by an increased temperature. The prominent mechanism consists in the homolytic scission of the double bond adjacent to the hydroperoxyl group to give secondary products of oxidation. It is a complex phenomenon, which leads to the formation of various compounds. The main compounds are carbonyl compounds, alcohols, aldehydes and hydrocarbons, a wide range of them being low molecular weight compounds. Among them, volatile lipid oxidation products are responsible for the flavor deterioration of food lipids. Some of the produced molecules of higher molecular weight, such as core aldehydes, are more hydrophilic than the initial compounds and thus probably surface-active, which may change their location when produced in a multiphase system.

Termination. During this stage, which is less accurately described than the others, the radicals react together to form stable non-radical compounds:

 $LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow \text{non-radicals products}$ (14)

These non-radical compounds can not participate to the reaction cycle anymore, which stops the radical chain reaction. Because of the hydroperoxide decomposition pathways, different radicals are produced, and there are several possibilities of combinations between them. Some antioxidant compounds can promote termination reactions.

2.2.2. Factors influencing lipid oxidation in bulk oils

Apart from environmental conditions, including temperature, oxygen concentration and total available amount of oxygen, light, radiations, etc., lipid oxidation is highly dependent on the characteristics of the substrate, namely the fatty acid composition of the oil and lipid molecular structure. Fat-soluble and hydrophilic minor compounds are also susceptible to dramatically modify the oxidation of bulk oils.

Lipid unsaturation degree. The susceptibility of fatty acids to hydrogen abstraction (eq. 2, 3, 7) is dependant on the dissociation energies of C-H bonds. In the presence of a double bond in the fatty acid chain, the dissociation energy of the C-H bonds located on the allylic carbons is weaken, which makes the hydrogen removal easier. On the same way, for a bisallylic C-H bond, the dissociation energy is significantly lower than that for a monoallylic C-H bond (Gardner, 1989; Porter, 1986; Reich & Stivala, 1969; Wu et al., 1978). As a consequence, the susceptibility of monounsaturated fatty acids such as oleic acid to oxidation is much lower than this of polyunsaturated fatty acids and, when lipids are in bulk or dissolved in a solvent, their oxidizability increases with lipid unsaturation. The most oxidizable fatty acids are the long-chain PUFAs, since they contain several bis-allylic C-H bonds in their hydrocarbon chain. For example, the rate of autoxidation of ethyl linolenate (C18:3 n-3) was found 2.4 times that of ethyl linoleate (C18:2 n-6), and the rate of autoxidation of methyl arachidonate (C20:4 n-6) was about twice that of ethyl linolenate (Holman & Elmer, 1947). The introduction of one additional double bond into a fatty acid would thus at least double the rate of oxidation of the fatty acid or its ester. Accordingly, oxidizabilities (M^{-1/2} sec^{-1/2}) of LA. ALA, ARA and DHA at 37 °C were found to be 2.03×10^{-2} , 4.07×10^{-2} , 5.75×10^{-2} and 10.15×10^{-2} , respectively (Cosgrove et al., 1987). The absolute rate constants for the reactions of different radicals with unsaturated fatty acids also increase with increasing unsaturation (Forni, 1990). Similarly, the induction period for the autoxidation of fatty acids decreases with increasing unsaturation. For instance, induction periods of 700, 22 and 10 hours were observed during the autoxidation of oleic acid (C18:1, n-9), LA and ALA, respectively (Martin et al., 1990).

Oxidizability of bulk phase triacylglycerols increases accordingly with the number of unsaturations in the hydrocarbon chains and/or with the concentration in unsaturated fatty acids. Increasing slightly the oil content in long chain PUFA (ARA, *all-cis-*7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid (DPA, C22:5 n-3) and DHA) through the addition of low proportions (between 0.5 and 8% w/w) of fungal, tuna and egg oil to a vegetable oil mix resulted in a significant decrease of the oxidation lag phase (Bartee et al., 2007). Other studies showed a decrease of lipid oxidation in polyunsaturated oils (LA, ALA) blended with oils containing oleic acid or more generally monounsaturated fatty acids (Anwar et al., 2007; Mezouari & Eichner, 2007; Torres et al., 2006).

Triglyceride structure. The position of fatty acids on triacylglycerols can also impact their oxidative stability. This has been studied both with pure synthetic triacyglycerols and with natural oils.

Working with synthetic triacylglycerols, it was observed that sn-1(3)-palmitoyl-sn-1,2(2,3)dilinoleoyl (PLL) had lower oxidative stability than sn-2-palmitoyl-sn-1,3-dilinoleoyl LPL (Neff & ElAgaimy, 1996). This effect was attributed to an easier propagation of the chain reaction between the adjacent linoleic acid fatty chains of PLL compared to non-adjacent linoleic acid of LPL. Other authors found that in synthetic triacylglycerols EPA and DHA located at the sn-1,2(2,3)-position of glycerol were more oxidizable than those at the sn-1,3position and that sn-1,2(2,3)-dipalmitoyl-3(1)-eicosapentaenoylglycerol oxidized faster than sn-1,3-dipalmitoyl-2-eicosapentaenoylglycerol (Endo et al., 1997). Other experiments showed that PUFA were more stable to oxidation when located at the sn-2 position of triacylglycerol compared to sn-1(3) position (Wang et al., 2010; Wijesundera et al., 2008).

Physical state of lipids (liquid vs *solid state)*. The crystallization state of vegetable bulk oils can impact the development of lipid oxidation (Calligaris et al., 2007; Calligaris et al., 2006). In the former study, the oxidation rate of olive oil below its melting point was higher than the theoretical value determined from the Arrhenius equation. The authors proposed that an

increased concentration of unsaturated triacylglycerols in the liquid areas surrounding fat crystals could explain, at least in part, this result. The latter study did not highlight any impact of the oil physical state on the peroxide formation in a water-in-oil emulsion. The oil physical state seemed to impact the production of hexanal, but this effect was difficult to deconvoluate from this of the presence of water.

Oil phase minor components. Commercial oils naturally contain minor components (water, phospholipids, free fatty acids, mono and diglycerides, tocopherols, carotenoids, phenolics, etc.) which intervene in the lipid oxidation reaction in bulk oils. Compounds such as tocopherols, carotenoids, phenolics or phospholipids are known to possibly exert antioxidant activities in bulk oils through various chemical mechanisms, including quenching of free radicals, metal chelation and synergistic effects (Laguerre et al., 2007; Porter, 1980). According to the polar paradox, these activities depend not only on the chemical structure of the antioxidants, but also on their possible location in the bulk oil, at the air/oil interface, or even in colloidal structures dispersed in the bulk oil (Cuvelier et al., 2000; Huang et al., 1996a; Huang et al., 1996c; Porter, 1980; Schwarz et al., 2000). For instance, addition of lecithin in a bulk oil protected lipids against oxidation (Judde et al., 2003), but colloidal structures formed by the association of trace water and phospholipids were prooxidant in soybean oil (Chen et al., 2011b). The effect of phospholipids on lipid oxidation in a bulk oil phase depends on the fatty acid composition of oil and on the presence of antioxidant compounds such as tocopherols, which can establish synergistic antioxidant effects with phospholipids.

3. Influence of emulsification of the oil phase on lipid oxidation

Lipid oxidation proceeds generally more rapidly and at higher rate in O/W emulsions than in bulk oil (Cercaci et al., 2007; Chee et al., 2006; Frankel et al., 2002; Lethuaut et al., 2002; van Ruth et al., 2000). This increase of oxidation induced by emulsification is attributed to several causes. First, the emulsification process itself could promote oxidation through incorporation of oxygen, overheating due to shear stress or direct production of free radicals by acoustic cavitations in the case of sonication. Second, it is often assumed that the creation of and extended interfacial area between the oil and the aqueous phase promotes the contacts between oxidizable unsaturated fatty acids and both the oxygen and prooxidant compounds, such as metal ions, dissolved in the aqueous phase.

However, some studies did not show any increase of lipid oxidation induced by emulsification in comparison with phase lipids in bulk (Khan & Shahidi, 2000), or even showed an improved oxidative stability of long-chain PUFA oils after emulsification or microencapsulation (Belhaj et al., 2010; Garcia et al., 2006). In the first case, it was assumed to result from to the presence of hydrophobic antioxidants which were more efficient in the multiphase system than in the bulk oil according to the polar paradox. In the other cases, one may relate the increased oxidative stability to the emulsifier (mixture of gum arabic and maltodextrin, or phospholipids), or to the structural specificities of the oil (see below).

These contrasted effects of emulsification according to the studied system gives a first evidence that the development of lipid oxidation in heterogeneous systems is the resultant of several imbricated effects. We will see in the following how much difficult it is to separate or to deconvoluate these effects and to propose clear rules for the influence of selected parameters on lipid oxidation.

4. Specific factors related to the oil phase that influence lipid oxidation in emulsions

Lipid oxidation in multiphase systems is governed, at least in part, by the same factors related to the oil phase as those presented above for bulk oils, even if their effects may be different.

4.1. Droplet size

According to the emulsification process, various average droplet size and droplet size distribution can be obtained with the same composition of the emulsions. Several studies have consequently tried to investigate the effect of droplet size on lipid oxidation in O/W emulsions. Some of the obtained results are summarized in Table 1.

Some authors found that increasing the size of oil droplets increased the oxidative stability of emulsions (Gohtani et al., 1999; Lee et al., 2011; Lethuaut et al., 2002). A small droplet size corresponds to a large interfacial area, which is expected to favor the contacts between the oil phase and the prooxidant compounds and oxygen diffusing through the aqueous phase. However, other studies did not report any significant effect of the droplet size on lipid oxidation in O/W emulsions (Dimakou et al., 2007; Osborn & Akoh, 2004).

Table 1. Effects of droplet size on lipid oxidation in O/W emulsions as observed in several studies. Data of droplet size indicated in bold correspond to the best oxidative stability for a given study.

Reference	Lipid phase (oil volume fraction*)	Aqueous phase	Emulsifier	Size of the smallest droplets ** (µm)	Size of the largest droplets** (µm)	Conclusion
Ries et al., 2010	Linoleic acid (10.6%)	Non- buffered, aqueous protein solutions	Na- caseinate or WPI***	0.31	0.65	Better oxidative stability with <u>smaller</u> droplets (S>L)
Lethuaut et al., 2002	Sunflower oil (30% v/v)	Protein solution, pH 4.3	Bovine serum albumin	0.40	8.1	Better oxidative stability with <u>larger</u> droplets (S <l)< td=""></l)<>
Gohtani et al., 1999	DHA (1%)	Water + xanthan (0.5%)	Decaglycerol monostearate	3.4	6.4	S <l< td=""></l<>
Nakaya et al., 2005	Purified fish oil TAG (10%)	Citrate- phosphate buffer, pH 6.6	Sucrose esters	0.80	12.8	S>L
Nakazawa et al., 2008	Methyl linoleate (30%) Canola	Water	Decaglycerol monolaurate	0.03	1.5	S>L
Osborn & Akoh, 2004	oil/caprylic acid (10 or 30%)	Phosphate buffer	WPI or sucrose esters	0.26	2.7	No significant effect
Azuma, 2009	Soybean oil (0.5%)	Water	Sucrose ester or polyglycerol ester	6.6-7.4	37.2-37.5	S <l< td=""></l<>
Azuma et al., 2009	Fish oil (0.5%)	Water	Sucrose ester or polyglycerol ester	6.6-7.4	37.2-37.5	S>L
Dimakou et al., 2007	Sunflower oil (30%)	Water	Na-caseinate	0.67	3.2	No significant effect
Imai et al., 2008	Methyl linoleate (0.75% v/v)	Phosphate buffer, pH 7.4	Decaglycerol monolaurate	0.02	8.0	S>L
Lee et al., 2011	Corn oil or fish oil (0.5 or 10%)	Phosphate buffer, pH 7.0	WPI	0.07	0.33	S <l< td=""></l<>

* : Oil volume fraction is expressed in g/100 g unless otherwise stated..

** :Droplet sizes is reported as volume-surface mean diameter $(d_{3,2})$.

*** : WPI, whey protein isolate.

Some obtained contradictory results when another compositional factor was varied (Azuma et al., 2009), and finally several observed an opposite effect: the oxidative stability of the O/W emulsions exhibiting smaller droplets was better than with larger ones (Imai et al., 2008;

Nakaya et al., 2005; Nakazawa et al., 2008; Ries et al., 2010). Indeed, when droplet size decreases, the number of lipid molecules per droplet decreases simultaneously and the number of surface-active molecules adsorbed at the interface increases. For relatively small droplets (for example around $0.1 \,\mu$ m), the interfacial region comprises a significant volume of the total droplet, especially for the thickest interfacial layers (McClements & Decker, 2000). If the surface-active molecules located at the interface act as a physical and/or chemical barrier against oxidation, decreasing the droplet size would favor this barrier effect against the prooxidants of the aqueous phase and the activity of adsorbed antioxidants. In addition, it possibly limits the propagation of the reaction due to the low number of oxidizable molecules per droplet. In addition, one should remark that at constant composition of the emulsions, when the droplet size decreases, the amount of unadsorbed emulsifier present in the aqueous phase thereby decreases. These non-adsorbed emulsifier can also modify oxidation kinetics as detailed later in this paper. It remains that the influence of droplet size on lipid oxidation in O/W emulsions clearly depends in a large extent on other structural and compositional parameters of the systems.

4.2. Oil phase volume fraction

In O/W emulsions, the volume fraction of the oil phase also influence lipid oxidation. When oil volume fraction increased from 10 to 30% v/v (Osborn & Akoh, 2004); from 5 to 40% v/v (Sun & Gunasekaran, 2009) or from 5 to 30% (Kargar et al., 2011), lipid oxidation decreased significantly. In the first study, droplet size reported as volume-surface mean diameter $(d_{3,2})$ increased (0.26 to 0.37 µm or 1.09 to 1.98 µm, depending on the emulsifier nature and homogenization conditions) with increasing oil fraction, whereas the opposite was observed in the second study (1.60 to 0.80 µm or 1.10 to 0.60 µm, depending on the emulsifier concentration). Kargar et al. (2011) divided the amounts of oxidation compounds by the total interfacial area to eliminate a possible effect of the droplet size, but one may remark that this procedure could have amplified a barrier effect of the adsorbed molecules as proposed above. Several hypotheses have been proposed to explain the influence of oil phase volume fraction on lipid oxidation. First, increasing the oil fraction decreases proportionally the aqueous phase fraction and so the amount of hydrophilic prooxidant compounds such as metals. The number of free radicals generated per droplet could therefore increase as the droplet concentration decreases. Sun & Gunasekaran (2009) also suggested that increasing the oil phase volume fraction from 5% to 40% appreciably increased the creaming stability, which was evoked as a possible explanation for the better oxidative stability of the high oil phase volume fraction emulsions. Kiokias et al. (2006) also observed a decrease of lipid oxidation in O/W emulsions when increasing the oil phase volume fraction from 10 to 40% of emulsion. An increase in the mean droplet diameter from approximately 0.5 to 1.5 μ m was also measured when the oil phase volume fraction increased. Thus, one cannot exclude that the developed interfacial area could also have influenced oxidation. The diffusion rate of oxygen and other reactants within the emulsion may be a limiting factor when a high oil volume fraction is used, and may also increase when the system is incubated under agitation (Genot et al., 2003).

4.3. Composition of the oil phase

As observed in homogeneous systems, lipid oxidation is generally favored by an increase of the unsaturation of the fatty material. Therefore, oxidation proceeds more rapidly when the oil phase contains fatty acids with more unsaturation in their hydrocarbon chain or when the total unsaturation of the oil is higher. For instance, Kiokias et al. (2006) observed that in emulsions prepared with different dietary oils, the formation of conjugated diene hydroperoxides increased with the LA content of the oils.

In contrast, in multiphase systems, the oxidizability of long chain PUFA does not necessarily increases with the unsaturation of their hydrocarbon chain. Experiments carried out on fatty acid ethyl esters solubilized in nonionic emulsifier micelles dispersed in an aqueous phase proved that oxidative stability of ethyl DHA was better than that of ethyl ALA, which was itself better than that of ethyl LA (Hirano et al., 1997). Similar results were obtained with free fatty acids (Miyashita et al., 1997; Miyashita et al., 1994). The authors suggested that the most unsaturated fatty acids would be buried more deeply within the hydrophobic core of the micelles, when dispersed in an aqueous phase. They would be therefore less susceptible to attack by aqueous phase prooxidants. This protective conformation adopted by long chain PUFA in multiphase systems was also evoked to explain the better oxidative stability of emulsified DHA-rich oil or triacylglycerols as compared to emulsified LA-rich oil or triacylglycerols (Azuma et al., 2009; Gotoh et al., 2010). In the former example, the better oxidative stability of fish oil emulsions was observed when oil droplets were the smallest, i.e. around 7 μ m instead of around 37 μ m.

Trace components naturally contained in commercial oils also modify the development of oxidation in emulsified oils. First of all, the antioxidants such as tocopherols naturally present in the oils are clearly involved in the emulsion oxidative stability. For instance, an important

lag phase was observed for an emulsified commercial sunflower oil that contained about 700 mg α -tocopherol kg⁻¹) but it was absent with the stripped oil (Villière, 2005). Other minor polar compounds removed from the oil phase during stripping could also influence the development of emulsified oil oxidation, due to their surface activity (Decker et al., 2010). The presence of free fatty acids in emulsified oil was demonstrated to increase lipid oxidation, which could be related to their location at the interface and the increased negative net charge of the oil droplets which is postulated to attract metal ions onto the oil droplet surface (Waraho et al., 2009; Waraho et al., 2011a).

The effect of the physical state of emulsified lipids, i.e. the solid fat content, on oxidation has been scarcely investigated. Okuda et al. (2005) highlighted that an emulsified octadecane/methyl linolenate mixture was more prone to metal-catalyzed oxidation when octadecane was in a solid state than in a liquid state. The authors suggested that methyl linolenate could have migrated towards the exterior of oil droplets throughout the crystallization of octadecane, thus being more accessible to the metal ions of the aqueous phase. More recently, the rate of transport of oxygen and free radicals from the aqueous phase to the core of oil droplets as a function of the physical state of the oil phase was investigated (Tikekar & Nitin, 2011). This study highlighted that the solid state of the oil phase decreased only slightly the rate of oxygen transport as compared to the liquid state, whereas the transport of peroxyl radicals was not affected. As previously stated (Okuda et al., 2005), this poor protective effect of the oil phase solid state can be explained by the expulsion of the oxidizable lipophilic compounds towards the periphery of lipid droplets, thus exposing them more easily to the prooxidant compounds of the aqueous phase.

Finally, it is worth mentioning that the composition of the lipid phase evolves during the lipid oxidation reaction, which leads to the formation of numerous products with various reactivity and hydrophobicity. The incorporation of lipid hydroperoxides in hexadecane decreased substantially the interfacial tension at the hexadecane/water interface (Nuchi et al., 2002). Lipid hydroperoxides being surface-active, they are thus able to migrate to the oil/water interface, such being accessible to the water-soluble prooxidants (Decker & McClements, 2001). This phenomenon is presumably of importance in the development of lipid oxidation in food emulsions, whose components generally contain trace hydroperoxides and metal ions.
5. Physico-chemical factors related to the aqueous phase involved in lipid oxidation

5.1. pH

Among the physico-chemical characteristics of the aqueous phase that impact the oxidative stability of emulsions, pH influences the charge, the solubility, the partitioning, the redox state and the chemical stability of major actors in oxidative reactions such as metal ions, antioxidants, biopolymers (proteins and charged polysaccharides).

The influence of pH on lipid oxidation in O/W emulsions has been experimentally investigated with contrasted results. Haahr & Jacobsen (2008) showed that, irrespective of the emulsifier type (Tween 80, citric acid ester, sodium caseinate or lecithin) and iron addition, the formation of peroxides and volatiles was always faster at pH 3.0 than at pH 7.0. An increased oxidation when decreasing pH was as well highlighted in Tween 80 and citric acid ester-stabilized emulsions (Sorensen et al., 2008) and in sodium dodecyl sulfate (SDS)-stabilized emulsions (Mei et al., 1998b). The higher solubility of iron was suggested to be partly responsible for the increased oxidation at low pHs. In addition, in the presence of both chelators and reducing agents, a low pH could promote the activation of metal ions due to their displacement from chelators that made them inactive at higher pH.

On the other hand, a prooxidative effect of higher pHs in emulsions stabilized with low molecular weight emulsifiers such as Tween 20 or SDS was sometimes observed (Huang et al., 1996b; Mancuso et al., 1999b). It was proposed that at pH 7.0, the low iron solubility could result in the precipitation of metal onto the lipid droplet interface, thereby bringing iron in closer contact with the lipid phase compared to pH 3.0 (Mancuso et al., 1999b).

The pH of the aqueous phase also determines the charge of acid and alkaline species or groups according to their dissociation constants. Electrostatic attractions or repulsions at the molecular or colloidal levels can thus be modulated by pH and modify oxidation kinetics. For instance, the net charge of proteins is negative when they are dissolved at pH above their isoelectric point (pI) and the reverse is observed at pH < pI. Osborn-Barnes & Akoh (2003) found that copper-catalyzed lipid oxidation in WPI-stabilized emulsions proceeded lower at pH 3.0 than at pH 7.0. In accordance with the earlier work of Donnelly et al. (1998), they suggested that at pH 7.0 WPI-stabilized droplets are negatively charged, thus able to attract positively charged transition metals which promote oxidation. In addition, the antioxidants used in this study (α -tocopherol and/or citric acid) were suggested to be more effective at pH 3.0 than at pH 7.0. However, the effect of pH on oxidation of protein-stabilized O/W

emulsions is not so obvious as a prooxidative effect of pH 4.0 as compared to pH 6.5 was highlighted in bovine serum albumin-stabilized emulsions (Villière, 2005; Villière & Genot, 2006). This effect presumably depends also on the distribution of proteins between the aqueous phase and the oil/water interface. WPI-stabilized emulsions were found to oxidize only slightly faster at pH 7.0 than at pH 3.0 (Faraji et al., 2004). On the opposite, when emulsions were washed and the aqueous phase replaced by fresh buffer, lipid oxidation decreased slightly at pH 3.0 and increased dramatically at pH 7.0.

To conclude, in multiphase systems pH may have a positive or negative effect on lipid oxidation through a wide range of underlying mechanisms; this effect, which is more or less based on the interactions between reactants at the interface depends, among others, on the composition of the system.

5.2. Salts and small solutes

The presence of salt (NaCl) is the aqueous phase of O/W emulsions can dramatically affect their physical properties (flocculation, creaming). A few studies have as well demonstrated that the presence of salt and the ionic strength of the aqueous phase of O/W emulsions can modulate their oxidative stability. In the presence of only trace iron, salt was shown to decrease the lipid oxidation rate in emulsions, which was attributed to the inhibition of the binding of metal ions at the droplet surface (Mei et al., 1998a). On the opposite, when iron was added in emulsions, high concentrations (0.17 M) of salt increased the lipid oxidation rate probably by increasing the catalytic activity of iron (Mei et al., 1998b). The prooxidant effect of NaCl in the aqueous phase of emulsions (0.5 M) was also observed in the presence of copper (Osborn-Barnes & Akoh, 2003). The effect of several salts (NaCl, KCl, NaNO₃, CaCl₂, Na₂SO₄, K₂SO₄, Ca(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂ and NaH₂PO₄) on the oxidation of liposomes catalyzed by iron was investigated (Mozuraityte et al., 2006). Neither the tested cations (Na⁺, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) nor the SO₄²⁻ and NO₃⁻ anions influenced lipid oxidation, whereas the Cl⁻ and H₂PO₄⁻ anions decreased the oxidation rate of the liposomes. The authors hypothesized that the antioxidant effect of chloride salts could be attributed to their ability to increase the Zeta potential of the droplets. This of phosphate salts could result from their iron chelation properties. Accordingly, antioxidant activity of phosphate buffer has already been shown (Yoshimura et al., 1992). These data can also be brought together with the antioxidative effect of potassium carbonate and potassium acetate in bulk oils, whereas no effect was detected for NaCl and KCl (Calligaris & Nicoli, 2006). The antioxidant activity of the salts was attributed

to the antichaotropic anionic species present in the media, which would interact with hydroperoxides through hydrogen bonds. Other buffers, for example Tris, Hepes, Mops buffers might also intervene in lipid oxidation through a presumable free radical scavenging activity (Fiorentini et al., 1989; Tadolini, 1987; Yoshimura et al., 1992).

Selected polyols, namely fructose, sucrose, raffinose, sorbitol and mannitol incorporated in the aqueous phase of emulsions (16% w/w) have been shown to exert an antioxidant activity (Faraji & Lindsay, 2004). The proposed mechanism is the establishment of interactions between these polar components and metal ions or hydroxyl radicals. As previously mentioned (Sims et al., 1979), the authors suggested that the increased viscosity of the aqueous phase in the presence of polyols could also participate in the improved oxidative stability of emulsions by decreasing the oxygen diffusion rate. However, this assumption looks very unlikely, because macroscopic viscosity does not reflect the diffusion property of small solutes in biopolymer networks (Wang et al., 1998).

5.3. Metal chelators

As already mentioned, the aqueous phase of O/W emulsions can contain molecules which exhibit metal chelating activities, and are able to decrease in a great extend lipid oxidation. This can be considered as the first and very convincing evidence of the prooxidative effect of metal ions present in the emulsion aqueous phase and of the strategic influence of the interface in the oxidation of the lipid phase. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) has an antioxidant effect in O/W emulsions (Cho et al., 2003; Djordjevic et al., 2004; Jacobsen et al., 2001; Kellerby et al., 2006b; Lee & Decker, 2011; Let et al., 2007a; Mancuso et al., 1999b; Nielsen et al., 2004), which is attributed to its ability to chelate trace metal ions in the aqueous phase and to maintain them far from the interface. EDTA or sodium tripolyphosphate incorporated in O/W emulsions were even shown to induce the transfer of iron initially contained in the oil phase to the aqueous phase, thus decreasing lipid oxidation (Cho et al., 2003). However, the efficiency of EDTA to decrease oxidation is also dependent on several factors. Mei et al. (1998a) showed that the antioxidant efficiency of EDTA was maximum when used in high enough concentrations to inhibit the iron-oil droplets association. This highly concentration-dependant efficiency of EDTA was again recently observed (Lee & Decker, 2011). Haahr & Jacobsen (2008) observed a limited effect of EDTA on peroxide formation in emulsions but a reduction of volatile formation irrespective of pH (pH 3.0 vs pH 7.0), except in emulsions stabilized by lecithin and caseinate at pH 7.0 where it revealed to favor production of some volatile compounds. The authors underlined first that the chelator may not necessarily prevent the formation of peroxides in the initial oxidation stages, but could decrease the metal-catalyzed breakdown of already present peroxides, and second that the binding of metals to EDTA also depends on pH. Citric acid based chelating agents can also contribute to reduce lipid oxidation in O/W emulsions (Fomuso et al., 2002b; Serfert et al., 2009), even if it has been suggested that they were less efficient than EDTA, for example (Cho et al., 2003; Djordjevic et al., 2004). Other molecules, such as proteins or polysaccharides also exert a metal chelating activity that intervenes in the development of lipid oxidation as detailed below.

However, the antioxidant effect of chelators is only observed when a high molar ratio to metal ions is applied. An equimolar mixture of EDTA and iron favors the development of lipid oxidation in O/W emulsions (Mahoney & Graf, 1986; Samokyszyn et al., 1990). The equimolar complex allows the concomitant presence of different valence states of iron, which is necessary to initiate efficiently lipid oxidation (eq. 4, 5) (Minotti & Aust, 1992; Cheng & Li, 2007). A neutral pH would also favor the prooxidant activity of iron/EDTA complex because at this pH it has a free coordination site available for redox reaction (Mahoney and Graf, 1986; Haahr & Jacobsen, 2008).

6. The interface and the oxidative aqueous phase-interface interrelationships

The interface is the place where unsaturated fatty acids, atmospheric oxygen diffusing through the aqueous phase and hydrophilic molecules get into contact. The interfacial region is therefore postulated as being the critical area where the oxidation of the lipid phase is promoted (McClements & Decker, 2000).

6.1. Droplet charge

The electric charge of the interface, which is determined by both the composition of the droplet interfacial layer and the pH and ionic strength of the aqueous phase, is considered as a main factor in controlling oxidation (Mancuso et al., 1999b; McClements & Decker, 2000; Mei et al., 1998b). In fact, positively charged droplets are thought to be able to repel positively charged metal ions such as Fe^{2+} , whereas negatively charged droplets would attract them and favor oxidation, as it was repeatedly observed in emulsions stabilized by anionic,

cationic and non-ionic surfactants (Choi et al., 2010; Mancuso et al., 1999b; Mei et al., 1998b). In contrast, another study showed a worse oxidative stability with a cationic surfactant, dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) than with anionic (SDS) or nonionic (Brij 35) surfactants (Fisk et al., 2008). The reasons why the cationic emulsifierstabilized emulsions were less stable are unknown, even if it was supposed that DTAB may have contained trace amounts of hydroperoxides. Other anionic emulsifiers have been reported to induce less oxidation than nonionic emulsifiers. As discussed before, citric acid ester (Citrem) has been found to reduce oxidation in emulsions in comparison with Tween 80 (Sorensen et al., 2008). In that case, the effect was attributed to the metal chelating properties of citric acid esters, which would avoid the oxidative damage of the lipid phase caused by the negatively charged iron attracted at the interface. Citrem being presumably partitioned between the aqueous phase and the oil/water interface, one could hypothesize that (i) aqueous phase Citrem would chelate metal ions and therefore prevent them from reaching the droplet surface, and/or (ii) iron chelation by both adsorbed and unadsorbed Citrem would inactivate the metal prooxidant activity, probably through the inactivation of the Fenton reaction (eq. 6) and the redox cycles involved in metal-catalyzed lipid oxidation.

However, further investigations on the droplet charge effect should be interesting. In fact, since proteins are positively charged under their isoelectric point, protein-stabilized droplets are usually considered, at low pHs, to repel prooxidant metal ions and thus to inhibit lipid oxidation (Fomuso et al., 2002a; Hu et al., 2003a; Kellerby et al., 2006a). However, the charge of protein-stabilized droplets is probably not the main factor involved in emulsion oxidation. Indeed, it has been shown that a WPI-stabilized emulsion, whose zeta potential was twice higher than that of a casein-stabilized emulsion, had a worse oxidative stability than this latter emulsion (Hu et al., 2003b). Similarly, bovine serum albumin (BSA)-stabilized emulsions were found to oxidize faster at pH 4.0 where BSA is positively charged, than at pH 6.5 where BSA is negatively charged (Villière, 2005; Villière & Genot, 2006).

All these data highlight the role played the other major compounds present in the emulsified systems, namely the emulsifiers.

61

6.2. Monolayer interfaces

6.2.1. Emulsifier type

One of the factors influencing strongly the characteristics of the interfacial region and lipid oxidation in emulsions is the nature of the emulsifier molecules (Mancuso et al., 1999b; Sorensen et al., 2008).

Protein emulsifiers versus *low molecular weight emulsifiers (surfactants)*. Protein emulsifiers are generally more effective against lipid oxidation than many non-protein emulsifiers (Elias et al., 2008). For example, whey protein isolate (WPI) has been shown to be antioxidative in comparison to sucrose esters (Osborn & Akoh, 2004) or to Tween 20 (Donnelly et al., 1998), as evidenced by peroxide value (PV) and anisidine value (AV), and PV and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) formation, respectively. This protective effect of WPI was attributed in these papers to its ability to inactivate free radicals, and to the positive charge of the WPI-covered droplets at pH 3.0, which decreases the likelihood of interactions with iron. Fomuso et al. (2002a) also showed that hydroperoxide formation was slowed down in emulsions stabilized with WPI as compared to emulsions stabilized with other emulsifiers such as sucrose esters, mono-diacylglycerols or Tween 20. The better antioxidative effect of proteins compared to non-protein emulsifiers was also highlighted with casein (Haahr & Jacobsen, 2008), which formed emulsions with a better oxidative stability than emulsions stabilized with non-protein emulsifiers such as Tween 80 or citric acid ester.

Protein emulsifiers. The effect of different protein emulsifiers on lipid oxidation has been investigated. The thick interfacial layers formed by casein as compared to other proteins as whey proteins have been postulated to contribute to the good oxidative stability of O/W emulsions stabilized by this protein. Accordingly, hydroperoxide formation was decreased in emulsions stabilized by casein in comparison with WPI- or soy protein isolate (SPI)-stabilized emulsions (Hu et al., 2003b). Indeed, in this study, proteins were partly located in the aqueous phase, and the antioxidative effect of casein could be also due to metal chelation in the continuous phase by these proteins as discussed below. Villière et al. (2005) observed a better oxidative stabilized emulsions, emulsions being prepared at pH 6.5. They suggested that this phenomenon is due to the high iron binding ability of sodium caseinate that allowed a fraction

of the metal ions to be located at the interfacial region, where they would participate in the initiation of lipid oxidation. In addition, BSA could have an antioxidative role since it contains a sulfhydryl group which can react with free radicals. In contrast with these results, when EDTA was added to the same emulsions, oxidation was significantly delayed, but it developed far more rapidly in the SAB stabilized-emulsions than in the caseinate-stabilized ones. In these conditions, where metal ions are kept in the aqueous phase thanks to the water-soluble chelator, it was postulated the caseinate exerted strong free radical quenching activity, as demonstrated by electron-spin resonance in the presence of nitroxide probe. However, one cannot exclude that the thicker interface layer could also participate in this protective effect.

Hu et al. (2003b) compared the oxidizability of emulsions stabilized with casein, WPI or SPI. The oxidative stability of these emulsions at pH 3.0 was in the order casein > WPI > SPI as determined by both hydroperoxide and propanal formation. The droplet charge did not seem to be involved in this ranking since the Zeta potential of the emulsion droplets stabilized with WPI was almost twice higher than this of the casein- and SPI-stabilized emulsion droplets. As mentioned before, one of the factors that could explain the better oxidative stability of caseinstabilized emulsions is the thicker interfacial layer formed with this protein. Another possible factor lies in the amino acid composition of the proteins. The free sulfhydryl groups of the proteins were probably not involved here since casein does not contain free cysteine. Other amino acids already reported to participate in the antioxidant activity of proteins (tyrosine, methionine and proline) are present at higher levels in casein than in WPI and SPI (Hu et al., 2003b). Kiokias et al. (2006) also compared the oxidizability of sodium caseinate and whey protein concentrate (WPC)-stabilized emulsions prepared at pH 7.0. Contrary to Hu et al. (2003b), they observed a better oxidative stability with WPC than with sodium caseinate, as determined by the formation of conjugated dienes hydroperoxides. They proposed that sulfhydryl groups in WPC were exposed due to partial denaturation of the proteins during the homogenization process and thus favored the hydrogen-donating antioxidant activity of the protein. In addition, they observed that in emulsions prepared with increasing levels of protein emulsifier, droplet size decreased and oxidative stability increased. They suggested that an increase in protein concentration led to thicker layers at the interface and that a stronger protein network may act as a more effective interfacial barrier against the attack of prooxidant initiators. However, the actual surface coverage was not measured in this study and WPC contained only 75% protein, so there might be some other molecules among its components impacting lipid oxidation.

Another study investigated the differences of oxidizability in emulsions stabilized by WPI, sweet whey (SW), BLG or α -lactalbumin at pH 3.0 (Hu et al., 2003a). The better oxidative stability was obtained with the SW- and BLG-stabilized emulsions. For the first one, this result was explained by the ability of some SW components such as citrate, phosphate and casein phosphopeptides to inhibit lipid oxidation. For the second one, several hypothesis were put forward, including amino acid composition and interfacial layer thickness (Hu et al., 2003a).

Native and thermally, high pressure-treated or cross-linked proteins. The effect of the interfacial protein cohesiveness has also been investigated by several authors. Some results indicate that increasing the cohesiveness of protein layers at the interfacial region in O/W emulsions is not an effective way to decrease lipid oxidation whereas some others contradict this assumption. For instance, whey proteins were thermally denaturated to induce the rearrangement of protein molecules and the formation of a thicker, more cohesive layer surrounding the oil droplets. It did not induce significant differences in lipid oxidation between emulsions stabilized with native or heat-denaturated WPI (Djordjevic et al., 2004) or BLG (Kellerby et al., 2006b). On the same way, cross-linking of interfacial casein induced by transglutaminase increased the cohesiveness of the interfacial layer of a casein-stabilized O/W emulsion, but did not improve the oxidative stability of the emulsion (Kellerby et al., 2006a). Tikekar et al. (2011) showed that the chemical cross-linking of WPI in O/W emulsions did not decrease the oxygen diffusion coefficient at the oil/water interface, as compared to native WPI.

In contrast, heat-denaturation of BLG improved the oxidative stability of fish oil-enriched milk emulsions (Let et al., 2007b; Sorensen et al., 2007). These authors showed that applying higher pressure (22.5MPa) and temperature (72°C) during milk homogenization resulted in a better oxidative stability than that of milk homogenized under lower pressure (5MPa) and temperature (50°C). Higher homogenization temperature favors changes in the conformation of proteins. BLG, which contains free sulfhydryl groups exhibiting antioxidant and radical scavenging properties, starts to unfold above 65°C (Let et al., 2007b). Sorensen et al. (2007) also suggested that the interface would be better covered with unfolded BLG than with intact casein micelles.

Polysaccharides. Some polysaccharides such as gum arabic are surface-active and are therefore used as emulsifiers. Gum arabic has been shown to have an antioxidant effect

(Matsumura et al., 2000), which was attributed to the formation of a steric barrier around the oil droplets. The coating of oil droplets with the cationic polysaccharide chitosan increased the oxidative stability of the emulsion, whereas the subsequent coating of the droplets with the anionic polysaccharide alginate had an opposite effect (Gudipati et al., 2010). In this example, the effect seemed to be related to the surface charge of the droplets. This charge effect, however, seems not to be always predominant since the coating of oil droplets with the anionic polysaccharide pectin was shown to protect O/W emulsions against oxidation (Chen et al., 2011a). In that case, it was hypothesized that the attraction of metal ions to the droplet surface induced by the negative surface charge was counteracted by the steric barrier provided by the pectin coating.

Low molecular weight emulsifiers. Phospholipids are also amphiphilic molecules which are able to adsorb at the interfacial region and are used as emulsifiers in oil-in-water emulsions. Phospholipids are also generally considered as synergists in reinforcing the antioxidant activity of some phenolic compounds because of their effective metal chelating properties (Frankel, 2005). Emulsions stabilized by lecithins were less oxidizable than emulsions stabilized by sucrose esters or mono-diacylglycerols (Fomuso et al., 2002a) or by Tween 80 or citric acid ester (Haahr & Jacobsen, 2008). Lecithin could also protect lipophilic compounds such as β -carotene against oxidative degradation in O/W emulsions (Helgason et al., 2009).

Other properties of low molecular weight emulsifiers may influence lipid oxidation, such as metal chelating or free radical scavenging properties. Sorensen et al. (2008) showed that citric acid ester decreased slightly the oxidation of an emulsified PUFA-rich oil, in comparison to Tween 80. Indeed, metal chelating is a well-known property of citric acid esters (Let et al., 2004).

The influence of the hydrophobic tail group size of surfactants on lipid oxidation was investigated on salmon O/W emulsions stabilized by Brij-lauryl or Brij-stearyl (Chaiyasit et al., 2000). They observed that lipid oxidation was slightly lowered in the Brij-stearyl-stabilized emulsions as compared to the Brij-lauryl-stabilized emulsions. The authors suggested that the longer tail group size could have decreased the ability of free radicals to reach the unsaturated fatty acids contained in the oil phase. It was speculated that (i) the thicker barrier provided by the longer hydrophobic tail groups could prevent free radicals from reaching the fatty acids in the lipid core or (ii) the surfactant tail groups would be tighter packed with increasing their carbon number. This tighter packing could prevent the transfer of

free radicals in the oil droplets, and could decrease the ability of unsaturated fatty acids to locate close to the interfacial region (Chaiyasit et al., 2000). These hypotheses would require to be experimentally supported.

Another study investigated the influence of the headgroup size of surfactants on lipid oxidation in O/W emulsions. Emulsions were stabilized by Brij 76 or Brij 700. Results showed that emulsion oxidizability was greater in the emulsions stabilized with the surfactant having the smallest headgroup, indicating that a larger surfactant headgroup may decrease lipid oxidation (Silvestre et al., 2000).

6.2.2. Emulsifier concentration

As evoked above, not only the emulsifier nature, but also its concentration in the emulsions, or the total amount of emulsifier used to emulsify the same amount of oil, may intervene in the oxidative reactions.

For instance, when the concentration of emulsifiers such as WPI, soybean lecithin, Tween 20 and mono-diacylglycerol was increased from 0.25 to 1 g/100 g, the amounts of hydroperoxides produced during incubation of highly polyunsaturated oil-based emulsions decreased (Fomuso et al., 2002a). A similar effect was noticed when Tween 20 concentration was increased from 0.003 to 0.1 g/100 g (Ponginebbi et al., 1999), WPI concentration from 0.2 to 2 g/100 g (Sun & Gunasekaran, 2009) or sodium caseinate concentration from 0.5 to 2 g/100g (Kiokias et al., 2006). Hu et al. (2003b) also showed that increasing casein concentration from 0.5 g/100 g to 1.5 g/100 g doubled the lag time for hexanal formation in a corn oil emulsion. It was proposed that at higher surfactant concentrations, the packing of emulsifier molecules at the oil-water interface is tighter; hence, the interfacial region acts as an more efficient barrier to the diffusion of lipid oxidation initiators into the oil droplets (Coupland et al., 1996). An increase in protein concentration in O/W emulsions accordingly resulted in higher surface concentration (Ye, 2008) and thicker layers at the interface (Kiokias & Bot, 2006).

The increase of emulsifier concentration or amount, without changing the emulsification step, provokes a decrease of the droplet size (Kiokias et al., 2006; Sun & Gunasekaran, 2009; Ponginebbi et al., 1999). This decrease of droplet size is limited by the input energy and by the aptitude/rate of emulsifiers to adsorb at the interface generated by the process. In the final emulsion prepared with higher amounts of emulsifier, the concentration of unadsorbed emulsifier is also higher in the aqueous phase. In the case of surfactant emulsifiers, excess

emulsifier probably equilibrates between monomers, micelles, mixed micelles or very small droplets in which small amounts of lipid phase may also be incorporated. It was postulated that the unsaturated fatty acids present in these structures could be protected against oxidation (Ponginebbi et al., 1999). More generally, it is clear that these compounds and/or colloidal structures dispersed in the aqueous phase of the emulsions may modify the oxidation process.

6.2.3. Emulsifiers and other biopolymers in the aqueous phase

Emulsifiers and biopolymers present in the aqueous phase of emulsions are generally assumed to partly govern oil droplet-aqueous phase exchanges, modifying the access of oxygen and prooxidant molecules to the oil phase through the interface.

Proteins and surfactants. Protein and surfactant emulsifiers in the aqueous phase of emulsions can reduce lipid oxidation, through different mechanisms (Genot et al., 2003; Elias et al., 2008). Faraji et al. (2004) and Ries et al. (2010) demonstrated that washed O/W emulsions oxidized faster than the corresponding unwashed emulsions containing unadsorbed proteins. This effect may be explained by the physico-chemical properties of unadsorbed emulsifiers. First, proteins can act as metal chelators or metal binders. This was demonstrated for caseins (Diaz et al., 2003; Hu et al., 2003b; Rival et al., 2001; Sorensen et al., 2007), whey protein isolate (WPI) (Faraji et al., 2004; Tong et al., 2000), BLG (Elias et al., 2007) and sodium caseinate (Faraji et al., 2004; Guzun-Cojocaru et al., 2011; Haahr & Jacobsen, 2008; Sugiarto et al., 2010; Villière et al., 2005). However, protein ability to bind metal ions generally depends on its charge, which is influenced by pH. Indeed, above their isoelectric point, proteins in the aqueous phase are anionic, hence able to bind positively charged ferrous ions (Faraji et al., 2004; Kellerby et al., 2006b). Metal chelation would thus inhibit hydroperoxide decomposition either by preventing cationic prooxidants from attaining close proximity to hydroperoxides at the emulsion droplet interface or by decreasing the reactivity of iron. Hu et al. (2003b) suggested that unadsorbed casein in the continuous phase of O/W emulsions could exert a metal chelating activity even at low pHs because of its phosphoseryl groups which are still negatively charged at these pHs. This may explain the better oxidative stability of caseinstabilized emulsions under acidic conditions. Proteins also exhibit free radical scavenging activity, which had been demonstrated for caseins and sodium caseinate (Clausen et al., 2009; Villière et al., 2005), as well as for more unusual proteins like potato proteins (Cheng et al., 2010; Habeebullah et al., 2010). In the same way, at neutral pH, soy protein isolate (SPI) had a better antioxidative ability than casein, which was itself more effective than WPI (Faraji et al., 2004). The antioxidant activity of SPI and WPI in the aqueous phase was attributed in this study to their sulfhydryl groups. At last, the greatest antioxidant activity of SPI may be also explained by the presence of an isoflavone associated with the protein (Faraji et al., 2004).

Donnelly et al. (1998) showed that addition of Tween 20 or WPI in the aqueous phase of a fish oil emulsion stabilized with Tween 20 increased lipid oxidation. When both emulsifiers were added in the aqueous phase, a decrease of oxidation was noticed. Although it is unknown why this combination inhibited lipid oxidation, it has been suggested that the ability of some surfactants to alter protein conformation could increase the accessibility of the free radical scavenging amino acids (cysteine and tyrosine) or of the iron chelating amino acids. Tryptophanyl, cysteyl, methionyl and tyrosyl residues are able to scavenge some aqueous phase radical species, thereby conferring improved oxidative stability to oil-in-water food emulsions (Elias et al., 2006; Elias et al., 2005). Methionyl residues could reduce hydroperoxides to low reactive species (Gardner, 1979). However, the ability of amino acid residues to scavenge free radicals depends also on the tertiary structure of the protein. Indeed, when not sufficiently surface-exposed, the residues may be physically unable to participate in free radical scavenging (Elias et al., 2005).

In Tween 20-stabilized emulsions, excess Tween 20 in the aqueous phase had a protective effect against the oxidation of free linoleic acid. In this case, this effect could be due to the displacement of interfacial linoleic acid by Tween 20, providing a compact non-charged layer separating the negatively charged substrate and the positively charged iron in the water, and/or by formation of mixed micelles with linoleic acid (Ponginebbi et al., 1999).

The contribution of unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase of O/W emulsions is presumably of huge importance in many studies investigating the effect of compositional parameters on the oxidative stability of emulsions. We estimated the amounts of unadsorbed emulsifiers in the emulsions prepared within several studies, from the amounts of emulsifiers used to prepare the emulsions, the average droplet size and the molecular area of emulsifiers at the interface found in the literature (Table 2). According to these estimations, the proportions of unadsorbed emulsifiers in the O/W emulsions were often higher than 70%, and even higher than 90% in some cases, whatever the oil volume fraction and the kind of emulsifier (proteins, surfactants) used to stabilize the emulsions.

68

Table 2. Estimated concentrations and proportions of unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase of O/W emulsions for practical examples encountered in the literature. Theoretical surface loads have been extracted from previous studies.

Article	Emulsifier, pH	Initial concentration in aqueous solution (g l ⁻¹)	Oil fraction (% v/v)	Average surface diameter (µm)	Theoretical surface load (g m ⁻²) *	Estimated amount of unadsorbed emulsifier in aqueous phase $(g l^{-1})$	Estimated % unadsorbed emulsifier
Fomuso 2002	Tween 20, 7.0	11.1	10	0.20	1.5	8.6	78
Fomuso 2002	WP, 7.0	11.1	10	0.20	2.0	7.8	70
Haahr 2008	Na-cas, 7.0	11.2	10	0.15	3.0	4.6	41
Hu 2003	Na-cas, 3.0	2.0	5	0.48	3.0	1.0	51
Hu 2003	Na-cas, 3.0	15.0	5	0.30	3.0	13.4	89
Hu 2003	WP, 3.0	2.0	5	0.29	2.0	0.9	46
Hu 2003	WP, 3.0	15.0	5	0.26	2.0	13.8	92
Kiokias 2006	Tween 20, 7.0	10.0	10	1.16	1.5	9.6	96
Kiokias 2006	WP, 7.0	10.0	10	1.15	2.0	9.4	94
Kiokias 2006	Na-cas, 7.0	10.0	10	1.16	3.0	9.1	91
Kiokias 2006	Na-cas, 7.0	5.0	10	1.52	3.0	4.3	87
Kiokias 2006	Na-cas, 7.0	20.0	10	0.70	3.0	18.6	93
Mora 2010	Casein, 7.0	10.0	5	0.38	3.0	8.8	88
Mora 2010	Casein, 7.0	5.0	1	0.67	3.0	4.9	97
Osborn 2004	WP, 7.0	5.6	10	0.54	2.0	4.3	78
Osborn 2004	WP, 7.0	7.1	30	1.35	2.0	5.2	73
Taherian 2011	WP, 6.8	10.3	3	0.34	7.0**	8.4	81
Villière 2005	BSA, 6.5	20.0	30	0.45	2.0	14.3	71
Villière 2005	Na-cas, 6.5	20.0	30	0.45	3.0	11.4	57

* from Atkinson & Dickinson, 1995; Dickinson, 1998; Bos & van Vliet, 2001; Ye, 2008.

** from Taherian et al., 2011.

BSA, bovine serum albumin; Na-cas, sodium caseinate; WP, whey proteins.

Polysaccharides. The effect of various polysaccharides incorporated in the aqueous phase of O/W emulsions on lipid oxidation has been investigated by several authors (Chen et al., 2010; Kishk & Al-Sayed, 2007; Matsumura et al., 2000; Shimada et al., 1994; Shimada et al., 1996; Sirendi et al., 1998; Sun et al., 2007). Some of the tested polysaccharides exhibited antioxidant effect, for example xanthan, bean gum, glucomannan, curdlan, gum arabic and pectin. This protective effect was generally attributed to the metal chelating and free radical scavenging properties of the polysaccharides.

6.3. Multilayer interfaces

Recently, an increasing interest has developed for the formulation of O/W emulsions stabilized with multilayer interfaces (Grigoriev & Miller, 2009) and for the chemical

properties of such systems, notably regarding their oxidative stability. An overview of the main studies carried out on the oxidative stability of multilayer interface-stabilized emulsions is summarized in Table 3. These systems are commonly designed by electrostatic layer-bylayer deposition. For the two layer-stabilized emulsions, the application of the second layer generally improved the oxidative stability of emulsions (Chen et al., 2011a; Djordjevic et al., 2007; Klinkesorn et al., 2005; Lesmes et al., 2010; Ogawa et al., 2003; Taherian et al., 2011). This effect was attributed to the electrostatic repulsions of metal ions when the second layer was positively charged. This hypothesis was strengthened by the work of Gudipati et al. (2010), who demonstrated that the coating of oil droplets with chitosan (positively charged) had a protective effect against lipid oxidation, whereas the consecutive coating of the droplets with alginate (negatively charged) decreased the oxidative stability of the emulsion. However, another study demonstrated that the coating of oil droplets with a second layer constituted of anionic pectin was as well protective against lipid oxidation, which was attributed to a steric barrier effect (Chen et al., 2011a). The coating of oil droplets with multilayers also allows to incorporate specific compounds at the droplet surface, for example antioxidants (Lomova et al., 2010).

Article	Lipid phase	Aqueous phase	First layer	Second layer	Third/ further layer(s)	Conclusion
Ogawa, 2003	Corn oil (1%)	Acetate buffer, pH 3.0	Lecithin (-)	Chitosan (+)	-	Better oxidative stability when the second layer is applied.
Klinkesorn, 2005	Tuna oil (5%)	Acetate buffer, pH 3.0	Lecithin (-)	Chitosan (+)	-	Better oxidative stability when the second layer is applied.
Djordjevic, 2007	Hexadecane + citral or limonene (3% total)	Acetate buffer, pH 3.0	Sodium dodecyl sulfate (SDS) (-)	Chitosan (+)	-	Better oxidative stability when the second layer is applied; better oxidative stability as compared with a gum arabic-stabilized emulsion.
Katsuda, 2008	Menhaden oil (1%)	Phosphate buffer, pH 3.5	BLG (+)	Citrus pectin or sugar beet pectin (-)	-	Better oxidative stability when the second layer is applied (except with sugar beet pectin which contains metal ions).
Gudipati, 2010	Fish oil (5%)	Acetate buffer, pH 3.5	Citrem (-)	Chitosan (+)	Alginate (-)	Better oxidative stability with Citrem/chitosan than with Citrem alone or Citrem/chitosan/alginate
Lesmes, 2010	Menhaden oil (10%)	Phosphate buffer, pH 7.0	Caseinate (-)	Lactoferrin (+)	-	Better oxidative stability when the second layer is applied.
Lomova, 2010	Linseed oil (5% v/v)	Water	BSA (-)	Poly- arginine	Dextran sulfate or tannic acid	Efficient protection of oil droplets against oxidation by multilayer shell containing tannic acid
Chen, 2011a	Corn oil (5%)	Phosphate buffer, pH 3.0 to 5.0	Silk fibroin (slightly +)	Beet pectin (-)	-	Better oxidative stability when the second layer is applied.
Taherian, 2011	Fish oil (3%)	Phosphate buffer, pH 3.4 or 6.8	WPI (+) pH 3.4 (-) pH 6.8	Fish gelatin (FG) (+) pH 3.4 (~0) pH 6.8	-	Better oxidative stability when the second layer is applied as compared to WPI- or FG- stabilized emulsions at both pHs

Table 3. Synthesis of the formulation parameters and of the oxidative stability of multilayerstabilized O/W emulsions. Oil volume fractions are expressed in g/100 g unless otherwise stated. Each reference is reported as the name of the first author and publication year.

(-), (+), (slightly +) or (~0) indicate the electrostatic charge of the layer in the considered conditions.

6.4. Antioxidant compounds located at the interface

The prevention of lipid oxidation through the use of antioxidants has been extensively described and discussed in the literature for decades (Frankel, 1996; Frankel, 2005; Hunneche et al., 2008; Laguerre et al., 2007; Porter, 1980; Uri, 1961). The objective of this paragraph is therefore not to make an exhaustive review of the existing applications of antioxidants in

model food emulsions, but rather to highlight the main current trends and research axes in this area, with a focus on the emerging interest for the localization of antioxidants at the oil/water interface.

Antioxidants may be naturally contained in vegetable oils or supplied in the processed food products, which is a widely used strategy to counteract oxidative degradations. Several kinds of food-grade antioxidants exist, involving different action mechanisms. Briefly, we may distinguish synthetic from natural antioxidants (Porter, 1980). The latter class includes phenolic compounds (flavonoids, phenolic acids, phenolic alcohols, tocopherols, tocotrienols), ascorbic acid and carotenoids. Antioxidants can exert their protective effect through two main mechanisms. First, they can protect the oxidation substrates from the prooxidant compounds by preventing the formation of reactive oxygen species, chelating metals or scavenging free radicals. Second, they can interrupt the propagation step of lipid oxidation by reacting with peroxyl radicals, thus stopping the radical chain reaction. In multiphase systems, the location of the antioxidant is now recognized to be a major factor governing the antioxidant efficiency as these compounds (Heins et al., 2007; Laguerre et al., 2007). Early works, ending to the paradigm of the polar paradox, demonstrated that nonpolar antioxidants are generally more efficient than polar antioxidants in O/W emulsions presumably because they locate more easily at the oil/water interface (Cuvelier et al., 2000; Huang et al., 1996a; Huang et al., 1996c; Porter, 1980; Schwarz et al., 2000). It was assessed that beyond the selection of molecules with an appropriate polarity and oil/water partition coefficient, the location of the antioxidants at the oil/water interface in O/W emulsions may be reached applying different strategies. First, antioxidants may be selected for their ability to interact with the emulsifiers adsorbed at the oil droplet surface (Lorrain et al., 2010a; Lorrain et al., 2010b; Oehlke et al., 2010). However, the binding of the antioxidant to the emulsifier can also lead to a decrease of the antioxidant activity, which could result from the formation of hydrogen bonds counteracting the hydrogen-donating activity of the antioxidant (Pekkarinen et al., 1999; Stockmann et al., 2000). Another recent study demonstrated that the use of multilayers of emulsifiers to stabilize O/W emulsion allowed incorporating tannic acid within the emulsifier shell surrounding the oil droplets (Lomova et al., 2010). This formulation resulted in an improved emulsion oxidative stability as compared with multilayerstabilized emulsions containing tocopherols in the oil phase. Very recently, it was found that selected flavonoids formed solid particles that could locate at the oil/water interface in O/W emulsions, thus contributing to the physical stability of the system (Luo et al., 2011).

Although this work focused only on the physical stability of emulsions, the effect of such interfacial flavonoid particles on lipid oxidation should be of great interest.

Second, an increasing interest is currently encountered for the synthesis of lipophilized antioxidants, which exhibit amphiphilic properties. The lipophilization by alkyl chain esterification has been tested on various antioxidants: chlorogenic acid (Laguerre et al., 2009), rosmarinic acid (Laguerre et al., 2010), hydroxytyrosol fatty acids (Lucas et al., 2010; Medina et al., 2009). These studies generally highlighted that the esterified antioxidants exhibited a better antioxidative effect than the corresponding non-esterified molecules in O/W emulsions, with an optimum activity when the alkyl chain contained between 8 and 12 carbons. This observation was referred as the "cutoff effect", and was generally attributed to the enhanced surface activity of the antioxidant molecules and subsequent favored location at the oil/water interface.

7. Conclusion

Lipid oxidation leads to the degradation of the nutritional and sensory properties of formulated emulsions, especially those designed to contain polyunsaturated fatty acids. To optimize formulations avoiding the risks linked to lipid oxidation, innovative strategies that integrate a deep understanding of the involved phenomena are required. It includes being able to take in account the factors specific to the dispersed physical state of these systems.

This work also highlights that lipid oxidation in emulsified systems results from multiple phenomena occurring in the different phases of emulsions with complex interrelationships. Each factor intervening in the oxidation of O/W emulsions may impact other factors and *vice versa*. As shown in Figure 1, it is difficult to deconvoluate the effects of the imbricated parameters and most of them cannot be studied regardless of others. These interrelated effects could explain the discrepancies often observed from one study to another.





This review shows that the data about lipid oxidation in O/W emulsions available in the literature strongly support the hypothesis that the oil/water interface is critically involved in the development of the reaction. A physical barrier effect provided by protein-stabilized interfaces is notably repeatedly evoked. However, none of these studies related directly the development of lipid oxidation in emulsions to the physical and structural characterization of the involved interfaces. In addition, most of these studies have been performed in the presence of large amounts of unadsorbed emulsifiers, which suggests that the contribution of the unadsorbed fraction to lipid oxidation was substantially higher than this of the emulsifiers located at the interface. Therefore, one should conclude that the protective effect against lipid oxidation of the interfacial layer through its barrier properties has not yet been demonstrated even if some recent publications address the question.

Démarche adoptée

L'objectif du projet de thèse était de montrer que la structure de l'interface entre l'huile et la phase aqueuse peut être maîtrisée de façon à protéger les lipides en émulsion contre l'oxydation. Cette étude a été réalisée avec de l'huile de colza, 2^{ème} huile alimentaire la plus consommée en France après l'huile de tournesol. Cette huile contient des acides gras polyinsaturés à la fois des séries n-3 (environ 10% des acides gras totaux) et n-6 (environ 20% des acides gras totaux) dans des proportions assez proches des recommandations nutritionnelles. Des émulsions contenant 30% (p/p) d'huile de colza purifiée ont été formulées, cette proportion correspondant aux teneurs rencontrées dans certains aliments, par exemple les vinaigrettes allégées ou la crème fraîche. Les caractéristiques de la phase aqueuse de ces émulsions ont également été choisies pour leur pertinence vis-à-vis de produits alimentaires réels. Ainsi, les phases aqueuses contenaient 80 mM de NaCl et présentaient un pH de 6,7, ce qui correspond à la force ionique et au pH du lait. Quelques essais ont par ailleurs été réalisés à pH 3,0, ce qui correspond aux conditions rencontrées dans des produits alimentaires acides.

Dans une émulsion, les caractéristiques de l'interface dépendent fortement de la nature de l'émulsifiant utilisé. Nous avons choisi des protéines et des émulsifiants non protéiques qui nous ont permis de générer des monocouches interfaciales variées en termes d'épaisseur, d'homogénéité et de compacité. Le choix des émulsifiants a été basé sur différents critères : la diversité de leurs structures et de leurs propriétés physico-chimiques, le fait qu'il s'agisse de molécules bien connues et caractérisées et leur disponibilité. Ainsi, ont été utilisés l'albumine de sérum bovin (SAB), la β-lactoglobuline (BLG) native, dénaturée ou agrégée, la β-caséine (BCN), le monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 20), le monooléate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 80), un ester d'acide gras et d'acide citrique (Citrem), le monolaurate de sorbitane (Span 20), le monolaurate de glycérol (MLG) et la dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC). Afin d'être en mesure d'établir un lien entre l'oxydation des lipides dans les émulsions et les caractéristiques des interfaces, nous avons formulé des émulsions de façon à ce que la concentration d'émulsifiant non adsorbé soit la plus faible possible tout en obtenant des systèmes stables physiquement et présentant des distributions de taille des gouttelettes lipidiques proches. Dans ce cadre, la mise au point d'une méthode de quantification de la fraction d'émulsifiants non adsorbés a été nécessaire.

L'oxydation des lipides dans les émulsions a été étudiée dans des conditions permettant un suivi sur une durée relativement courte afin de minimiser les risques de déstabilisation physique des systèmes au cours de la période considérée. Une température d'incubation de 25°C a été sélectionnée pour correspondre aux conditions dans lesquelles les expériences de caractérisation physique des interfaces allaient être effectuées. Cette température étant relativement basse, il a fallu utiliser un initiateur chimique pour pouvoir mesurer les cinétiques d'oxydation des émulsions sur une durée assez courte (48 à 72 h). La plupart des expérimentations ont ainsi été conduites à 25°C, à l'obscurité, sous agitation rotative lente et en présence d'un mélange équimolaire de sulfate de fer (II) (FeSO₄) et d'acide tétra-acétique d'éthylène diamine (EDTA). Pour vérifier la validité des résultats obtenus dans ces conditions, des suivis d'oxydation ont été réalisés en présence d'autres initiateurs chimiques ou avec une température d'incubation plus élevée, sans initiateur. L'oxydation des lipides dans les émulsions a été mesurée par plusieurs méthodes permettant d'évaluer les différents stades de la réaction : la consommation d'oxygène dans l'espace de tête des flacons, la formation de diènes conjugués (DC) et la formation de composés volatils d'oxydation.

Dans le cas des émulsions stabilisées par des protéines, les modifications subies par les protéines au cours de l'incubation ont été suivies. Pour caractériser globalement ces modifications, la diminution de l'intensité de signal de fluorescence des protéines a été mesurée *in situ* dans les émulsions par fluorescence frontale. La mesure de la diminution de la solubilité des protéines, l'évaluation de leur agrégation par électrophorèse en conditions réductrices et non réductrices, et le dosage des protéines carbonylées ont également été réalisés.

Enfin, les interfaces impliquées dans certaines émulsions ont été reconstituées à 25°C sur des films de Langmuir ou de Langmuir-Blodgett afin de déterminer leur structure et leur homogénéité. Les émulsions retenues ont été celles dans lesquelles la modulation de la composition et/ou de la structure de la couche interfaciale a résulté en une modification de la cinétique d'oxydation des lipides. Pour les interfaces stabilisées par des tensioactifs seuls ou en mélange, la miscibilité des tensioactifs dans le film a été établie grâce à la réalisation d'isothermes de compression. Pour les interfaces stabilisées par des protéines seules ou en présence de co-émulsifiants, la microscopie à force atomique (AFM) a permis d'étudier l'ultrastructure et l'homogénéité de la couche interfaciale.

La Figure 18 résume les différentes étapes de la démarche expérimentale adoptée au cours de ce projet.



Figure 18. Représentation schématique de la démarche expérimentale adoptée au cours du projet de thèse : étude multi-échelles des interfaces impliquées dans des systèmes tridimensionnels (émulsions) et reconstituées sur des systèmes bidimensionnels (interfaces air/eau) et des conséquences des structures impliquées sur l'oxydation des lipides et les modifications des protéines.

Matériel et méthodes

1. Matières premières et réactifs

1.1. Huile de colza purifiée

Huile de colza commerciale :

L'huile de colza utilisée pour cette étude a été achetée chez un distributeur local (Leclerc, France), sous la marque de ce distributeur (Rustica). Selon les informations fournies par le distributeur, 100 g d'huile de colza contiennent 7,5 g d'acides gras saturés, 9 g d'acide α -linolénique (ALA) et 25 mg de vitamine E. Avant leur ouverture, les bouteilles d'huile commerciale ont été stockées à 4°C, à l'obscurité.

Purification de l'huile de colza :

Afin d'éliminer les tocophérols qui sont des antioxydants naturellement présents dans l'huile, nous avons purifié l'huile de colza. Cette étape a également permis d'éliminer certains composés mineurs de l'huile comme les acides gras libres, les monoglycérides et les diglycérides.

Différentes méthodes de purification ont été testées, toutes basées sur l'adsorption des composés mineurs de l'huile sur des matériaux adsorbants solides et se caractérisant par l'absence d'emploi de solvant, mais se différenciant par la nature du matériau utilisé (silice, alumine ou mélange des deux). Les échantillons d'huile purifiée ont été comparés sur plusieurs critères : teneur en tocophérols, teneur en hydroperoxydes et tension interfaciale huile-eau. Les résultats sont présentés en *Annexe I*.

Dans la méthode retenue, adaptée d'un protocole précédemment décrit (Maldonado-Valderrama et al., 2008), l'huile est directement mise en contact avec l'alumine (MP Alumina N – Super I, MP Biomedicals). Dans un tube à centrifugation en polypropylène, 1 volume d'alumine pour 2 volumes d'huile sont mélangés à 4°C pendant 24 h sur un agitateur rotatif (15 rpm). Les tubes sont centrifugés à 2000×g pendant 20 minutes à 20°C (centrifugeuse JOUAN modèle GT422). La phase supérieure huileuse est prélevée et centrifugée une seconde fois dans les mêmes conditions. L'huile purifiée est alors prélevée puis, après un barbotage d'azote pendant environ 15 minutes, stockée dans des flacons en verre brun à –

20°C. Le Tableau III reporte la teneur en tocophérols, la teneur en hydroperoxydes et la tension interfaciale huile-eau de l'huile purifiée. Selon les différents lots d'huile purifiée, la teneur en tocophérols varie entre 1,03 et 2,90 µg par g d'huile.

	Tension interfaciale huile/eau (mN m ⁻¹)	Teneurs en tocophérols (µg g ⁻¹)	Teneur en hydroperoxydes (µmol g ⁻¹)
	28,7 ± 1,0	$1,80 \pm 0,60$	$0,34 \pm 0,23$
· ·	11 / / 1	11 / 11	

Tableau III. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile purifiée.

Les données indiquées représentent la moyenne et l'écart-type d'au moins 3 analyses.

Composition en acides gras de l'huile de colza :

La composition en acides gras de l'huile de colza purifiée (Tableau IV) a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des esters méthyliques d'acides gras selon le protocole présenté en *Annexe II*.

Acides	gras	Pourcentage relatif de chaque acide gras (g/100	Teneur en acides gras dans l'huile de colza
		g d'acides gras totaux)	purifiée (g kg ⁻¹ d'huile)
	C16:0	$4,73 \pm 0,10$	42,6±0,1
Acides gras	C18:0	$1,42 \pm 0,17$	$14,4 \pm 0,1$
saturés (AGS)	C20:0	$0,54 \pm 0,02$	$4,6 \pm 0,1$
	C22:0	$0,28 \pm 0,04$	$2,3 \pm 0,3$
A aidea anaa	C16:1 n-7	$0,21 \pm 0,02$	$1,9 \pm 0,1$
Actues gras	C18:1 n-9	$61,85 \pm 0,60$	$510,0 \pm 1,6$
(ACMI)	C20:1 n-9	$1,25 \pm 0,10$	$10,3 \pm 0,1$
	C22:1 n-9	$0,34 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,2$
Acides gras	C18:2 n-6	$19,73 \pm 0,21$	$157,4 \pm 0,4$
(AGPI)	C18:3 n-3	$9,22 \pm 0,42$	$75,2 \pm 0,2$
Autres aci	des gras	$2,\!49\pm0,\!02$	$21,0 \pm 0,2$
Tota	al	100	842,0±1,9

Tableau IV. Composition et teneur en acides gras de l'huile de colza purifiée.

Les données indiquées représentent la moyenne et l'écart-type de 3 analyses.

L'huile de colza purifiée est riche en acide oléique C18:1 n-9 (environ 62 g/100 g d'acides gras) ainsi qu'en acides gras polyinsaturés (environ 20 g d'acide linoléique C18:2 n-6 /100 g d'acides gras et 9 g d'acide α -linolénique C18:3 n-3 /100 g d'acides gras). Sa composition est également caractérisée par la présence d'acide eicosa-9-énoïque C20:1 n-9 (1,25 g/100 g

d'acides gras). Sa teneur en acides gras saturés totaux est faible (environ 7 g/100 g d'acides gras), l'acide palmitique C16:0 étant majoritaire.

1.2. Eau et solutions tampons

Deux tampons de pH différents ont été utilisés pour préparer les solutions aqueuses destinées à la fabrication des émulsions. Le premier tampon (pH 6,7) contient 10 mM d'acide 1,4piperazinediethanesulfonique (PIPES, pK_a 6,8) et 80 mM de NaCl. La force ionique et le pH de ce tampon correspondent, par exemple, à ceux du lait. Le second tampon (pH 3,0) contient 10 mM d'acide orthophosphorique et 80 mM de NaCl. Les émulsions ont été diluées dans des tampons de pH et de molarité similaires mais exempts de NaCl pour la mesure du potentiel Zeta. Enfin, un tampon Tris 50 mM (Trizma base, Sigma Aldrich), NaCl 0,1 M à pH 7,0 a été utilisé pour solubiliser les protéines en vue de leur caractérisation par gel filtration et chromatographie liquide haute performance (HPLC). Toutes les solutions tampon ont été préparées avec de l'eau ultrapure (18 M Ω) obtenue avec un système Milli-Q (Millipore).

1.3. Emulsifiants

1.3.1. Protéines

Trois protéines laitières ont été utilisées pour stabiliser physiquement les émulsions : l'albumine de sérum bovin (SAB), la β -lactoglobuline (BLG) et la β -caséine (BCN). Ces protéines sont naturellement présentes dans de nombreuses matrices alimentaires et adoptent des structures et des comportements aux interfaces différents. La β -lactoglobuline présente une structure globulaire rigide alors que la SAB et la β -caséine sont plus flexibles (Cayot & Lorient, 1998). Les principales caractéristiques de composition de ces protéines sont résumées dans le Tableau V. Les poudres protéiques ont été conservées dans des flacons hermétiquement fermés, en chambre froide à 4°C.

Analyse		SAB	β-caséine	β-lactoglobuline
	рН 3,0	96,3	15,6	92,8
Solubilité (% de la	pH 4,0	97,1	5,2	90,4
solubilité à pH 6,7)	pH 5,0	98,8	14,1	98,7
(1)	pH 6,0	98,3	104,8	98,2
	pH 6,7	100,0	100,0	100,0
Gel filtration (2)		1 pic à ~ 66000 Da	-	1 pic à ~ 36000 Da
HPLC phase inverse (3)		1 seul pic	1 seul pic	1 seul pic
Teneur en eau $(g/100 g) (4)$		$2,37 \pm 0,48$	$9,91 \pm 0,30$	$7,73 \pm 0,25$
Teneur en fer $(mg/100 g) (5)$		<1	<1	<1
Teneur en cuivre $(mg/100 g)$ (5)		<0.2	< 0.2	< 0.2

Tableau V. Principales caractéristiques physico-chimiques des protéines.

(1) La solubilité des protéines a été déterminée dans différents tampons contenant 80 mM de NaCl (*Annexe III*).

(2) Protocole fourni en Annexe IV.

(3) Protocole fourni en Annexe V.

(4) Moyenne \pm écart-type de trois analyses ; protocole fourni en *Annexe VI*.

(5) Analyses réalisées en externe selon la norme NF EN ISO-6869.

1.3.1.1. L'albumine de sérum bovin (SAB)

La SAB est une protéine globulaire de masse moléculaire de 66000 Da constituée de 582 résidus d'acides aminés. Elle est structurée par 17 ponts disulfures intramoléculaires qui permettent des repliements serrés de la chaîne peptidique, mais ne relient pas de résidus cystéyl très éloignés dans la séquence d'acides aminés. Ainsi, la SAB a une structure relativement ouverte. C'est une protéine qualifiée de flexible, qui peut adopter différentes conformations en fonction de l'environnement où elle se trouve. Son point isoélectrique est de 5,15 (Cayot & Lorient, 1998).

La SAB (Cohn, fraction V equivalent, standard grade) a été fournie par MP Biomedicals. La poudre de SAB contient moins de 1 mg de fer pour 100 g, moins de 0,2 mg de cuivre pour 100 g et environ 2,4% d'eau (Tableau V). En présence de 80 mM de NaCl, la solubilité de la SAB ne varie quasiment pas avec le pH (Tableau V). La solubilité la plus faible a été observée à pH 3,0 et correspond à environ 96% de la solubilité maximale observée à pH 6,7. D'après le chromatogramme obtenu en gel filtration, la SAB présente un pic principal à un temps de rétention correspondant à un poids moléculaire d'environ 66000 Da (*Annexe IV*, Tableau V). Elle est donc majoritairement sous forme monomérique. Un pic mineur avec un temps de rétention plus faible correspond vraisemblablement à des traces de contaminants de poids moléculaire plus élevé, ce qui est confirmé par les résultats d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) (*Annexe VII*). Le

chromatogramme obtenu en HPLC en phase inverse (*Annexe V*, Tableau V) ne présente qu'un seul pic. Etant donné que cette méthode chromatographique sépare les composés selon leur hydrophobie, la présence de peptides plus hydrophiles que la protéine native, aurait été révélée par des pics à des temps de rétention plus courts.

1.3.1.2. La β-caséine (BCN)

La BCN a une masse moléculaire d'environ 24000 Da et compte 209 résidus d'acides aminés, dont une forte proportion de résidus de proline. Cette protéine présente une structure peu ordonnée et peut se déplier pour couvrir les interfaces. Son point isoélectrique est de 5,19 (Cayot & Lorient, 1998).

La BCN est utilisée sous forme native et a été fournie par Lactalis. La poudre de BCN présente une teneur en eau d'environ 10%, contient moins de 1 mg de fer pour 100 g et moins de 0,2 mg de cuivre pour 100 g (Tableau V). La BCN est peu soluble dans une gamme de pH allant de 3,0 à 5,0, et très soluble pour des valeurs de pH supérieures ou égales à 6,0 (Tableau V). L'absence de contamination par d'autres protéines laitières ou par des peptides a été vérifiée par HPLC en phase inverse (*Annexe V*, Tableau V) et par SDS-PAGE (*Annexe VII*). La BCN n'a pas pu être caractérisée par gel filtration car elle est restée adsorbée dans la colonne et n'a pas pu être éluée. Les molécules de BCN sont connues pour leur forte propension à s'associer entre elles pour former des néomicelles (Kajiwara et al., 1988; Mercier et al., 1972; Takase & Niki, 1980), cités par Cayot & Lorient, 1998. A partir d'une concentration de 1 g l⁻¹, les molécules de BCN peuvent s'associer pour former des micelles d'une taille de 20-25 nm (Dauphas, 2005).

1.3.1.3. La β -lactoglobuline (BLG)

BLG native :

La BLG a une masse moléculaire proche de 18300 Da et compte 162 résidus d'acides aminés (Cayot & Lorient, 1998). Elle comporte 2 ponts disulfure et possède un haut degré de structuration, avec une très forte proportion de feuillets β . C'est une protéine compacte, présentant une structure spatiale très resserrée et un cœur hydrophobe. Son point isoélectrique est de 5,30.

La BLG utilisée dans ce travail a été purifiée à partir d'un isolat commercial de protéines sériques natives extrait du lait à basse température, le Prolacta 90, fourni par Lactalis. Le protocole de purification a été adapté de la méthode décrite par Mailliart & Ribadeau-Dumas (Mailliart & Ribadeau-Dumas, 1988). La poudre de protéines sériques est dissoute dans de l'eau ultrapure à une concentration de 100 g l⁻¹. Le pH de la solution est amené à 2,0 et 14 g/100 g de chlorure de sodium (NaCl) sont ajoutés afin de faire précipiter les protéines sériques (α-lactalbumine, SAB, immunoglobulines et BLG). Après 30 minutes d'agitation, la solution est diluée au demi ce qui permet de re-solubiliser sélectivement la BLG. Après centrifugation 10 minutes à 10000×g, le surnageant contenant la BLG solubilisée est récupéré. L'addition de 23 g/100 g de NaCl permet de re-précipiter la BLG. Après plusieurs heures d'agitation lente, la solution est centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment. Le précipité est repris dans de l'eau ultrapure et le pH de la solution est ajusté à 7,0. La solution est ensuite dialysée contre de l'eau permutée (boudins de dialyse Sigma D9402, seuil de coupure = 12000 Da). Après 6 renouvellements de l'eau permutée, la solution de BLG est lyophilisée et la poudre obtenue est conservée à 4°C. Cette poudre présente une teneur en eau d'environ 8% et contient moins de 1 mg de fer pour 100 g et moins de 0,2 mg de cuivre pour 100 g (Tableau V). En présence de 80 mM de NaCl, la solubilité de la BLG dépend peu du pH (Tableau V). La solubilité la plus faible, observée à pH 4,0, correspond à environ 90% de la solubilité maximale observée à pH 6,7. D'après le chromatogramme obtenu en gel filtration à pH 7,0, la BLG présente un seul pic à un temps de rétention correspondant à un poids moléculaire d'environ 36000 Da (Annexe IV, Tableau V), ce qui correspond à la protéine à l'état dimérique, forme normale de la BLG à pH neutre. Les interactions impliquées dans la dimérisation de la BLG sont de nature hydrophobes et ioniques (Relkin, 1998). Le chromatogramme obtenu en HPLC en phase inverse (Annexe V, Tableau V) ne présente qu'un seul pic, ce qui indique l'absence de peptides dans la BLG purifiée pour ce travail. L'analyse de la protéine par SDS-PAGE confirme l'absence de contaminants protéiques (Annexe VII).

BLG dénaturée ou agrégée :

Afin d'étudier l'effet de la structure des protéines à l'interface, nous avons réalisé des essais avec de la BLG dénaturée thermiquement ou partiellement agrégée. La BLG dénaturée thermiquement est obtenue en plaçant une solution de BLG à 10 g l⁻¹ dans de l'eau ultrapure pendant 45 minutes au bain-marie à 80°C sous agitation magnétique modérée. Après

refroidissement, la solution est diluée au demi dans un tampon PIPES 20 mM, NaCl 160 mM, pH 6,7.

La solution de BLG partiellement agrégée (10% d'agrégats) est préparée en mélangeant 1 volume d'une solution de BLG native à 9 g l⁻¹ dans du tampon à pH 6,7 (PIPES 10 mM + NaCl 80 mM) et 1 volume d'une solution d'agrégats de BLG (1 g l⁻¹ dans du tampon PIPES 1,9 mM + NaCl 15 mM, contenant 2,4 mM d'azide de sodium) préalablement préparés par chauffage de solutions salines de BLG, purifiés par ultrafiltration-centrifugation sur membrane et de diamètre hydrodynamique moyen, mesuré par diffusion dynamique de la lumière, d'environ 35 nm (Rullier et al., 2008).

1.3.2. Tensioactifs ou émulsifiants moléculaires

Des émulsifiants de nature non protéique ont été utilisés pour la fabrication des émulsions, seuls ou en mélange avec d'autres émulsifiants. La structure chimique de ces émulsifiants est présentée dans la Figure 19. Leurs principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le Tableau VI. La teneur et la composition en acides gras des émulsifiants qui sont des esters d'acides gras ont été déterminées par CPG après préparation d'esters méthyliques, selon le protocole présenté en *Annexe II* (excepté l'ajout de toluène pour solubiliser l'échantillon). La teneur en hydroperoxydes du Tween 20 et du Tween 80 a été déterminée selon un protocole adapté de Wolff (Wolff, 1994). En milieu acide, les hydroperoxydes oxydent le Fe²⁺ en Fe³⁺. Le complexe coloré formé par les ions Fe³⁺ et le xylénol orange est dosé en retour à 540 nm. La quantification s'effectue par rapport à une gamme d'hydroperoxyde de cumène.

Tensioactifs non ioniques :

Le Tween 20 ou monolaurate de polyoxyéthylène sorbitane et le Tween 80 ou monooléate de polyoxyéthylène sorbitane sont des esters de sorbitol obtenus par synthèse. Le Span 20 ou monolaurate de sorbitane est un ester de sorbitol. Ces émulsifiants proviennent de chez Sigma Aldrich (Tween 20 : P7949 ; Tween 80 : P8074 ; Span 20 : S6635).

Tensioactif anionique :

Le Citrem (GRINDSTED CITREM N 12 VEG) est un ester d'acide gras et d'acide citrique fourni par Danisco.

Monoglycéride et phosphatidylcholine :

Ces émulsifiants ont été utilisés en mélanges avec d'autres émulsifiants pour stabiliser des émulsions en modulant la composition et la structure de l'interface. Le monolaurate de glycérol (MLG) est un monoester d'acide laurique et de glycérol (*sn*-1 dodécanoyl glycérol). La dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC) est une phosphatidylcholine comportant 2 chaînes d'acide laurique (1,2-didodécanoyl-glycéro-3-phosphocholine). Ces composés proviennent de chez Sigma Aldrich (MLG : M1765 ; DLPC : P1263).



Figure 19. Structures moléculaires du Tween 20 (A), du Tween 80 (B), du Brij 78 (C), du Citrem (D), du Span 20 (E), du monolaurate de glycérol (F) et de la dilauroyl phosphatidylcholine (G).

Composé		Tween 20	Tween 80	Citrem	Span 20	MLG	DLPC
n° CAS		9005-64-5	9005-65-6		1338-39-2	142-18-7	18194-25-7
Masse molaire	$e (g mol^{-1}) (1)$	1228	1310	531,0	346,5	274,4	621,8
CMC (n	nM) (2)	0,050	0,010				
HLB	(2)	16,7	15,0		8,6	5,2	
	Acides gras s	aturés (AGS)					
	C8:0	$5,73\pm0,13$	-	-	$5,12 \pm 0,17$	-	-
	C10:0	$6,\!45\pm0,\!06$	-	-	$6,19 \pm 0,20$	-	-
	C12:0	53,66 ± 0,36	$4,01 \pm 0,04$	-	48,79 ± 1,33	100	100
	C14:0	$19,63 \pm 0,42$	$1,93 \pm 0,09$	$1,18 \pm 0,02$	$19,82 \pm 0,44$	-	-
Composition	C16:0	$8,33 \pm 0,15$	$5,38 \pm 0,11$	$46,27 \pm 0,20$	$11,73 \pm 0,22$	-	-
en acides	C18:0	$5,94 \pm 0,09$	$1,52 \pm 0.02$	$50,34 \pm 0,31$	$6,53 \pm 0,18$	-	-
gras (%)	C20:0	-	-	$0,27 \pm 0,01$	-	-	-
(3) Acides gras n		nonoinsaturés	(AGMI)				
	C16:1 n-7	-	$1,09 \pm 0,13$	$0,29 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,11$	-	-
	C18:1 n-9	$0,27 \pm 0,04$	80,91 ± 0,14	$1,22 \pm 0,34$	-	-	-
	C20:1 n-9	-	$5,17 \pm 0,12$	-	-	-	-
Acides gras p		olyinsaturés (A	AGPI)				
	C18:2 n-6	-	-	-	$0,19 \pm 0,03$	-	-
Teneur en acides gras							
totaux (n	ng par g	$99,3 \pm 2,6$	$99,3 \pm 2,0$	$679,1 \pm 6,7$	$403,3\pm45,0$	$666,9 \pm 11,8$	$674,2 \pm 1,0$
d'échar	ntillon)						
Teneur en hyc	lroperoxydes	243 ± 04	1.2 ± 0.1				
(umol par g d'échantillon)		$27,5 \pm 0,4$	$1, 2 \pm 0, 1$			$\frac{5,2}{-}$ $\frac{5,2}{-}$ $\frac{-}{-}$	

Tableau VI. Caractéristiques physico-chimiques des émulsifiants moléculaires utilisés.

Abréviations : CAS, chemical abstract service ; CMC, concentration micellaire critique ; HLB, balance hydrophile lipophile.

(1) Les masses molaires indiquées sont celles données par les fournisseurs.

(2) Les valeurs de CMC et de HLB proviennent du travail de Hait & Moulik (2001).

(3) Moyennes \pm écart-types de trois analyses. Les teneurs en acide(s) gras majoritaire(s) sont indiquées en gras.

Le Tween 20 et le Tween 80 ont des valeurs de balance hydrophile lipophile (HLB) élevées, ce qui implique que le rapport entre leur tête polaire et leur chaîne aliphatique est important. Ce sont des tensioactifs hydrosolubles, adaptés à la stabilisation physique d'émulsions H/E (McClements, 2005). A l'inverse, le Span 20 et le MLG contiennent une chaîne aliphatique identique à celle du Tween 20 (principalement de l'acide laurique) mais leur tête polaire est dépourvue de chaînes polyoxyéthyléniques, ce qui explique leur HLB plus faible. Utilisées seules, ces molécules ne permettent pas de stabiliser physiquement des émulsions H/E.

Les émulsifiants moléculaires choisis sont exempts d'acides gras polyinsaturés, ce qui les rend assez stables vis-à-vis des phénomènes d'oxydation des lipides. Le Tween 80 contient une forte proportion d'acide oléique (80,9 g/100 g d'acides gras). Les émulsifiants moléculaires étudiés contiennent un mélange d'acides gras, exceptés le MLG et la DLPC qui contiennent uniquement de l'acide laurique.

Le Tween 20 contient 24,3 µmol d'hydroperoxydes par gramme. En effet, les chaînes polyoxyéthyléniques des tensioactifs de type polysorbates peuvent être oxydées et, par

conséquent, former des hydroperoxydes (Kerwin, 2008; Mancuso et al., 1999a; Nuchi et al., 2001). La teneur en hydroperoxydes dans le Tween 80 est plus faible $(1,2 \mu mol g^{-1})$.

1.4. Initiateurs d'oxydation

Les conditions d'incubation des émulsions ont été choisies pour observer les phénomènes d'oxydation sur une période relativement courte (48 à 72 h). Les différents initiateurs et leurs concentrations dans les émulsions ont été choisis de façon à obtenir des vitesses d'oxydation du même ordre de grandeur. Les résultats des essais d'optimisation de ces différentes conditions d'incubation sont présentés en *Annexe VIII*.

Complexe FeSO₄/EDTA :

Du sulfate de fer heptahydraté (FeSO₄, 7H₂O ; Sigma Aldrich, 215422) et de l'EDTA sous forme de sel de disodium-calcium (Sigma Aldrich, ED2SC) ont été utilisés en concentrations équimolaires (200 μ M) dans les émulsions. Des solutions à 12 mM sont préparées séparément et extemporanément dans de l'eau ultrapure. Le complexe fer/EDTA est ensuite préparé en mélangeant un volume équivalent de chaque solution, le mélange obtenu étant placé sous agitation magnétique douce pendant environ 1 heure avant ajout dans les émulsions.

<u>Mélange FeCl₃/ascorbate :</u>

Des solutions (3 mM) de chlorure de fer (FeCl₃; Sigma Aldrich, F7134) et d'ascorbate de sodium (Fluka, 11140) sont préparées séparément et extemporanément dans de l'eau ultrapure. Ces solutions sont ensuite introduites séquentiellement dans les émulsions : la solution de FeCl₃ puis la solution d'ascorbate de sodium, pour obtenir une concentration finale dans l'émulsion de 50 μ M de chaque composé.

Metmyoglobine (MetMb) :

De la myoglobine de cœur de cheval (Sigma Aldrich, M1882) a été utilisée. Une solution de metmyoglobine (MetMb) à 30 μ M est préparée dans de l'eau ultrapure et ajoutée dans les émulsions pour obtenir une concentration finale dans l'émulsion de 1 μ M.

2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH) :

Une solution d'AAPH (Sigma Aldrich, 44091-4) à 30 mM est préparée dans de l'eau ultrapure et ajoutée dans les émulsions pour obtenir une concentration finale dans l'émulsion de 1 mM.

2. Préparation et caractérisation physico-chimique des émulsions

2.1. Préparation des émulsions

2.1.1. Préparation des solutions d'émulsifiants

La plupart des émulsifiants sont dispersés en solutions aqueuses avant émulsification. Seuls le Citrem et la DLPC, très peu hydrosolubles, sont incorporés dans l'huile de colza purifiée avant émulsification.

Les solutions aqueuses d'émulsifiants sont préparées la veille de leur utilisation. Les émulsifiants sont dissous à 4°C sous agitation lente pendant une nuit dans du tampon (pH 6,7 ou 3,0). Dans le cas des mélanges d'émulsifiants, des solutions aqueuses sont préparées séparément pour chaque émulsifiant. Les deux solutions aqueuses sont réunies en deux masses égales au moment de la préparation de l'émulsion.

Le Citrem et la DLPC sont introduits dans l'huile de colza purifiée préalablement ramenée à température ambiante sous forme de solutions dans le dichlorométhane (environ 200 µl de solvant pour 8 g d'huile). Le solvant est ensuite évaporé par bullage d'azote dans l'huile pendant 1 heure à environ 30-35°C. L'élimination complète du dichlorométhane a été vérifiée par micro-extraction en phase solide (SPME) couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG), dans des conditions similaires à celles décrites ci-après (3.2.2. Mesure des composés volatils d'oxydation).

Les concentrations d'émulsifiants utilisées pour la préparation des émulsions sont présentées dans le Tableau VII.

Emulsifiant (Em)		pH de la solution aqueuse	Concentration Em en solution aqueuse $(g \Gamma^1)$	Co- émulsifiant (Co-em)	Ratio surfacique du Co-em (R _s , %)	Concentration Co-em en solution aqueuse $(g l^{-1})$	Rapport massique Em/Co-em	Rapport molaire Em/Co- em
	BLG	6,7	5	-	-	-	-	-
	BLG	3,0	5	-	-	-	-	-
	BLG en	67	10*					
	excès	0,7	10.	-	-	=	-	-
	BLG							
	dénaturée	67	5		-			
	thermique-	0,7	5	-		-	-	-
	ment							
	BLG			-	_	-	_	_
Protóinos	partielle-	67	5					
Totemes	ment	0,7						
	agrégée							
	BLG	6,7	4,55	Tween 20	10 %	0,47	9,62	0,64
	BLG	6,7	2,53	Tween 20	50 %	2,36	1,07	0,07
	BLG	6,7	4,55	DLPC	10 %	0,29**	15,69	0,53
	BCN	6,7	5	-	-	-	-	-
	BCN en	6,7	10*	-	-	-	-	-
	PCN	67	4.52	DIPC	10.0/	0.26**	17.24	0.45
		67	4,52	DLFC	10 70	0,20**	17,34	0,45
	Twoon 20	67		-	-	-	-	-
	Tween 20	3.0	5	-	-	-	-	-
	Tween 20	5,0	5	-	-	-	-	
	en excès	6,7	10*	-	-	-	-	-
Tensio- actifs	Tween 20	67	4 60	MLG	10 %	0.39	11 78	2 63
	Tween 20	67	4 60	Span 20	10 %	0.49	9.38	2,63
	Tween 20	6.7	2.5	Tween 80	-	2.5	1	1.07
	Tween 80	6.7	5	-	-	-	-	-
	Citrem	6,7	6**	-	-	-	-	-

Tableau VII. Composition en émulsifiants des émulsions.

* Cette concentration correspond à la somme des concentrations en émulsifiant incorporées *pre* et *post*-émulsification.

** La DLPC et le Citrem sont incorporés dans l'huile, dans des concentrations reportées en équivalent dans les solutions aqueuses.

2.1.2. Emulsification

Nous avons choisi de travailler avec des émulsions constituées de 30 g d'huile de colza et de 70 g de solution aqueuse pour 100 g d'émulsion. Cette proportion correspond à des matrices alimentaires telles que certaines sauces ou vinaigrettes allégées.

Les émulsions sont généralement préparées à partir d'huile de colza purifiée et de solution aqueuse d'émulsifiant. Dans le cas de l'émulsion stabilisée par le Citrem, celui-ci est préalablement incorporé dans l'huile. Dans le cas des émulsions stabilisées par un mélange protéine/DLPC, la protéine est solubilisée dans la solution aqueuse et la DLPC préalablement incorporée dans l'huile.

Les deux phases sont pesées dans un bécher de contenance adaptée. Une pré-émulsion est tout d'abord réalisée avec un homogénéisateur rotor-stator (Heidolph SilentCrusher M 595-06000-00-2 5000-26000 rpm) à 15000 rpm pendant un temps de 2 minutes pour 30 g d'émulsion. L'émulsion grossière ainsi obtenue est ensuite émulsionnée plus finement avec un homogénéisateur à un étage basse pression (A0812 W-A-CD, Stansted Fluid Power, Stansted, Angleterre). La pression d'homogénéisation dépend du type d'émulsifiant (Tableau VIII). L'étape d'homogénéisation, d'une durée maximum de 5 min 40 s., n'induit pas d'échauffement notable de l'émulsion.

Tableau VIII. Paramètres d'homogénéisation appliqués pour 50 g d'émulsion, pour différents émulsifiants.

Emulsifiant	Pression d'homogénéisation (bars)	Débit (ml min ⁻¹)	Nombre de passages	Durée d'homogénéisation
Protéines et Citrem	50	178	20	5 min 40 s.
Tensioactifs	35	187	10	2 min 40 s.

2.2. Conditions d'incubation des émulsions

Après émulsification, les émulsions sont additionnées de solutions d'initiateurs de façon à obtenir les concentrations finales suivantes : FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M dans l'émulsion ; FeCl₃/ascorbate 1/1 M/M μ M dans l'émulsion ; MetMb 1 μ M dans l'émulsion ou AAPH 1 mM dans l'émulsion. Les émulsions sont réparties en fractions de 3 ml dans des flacons headspace de 20,5 ml sertis hermétiquement par un septum et une capsule métallique. Les flacons sont placés sur un agitateur rotatif orienté à 30° par rapport à la verticale, réglé à une vitesse de 5 rpm, dans une étuve à 25°C à l'obscurité, pendant 48 à 78 h. Certaines émulsions ont été incubées à 33°C ; dans ce cas, le volume de solution d'initiateur a été remplacé par un volume équivalent d'eau ultrapure.
2.3. Caractérisation physique des émulsions

2.3.1. Distribution de taille des gouttelettes d'huile

2.3.1.1. Microscopie optique

Certaines émulsions ont été observées au microscope optique (grossissement ×10 ou ×20) afin de mettre en évidence d'éventuels phénomènes de floculation ou de coalescence des gouttelettes. L'appareil utilisé est un microscope optique Nikon Eclipse E400 (Japon), équipé d'objectifs (Nikon $10 \times / 0,25$ Ph1 DL WD6,1 ou Nikon $20 \times / 0,40$ Ph1 DL WD3,8) et d'une caméra (VidéoCapteur 3CCD KY-F55B JVC).

2.3.1.2. Granulométrie laser (diffusion statique de la lumière)

Principe & objectif :

L'objectif de cette mesure est de caractériser la distribution de taille des gouttelettes d'huile dans les émulsions. La granulométrie laser est une technique basée sur la diffraction de la lumière. Pour des particules de taille supérieure à la longueur d'onde, l'analyse des données s'appuie sur la théorie de Fraunhofer qui utilise les hypothèses suivantes : on considère des particules sphériques non poreuses et non opaques, de diamètre supérieur à la longueur d'onde, animées d'un mouvement aléatoire. On suppose que les particules diffractent la lumière avec la même efficacité quelle que soit leur taille. Lorsqu'un faisceau laser éclaire une particule, on peut observer des franges de diffraction. Selon Fraunhofer, l'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. Plus la particule est grosse, plus l'angle de déviation de la lumière sera faible. Dans le cas où le diamètre des particules est inférieur à la longueur d'onde, la théorie de Fraunhofer cesse d'être valable et on utilise la théorie de Mie, basée sur les approximations de Rayleigh. Dans cette théorie, on suppose que la lumière est non seulement diffractée par les particules, mais qu'elle est également réfléchie et diffusée. Elle se propage jusqu'à ce qu'il y ait une variation dans l'indice de réfraction du milieu. Cette variation d'indice induit une réfraction du faisceau monochromatique qui arrive sur le détecteur en ayant subi plusieurs déviations de sa direction de propagation. L'application de la théorie de Mie nécessite donc une connaissance des propriétés optiques des particules et du milieu de dispersion.

Mesure :

La mesure de la taille des gouttelettes présentes dans l'émulsion a été réalisée avec un granulomètre laser (Micromeritics Saturn DigiSizer 5200). La longueur d'onde du laser est de 658 nm et la distance focale de la lentille de 200 mm. Les indices de réfraction de l'eau et de l'huile de colza utilisés pour paramétrer l'analyse sont 1,331 et 1,473, respectivement (Zhang et al., 2006). L'émulsion, diluée environ au $1/10^{eme}$ dans une solution de SDS à 1 g/100 g, est ajoutée goutte à goutte jusqu'à atteindre un taux d'obscuration de 5 à 10%, l'obscuration initiale étant inférieure à 0,3%. Le résultat de l'analyse est présenté sous forme d'un histogramme de fréquence reportant la distribution de la taille des gouttelettes. Un tableau récapitulatif présente un ensemble de paramètres statistiques, parmi lesquels le d_{4,3} (diamètre moyen d'une sphère qui aurait le même volume que les particules) et le d_{3,2} (diamètre moyen d'une sphère qui aurait la même surface que les particules), exprimés en µm. La distribution de taille des gouttelettes a été déterminée dans les émulsions fraîchement préparées et après 48 h d'incubation.

2.3.2. Mesure du potentiel Zeta

Principe :

La charge de surface de particules dispersées en solution aqueuse induit la formation d'une couche d'ions autour de ces particules, la concentration ionique dans cette zone étant alors plus élevée que dans la phase continue. Le potentiel Zeta représente la charge de surface acquise par une particule en solution entourée de cette couche d'ions. On le mesure en appliquant un champ électrique à travers la dispersion de particules. Celles-ci migrent alors vers l'électrode de charge opposée à leur charge de surface, avec une vitesse proportionnelle à la valeur absolue du potentiel Zeta. La mobilité des particules est mesurée par diffusion dynamique de la lumière et permet de calculer le potentiel Zeta à partir de la viscosité de la phase continue en appliquant les théories de Smoluchowski ou Huckel.

Mesure :

La charge de surface des gouttelettes d'huile a été évaluée dans certaines émulsions à pH 6,7 ou pH 3,0 au travers de la mesure du potentiel Zeta (ξ , mV). Les mesures sont réalisées avec un appareil de diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni). Les émulsions sont diluées 1000 fois dans des tampons exempts de NaCl à pH 6,7 ou 3,0. Lors de la mesure, le modèle de Smoluchowski est appliqué. L'indice de réfraction utilisé pour l'huile de colza est de 1,473. Les paramètres utilisés pour la phase continue correspondent à ceux de l'eau pure : viscosité = 0,8872 cP à 25° C ; indice de réfraction = 1,330 ; constante diélectrique = 78,5).

2.3.3. Séparation et récupération des phases aqueuse et crémée

Les émulsions sont centrifugées à $3500 \times g$, pendant 45 minutes, à 20° C afin de séparer la phase crémée de la phase aqueuse. Les phases aqueuses sont récupérées et filtrées successivement sur des membranes d'acétate de cellulose de 0,45 ; 0,20 puis 0,10 µm. Cette filtration permet d'éliminer la plupart des petites gouttelettes d'huile résiduelles dans la phase aqueuse après centrifugation. Les phases crémées sont collectées séparément.

2.3.4. Dosage des émulsifiants non adsorbés

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'effet de l'interface sur l'oxydation lipidique des émulsions. Il était donc important de minimiser la contribution des émulsifiants non adsorbés. Pour cela, nous avons dosé la quantité d'émulsifiants résiduels dans la phase aqueuse des émulsions et évalué à partir de cette mesure la quantité d'émulsifiants adsorbés à l'interface. Le dosage des émulsifiants non adsorbés a été réalisé dans les émulsions fraîchement préparées et après 48 h d'incubation.

2.3.4.1. Dosage des protéines dans la phase aqueuse

Deux méthodes ont été utilisées pour doser la quantité de protéines présentes dans les phases aqueuses recueillies.

La première méthode est basée sur l'acquisition d'un spectre UV-visible, directement sur la phase aqueuse diluée. Ce spectre est réalisé entre 200 et 600 nm, avec un pas d'acquisition de 1 nm et une vitesse d'acquisition de 240 nm min⁻¹. La lecture est réalisée contre une cuve remplie de solution tampon. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz Suprasil[®] (Hellma, référence 108.002QS, 10 mm). L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Perkin Elmer UV/vis Lambda 12. Les spectres obtenus sont traités avec le logiciel PeakFit (version 4.00, Jandel Scientific, San Rafael, Etats-Unis) afin de rectifier la ligne de base. Pour cela, une régression quadratique par rapport à des points indiqués manuellement est réalisée de part et

d'autre du pic d'intérêt. Cette méthode permet de s'affranchir de la modification de la ligne de base due à la diffusion provoquée par les très petites gouttes résiduelles. Grâce aux gammes étalons des 3 protéines préalablement réalisées (0 à 1,5 mg ml⁻¹), la concentration des protéines résiduelles en phase aqueuse des émulsions peut être calculée à partir de l'absorbance maximale des spectres (278 nm).

La seconde méthode consiste en un dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Markwell (Markwell et al., 1978), qui repose sur une modification de la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). Le PIPES réagissant légèrement avec le réactif de Folin-Ciocalteu, il est important d'avoir toujours la même concentration en PIPES dans les échantillons et les points de la gamme étalon. Les gammes d'étalonnages sont établies pour chaque protéine (0 à 100 μ g ml⁻¹).

Finalement, après détermination de la concentration en protéines en phase aqueuse, le pourcentage de protéines non adsorbées est calculé par rapport à la quantité initiale de protéines en solution aqueuse, correspondant à 100%.

2.3.4.2. Dosage des tensioactifs dans la phase aqueuse

Une méthode de dosage des tensioactifs en phase aqueuse des émulsions a été développée. Cette méthode repose sur la transestérification en présence d'un standard interne des acides gras portés par les molécules de tensioactifs, puis par la quantification par CPG des esters méthyliques. L'intérêt et l'originalité de cette méthode reposent sur la réalisation de la réaction de transestérification directement dans la phase aqueuse de l'émulsion, sans étape d'extraction. Le protocole utilisé pour la méthylation consiste en une adaptation de la méthode décrite par Christie (Christie, 1989) (Annexe II). Différents standards internes ont été testés : l'acide heptadécanoïque (C17:0), l'heptadécanoate de méthyle (Me-C17:0) et le monoheptadécanoyl glycérol (Mono-C17:0). Le protocole appliqué est le suivant : un volume précis (0,5 ml) d'échantillon (phase aqueuse d'émulsion ou solution de concentration connue en tensioactif, pour la gamme étalon) est introduit dans un tube en verre à vis et additionné de 100 μ l de solution de standard interne à 500 μ g ml⁻¹ dans de l'acétone/méthanol ; 2/1 ; v/v. Après évaporation du solvant sous un flux d'azote, 2 ml de méthanol et 400 µl d'acide sulphurique sont ajoutés. Le contenu du tube hermétiquement fermé est homogénéisé (agitateur de type vortex, 1 minute, 3500 rpm), puis le tube est placé à 100°C pendant 1 heure. Les esters méthyliques formés sont recueillis puis analysés par CPG comme décrit en Annexe II.

Pour chaque tensioactif, des droites d'étalonnage ont été établies, représentant le rapport de l'aire du pic d'un acide gras du tensioactif considéré (en général l'acide gras majoritaire) sur l'aire du pic du standard interne en fonction de la concentration en tensioactif en solution aqueuse. La concentration en tensioactif dans les phases aqueuses d'émulsion est déterminée en reportant sur les droites de calibration le rapport de l'aire du pic du même acide gras de ce tensioactif sur l'aire du pic du standard interne. La Figure 20 présente la comparaison de droites d'étalonnage obtenues pour le Tween 20 en considérant l'aire du pic de l'acide laurique (C12:0), pour les 3 standards internes testés. Les droites d'étalonnage obtenues pour les autres tensioactifs sont présentées en *Annexe IX*.



Figure 20. Comparaison des droites d'étalonnage obtenues pour le dosage du Tween 20 avec
l'acide heptadécanoïque (◊), l'heptadécanoate de méthyle (□) ou le monoheptadécanoyl
glycérol (▲). Chaque point représente la moyenne de 3 essais.

Les trois courbes d'étalonnage sont linéaires dans la gamme de concentration testée, avec une pente plus importante en présence du monoheptadécanoyl glycérol. C'est donc ce standard interne qui a été choisi pour réaliser les dosages de tensioactifs en phase aqueuse.

Dans les phases aqueuses d'émulsion, il reste généralement une très faible quantité de petites gouttelettes d'huile n'ayant pas été éliminées par l'étape de filtration, comme en témoigne la diffusion visible sur les spectres d'absorbance des phases aqueuses. Les acides gras correspondant à ces traces d'huile résiduelle apparaissent donc sur les chromatogrammes obtenus lors du dosage des tensioactifs non adsorbés. L'huile de colza contient des acides gras polyinsaturés et notamment de l'acide linoléique C18:2, ce qui n'est pas le cas des différents

tensioactifs utilisés. Il est donc possible de soustraire la contribution des acides gras de l'huile de colza résiduelle aux aires des pics utilisés pour le dosage des tensioactifs. Par ailleurs, la quantité d'huile de colza résiduelle dans les phases aqueuses d'émulsions peut également être évaluée.

Finalement, après détermination de la concentration en tensioactif en phase aqueuse, le pourcentage de tensioactifs non adsorbés est calculé par rapport à la concentration de tensioactif initiale en solution aqueuse, correspondant à 100%.

2.3.4.3. Cas des mélanges d'émulsifiants

Mélanges protéine/protéine :

Dans le cas des émulsions stabilisées par un mélange de deux protéines, la quantité de protéines non adsorbées en phase aqueuse a été évaluée globalement en considérant une droite d'étalonnage moyenne pondérée par les proportions des deux protéines introduites initialement dans l'émulsion, ce qui suppose que les deux protéines aient la même propension à s'adsorber à l'interface.

Pour évaluer spécifiquement la concentration de chaque protéine dans la phase aqueuse, il faudrait par exemple réaliser une électrophorèse pour séparer les deux protéines et estimer leurs proportions respectives par densitométrie (Hunt & Dalgleish, 1994).

Mélanges tensioactif/tensioactif :

Dans le cas d'émulsions stabilisées par deux tensioactifs présentant des compositions en acides gras différentes, il est possible de quantifier spécifiquement chaque tensioactif en phase aqueuse des émulsions. Par exemple, dans une émulsion stabilisée par un mélange de Tween 20 et de Tween 80, l'aire du pic de C18:1 (présent à hauteur de 81% dans le Tween 80 mais absent du Tween 20) permet de déterminer la concentration en Tween 80 non adsorbé dans la phase aqueuse, après soustraction de la contribution de l'huile de colza résiduelle. La contribution du Tween 80 au pic de C12:0 (acide gras présent à hauteur de 4% dans le Tween 80 et de 54% dans le Tween 20) est retranchée, et l'aire restante du pic de C12:0 permet de déterminer la concentration en Tween 20 non adsorbé dans la phase aqueuse. La seule limite de cette méthode concerne les cas où les deux tensioactifs ont des profils en acides gras similaires, ce qui est le cas pour les mélanges de Tween 20 et de Span 20. Dans ce cas, il n'est pas possible de distinguer la contribution de chaque tensioactif aux pics d'acides gras

observés et donc de déterminer spécifiquement leurs concentrations respectives en phase aqueuse de l'émulsion.

Mélanges protéine/tensioactif :

Nous avons vérifié que la présence d'un tensioactif (le Tween 20) en solution aqueuse ne gêne pas la quantification des protéines par la méthode colorimétrique de Markwell, et réciproquement. Il est donc possible d'appliquer les méthodes de dosage décrites ci-avant lorsque la phase aqueuse d'émulsions contient à la fois des protéines et des tensioactifs non adsorbés.

2.3.5. Calcul de la couverture de surface des émulsifiants dans les émulsions

A partir du diamètre moyen des gouttelettes d'huile dans les émulsions et de la concentration d'émulsifiant en phase aqueuse, nous avons calculé la couverture de surface des différents émulsifiants utilisés seuls dans les émulsions (Γ , exprimée en mg m⁻²) et l'aire interfaciale occupée par une molécule d'émulsifiant (A, exprimée en nm² ou Å²).

$$\Gamma = \frac{(m_0 - m_1) \times V_{goutte} \times \rho}{S_{goutte} \times m_{huile}}$$
(25)

où m₀ est la masse d'émulsifiant initialement introduite dans une masse donnée d'émulsion (mg), m₁ est la masse d'émulsifiant non adsorbé dans cette même quantité d'émulsion (mg), V_{goutte} est le volume moyen d'une gouttelette d'huile calculé à partir du d_{3,2} (ml), ρ est la masse volumique de l'huile de colza purifiée ($\rho = 0.92 \times 10^3$ mg ml⁻¹, d'après Zhang et al., 2006), s_{goutte} est la surface moyenne d'une gouttelette d'huile calculée à partir du d_{3,2} (m²) et m_{huile} est la masse d'huile dans la masse d'émulsion considérée (mg).

$$A = \frac{1}{\Gamma} \times \frac{M}{N} \tag{26}$$

où Γ est la couverture de surface de l'émulsifiant en g nm⁻² ou en g Å⁻², M est la masse molaire de l'émulsifiant (g mol⁻¹) et *N* est le nombre d'Avogadro (mol⁻¹).

3. Mesure de l'oxydation des émulsions

3.1. Mesure de la consommation d'oxygène

Principe :

Cette méthode, précédemment décrite par Lethuaut et al. (2002) et Villière et al. (2005) consiste à mesurer la quantité d'oxygène restant dans l'espace de tête des flacons dans lesquels les émulsions sont incubées.

Mesure :

Cent microlitres d'espace de tête sont prélevés avec une seringue à gaz et injectés en CPG. L'appareil utilisé est un chromatographe Hewlett Packard 5890 Series II, équipé d'une colonne capillaire recouverte d'un polymère poreux (Varian plot fused silica, longueur 10 m, diamètre interne 0,32 mm, coating Molsieve 5A CP7535) et d'un détecteur à conductivité thermique (TCD) ou catharomètre. L'analyse est réalisée en mode isotherme à 50°C. L'injecteur est en mode « split » (débit de fuite = 30 ml min⁻¹) et sa température est de 50°C. La température du détecteur est fixée à 125°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 2 ml min⁻¹. Le passage dans le catharomètre de molécules autres que celles du gaz vecteur se traduit par un changement de conductivité thermique du milieu et permet donc l'enregistrement d'une variation de tension. Le chromatogramme obtenu présente 2 pics : le premier correspond à l'oxygène et le second à l'azote. Deux flacons sont utilisés pour chaque point de cinétique, avec 3 prélèvements de 100 µl par flacon.

Expression des résultats :

L'intégration de l'aire du pic d'oxygène, réalisée à l'aide du logiciel Borwin, permet de calculer la quantité d'oxygène présent dans l'espace de tête et donc la quantité d'oxygène consommé par kg d'huile (mmol O_2 kg⁻¹ huile), comme détaillé en *Annexe X*. La référence utilisée est l'air du laboratoire.

3.2. Méthodes de mesure de l'oxydation des lipides

3.2.1. Formation des diènes conjugués

Principe :

L'oxydation des acides gras polyinsaturés s'accompagne d'un réarrangement des doubles liaisons qui passent en position conjuguée. Les diènes conjugués (DC) présentent un pic d'absorption dans l'ultra-violet avec un maximum aux environs de 233 nm.

Mesure :

La méthode utilisée est adaptée des protocoles décrits par White (White, 1995) et Corongiu & Banni, 1994). Un volume connu d'émulsion est dilué au 1/1000^{ème} dans de l'isopropanol. La solution obtenue est centrifugée 4 minutes à 1200×g. Le surnageant est prélevé et introduit dans une cuve en quartz (Hellma, 108.002 QS, 10 mm). Le spectre d'absorption est enregistré entre 200 et 350 nm avec un pas d'acquisition de 1 nm, contre un blanc constitué d'isopropanol et de tampon dans des proportions correspondant à celles présentes dans l'échantillon. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Perkin Elmer UV/vis Lambda 12. Trois essais sont réalisés par échantillon.

Expression des résultats :

Les quantités de DC dans l'échantillon sont calculées à partir des valeurs d'absorbance mesurées à 233 nm et du coefficient d'extinction molaire des hydroperoxydes conjugués, qui est égal à 27000 M^{-1} cm⁻¹ (Pryor & Castle, 1984). Les résultats sont exprimés en mmoles d'équivalents hydroperoxydes par kg d'huile (mmol eq HP kg⁻¹ huile).

3.2.2. Formation et quantification des composés volatils

Principe :

Au cours des réactions d'oxydation secondaire des lipides, les hydroperoxydes se décomposent en divers composés volatils qui sont en partie libérés dans l'espace de tête des émulsions. La méthode utilisée pour quantifier plusieurs de ces composés est la micro-extraction en phase solide (SPME) couplée à la CPG en utilisant un étalonnage externe de chacun des composés quantifiés. Les composés volatils viennent s'adsorber sur une fibre en

fonction de leur concentration dans l'émulsion, de leur coefficient de partage entre l'émulsion et l'espace de tête, et de leur affinité pour la fibre.

Mesure :

Une fibre (CarboxenTM – polydiméthylsiloxane (PDMS), Supelco, épaisseur de film 75 µm) est introduite à travers le septum du flacon dans l'espace de tête au dessus de l'émulsion et exposée pendant 15 minutes à 25°C ou à 33°C, selon la température d'incubation de l'émulsion. Après l'exposition dans l'espace de tête, la fibre est placée dans le port d'injection, réglé à 250°C et équipé d'un liner de diamètre interne de 0,75 mm, du chromatographe. La purge de l'injecteur est maintenue fermée pendant les 5 premières minutes pour s'assurer de la désorption complète des composés dans la colonne. Pendant les 15 minutes suivantes, la purge est ouverte et la fibre balayée par un courant d'hydrogène avec un débit de 30 ml min⁻¹. L'appareil est un chromatographe Hewlett Packard 5890 Series II, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue Zebron ZB-624 dont la phase stationnaire est constituée de 6% de cyanopropylphényl et de 94% de méthyl-polysiloxane (longueur 30 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur du film 1,80 µm) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La température de l'injecteur est de 260°C. L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 2 ml min⁻¹. La température du détecteur est fixée à 250°C. Les débits d'air et d'hydrogène au niveau du détecteur sont fixés à 250 et 25 ml min⁻¹, respectivement. Le programme de température appliqué est le suivant :

 $35^{\circ}C (3 \text{ min}) \rightarrow \text{chauffage } 10^{\circ}C \text{ min}^{-1} \rightarrow 210^{\circ}C \rightarrow \text{chauffage } 20^{\circ}C \text{ min}^{-1} \rightarrow 260^{\circ}C (4 \text{ min}).$

Le passage dans le détecteur des composés volatils conduit à l'enregistrement d'une variation de tension. Les pics du chromatogramme obtenus sont identifiés par CPG couplée à un spectromètre de masse (Trace DSQII Thermofisher Scientific), dans des conditions identiques à celles de l'analyse par CPG-FID, excepté la nature du gaz vecteur qui est cette fois de l'hélium. Les spectres de masse sont obtenus avec une ionisation électronique de 70 eV et un balayage continu des rapports m/z de 35 à 350 à une vitesse de 2 scan s⁻¹. Ces spectres ont été comparés aux spectres de la base de données NIST. L'intégration des pics obtenus après analyse par CPG-FID est réalisée à l'aide du logiciel Borwin.

Calibration externe et expression des résultats :

Les aires des pics sont converties en quantité de composés volatils (µmol kg⁻¹ d'huile) d'après des courbes de calibration établies comme suit : des pré-émulsions stabilisées par le Tween 20 sont préparées à partir d'huile de colza non purifiée dans laquelle des quantités connues de

standards de composés volatils ont été incorporées. Les différents composés ont été ajoutés dans des quantités permettant de reproduire les proportions des 18 composés volatils identifiés dans les émulsions oxydées. Une gamme étalon de pré-émulsions a été préparée de façon à encadrer les quantités minimales et maximales de composés volatils produites dans les émulsions oxydées. Les pré-émulsions de calibration ont été réparties en flacons headspace fermés hermétiquement et équilibrées à 25°C ou à 33°C pendant 30 minutes. Les aires de pics ont été obtenues par SPME-CPG-FID comme expliqué précédemment.

3.2.3. Composition en acides gras d'huile extraite d'émulsions oxydées

Afin d'évaluer les quantités d'acides gras de l'huile de colza touchées par l'oxydation au cours de l'incubation des émulsions, la phase grasse de quelques émulsions oxydées a été extraite et sa composition en acides gras a été déterminée.

L'extraction de l'huile est réalisée à l'aide d'un mélange hexane/isopropanol 3/2 v/v. Environ exactement 1 g d'émulsion est introduit dans un tube à centrifugation en polypropylène. Dix millilitres d'hexane/isopropanol 3/2 sont ajoutés. Le contenu des tubes est homogénéisé par agitation au vortex pendant quelques secondes, puis au moyen d'un homogénéisateur rotatif (Heidolph SilentCrusher M 595-06000-00-2 5000-26000 rpm) à 12000 rpm pendant 1 minute. Les tubes sont ensuite centrifugés (2000 rpm, 5 minutes, 20° C) et la phase organique contenant l'huile extraite est prélevée. Un demi millilitre de cette phase organique est introduit dans un tube à vis en verre préalablement taré et le solvant est évaporé sous azote. Après pesée jusqu'à poids constant, 200 µl d'acide heptadécanoïque, 5 mg ml⁻¹ dans de l'acétone/méthanol ; 2/1 ; v/v, sont ajoutés. La composition (g/100 g d'acides gras totaux) et la teneur en acides gras (g kg⁻¹ d'huile) sont ensuite déterminées par CPG selon le protocole décrit en *Annexe II*. Les quantités d'acides gras oxydés sont calculées d'après les teneurs en acides gras dans l'huile purifiée de départ et dans l'huile oxydée.

3.3. Evaluation de l'altération des protéines

3.3.1. Evolution de la fluorescence des protéines dans les émulsions

Principe & objectif :

L'évolution du signal de fluorescence des protéines au cours de l'incubation des émulsions stabilisées par des protéines dans les différentes conditions testées a été suivie par fluorescence frontale. Cette méthode fournit une information sur les modifications globales subies par les protéines au cours de l'incubation des émulsions (Rampon et al., 2001). Parmi les méthodes d'évaluation de l'altération des protéines testées durant ce projet, la fluorescence frontale est la plus rapide et simple à mettre en œuvre, ce qui a permis de l'appliquer aux émulsions incubées dans toutes les conditions testées et de réaliser des mesures à des temps d'incubation rapprochés.

Mesure :

Les spectres de fluorescence ont été acquis à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi F-4500 (Tokyo, Japon) équipé d'un accessoire de mesure en mode frontal réglé à 56°. Les fentes d'excitation et d'émission sont réglées à 5,0 et 2,5 nm, respectivement. Environ 140 μ l d'échantillon (émulsion, phase aqueuse d'émulsion ou phase crémée d'émulsion) sont déposés entre les deux lames d'une cellule de quartz de trajet optique 0,5 mm (Hellma, 106 QS). Les analyses sont réalisées dans une pièce à température contrôlée (22 ± 3°C). Trois répétitions des spectres sont réalisées sur trois prises d'essais indépendantes pour chaque échantillon. Les spectres d'émission du tryptophane sont enregistrés entre 290 et 350 nm, avec une longueur d'onde d'excitation fixée à 290 nm, une vitesse d'acquisition de 240 nm min⁻¹ et une tension de 950 V.

Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence à 334 nm (I) divisée par l'intensité enregistrée à t = 0 (I₀).

3.3.2. Solubilité des protéines

La solubilité des protéines extraites des émulsions fraîches, incubées 24 h ou 48 h, et des phases aqueuse et crémée de ces émulsions, a été évaluée. Après la collecte des phases aqueuse et crémée comme décrit précédemment (cf. 2.3.3. Séparation et récupération des phases aqueuse et crémée), une aliquote de 200 µl de chaque fraction (émulsion, phase aqueuse filtrée ou phase crémée) est prélevée dans un tube Eppendorf. Après ajout de 1800 µl d'isopropanol pour précipiter les protéines et solubiliser les lipides, les tubes sont agités et centrifugés (14000×g, 5 minutes, 10°C), le surnageant est éliminé et le culot de protéines précipitées est lavé une seconde fois par 1800 µl d'isopropanol. Lors de cette étape, afin de remettre le précipité en suspension, les tubes sont agités quelques secondes au vortex, placés 5 minutes au bain à ultrasons à température ambiante puis de nouveau agités quelques secondes au vortex. Les tubes sont alors centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment puis le surnageant éliminé. Cinq cent microlitres d'HCl 2N sont ajoutés puis les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 1 heure, au cours de laquelle une agitation des tubes au vortex pendant quelques secondes est effectuée toutes les 10 minutes. Une nouvelle précipitation des protéines est ensuite réalisée en ajoutant 500 µl de solution d'acide trichloroacétique (TCA) par tube tout en plaçant les tubes dans un bain glacé pendant 10 minutes. Les tubes sont alors à nouveau centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment et le surnageant éliminé. Les culots sont lavés par deux fois 1 ml d'éthanol/acétate d'éthyle ; 1/1 ; v/v puis une fois 1 ml d'isopropanol, en agitant au vortex et en centrifugeant les tubes entre chaque lavage. Enfin, les culots lavés sont repris dans 1 ml de solution de chlorure de guanidium (GuCl) 6M et placés sous agitation magnétique dans un bain thermostaté à 37°C pendant 30 minutes à 12 h. Après centrifugation (14000×g, 3 minutes, 10°C) pour éliminer les éventuelles fractions insolubles, une titration de la concentration en protéines solubles dans les surnageants est effectuée par la méthode colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA) (Smith et al., 1985) en utilisant des gammes étalons réalisées pour chaque protéine (SAB, BLG ou BCN, 0 à 0,2 g l⁻¹). La concentration en protéines solubles est exprimée en g l⁻¹ et en % par rapport à la concentration dans les échantillons correspondant aux émulsions fraîches.

3.3.3. Formation de protéines carbonylées

Principe & objectif :

Pour évaluer les dégradations oxydatives subies par les protéines au cours de l'incubation des émulsions stabilisées par des protéines (SAB, BLG ou BCN) en présence de l'initiateur FeSO₄/EDTA à 25°C, nous avons dosé les groupements carbonyles fixés aux protéines extraites et resolubilisées. La méthode de dosage des groupements carbonyles est basée sur la réaction de ces groupements avec la dinitro 2,4-phénylhydrazine (DNPH) qui conduit à la formation d'un composé coloré (Levine et al., 1990). Cette méthode a été appliquée aux protéines extraites des émulsions fraîches, incubées 24 h ou 48 h, et des phases aqueuse et crémée de ces émulsions. L'objectif était d'obtenir des informations sur les dégradations oxydatives subies par les protéines adsorbées à la surface des gouttelettes d'huile ou non adsorbées dans la phase aqueuse.

Mesure :

Après la collecte des phases aqueuse et crémée comme décrit précédemment (cf. 2.3.3. Séparation et récupération des phases aqueuse et crémée), 3 aliquotes de 200 μ l de chaque fraction (émulsion, phase aqueuse filtrée ou phase crémée) sont prélevées dans des tubes Eppendorf. Les échantillons sont traités selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent (3.3.2. Solubilité des protéines), l'HCl 2N étant remplacé par une solution de DNPH 10 mM dans de l'HCl 2N. Après reprise des culots dans la solution de GuCl 6M et centrifugation (14000×g, 3 minutes, 10°C), la lecture de l'absorbance des surnageants est réalisée à 370 nm contre les surnageants des tubes sans DNPH correspondants.

Expression des résultats :

La concentration en groupements carbonyles dans les échantillons (μ mol l⁻¹) est calculée d'après la loi de Beer-Lambert en utilisant le coefficient d'absorption molaire des carbonyle à 370 nm ($\epsilon = 22000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Levine et al., 1990). La quantité de groupements carbonyles est ensuite rapportée à la concentration en protéines solubles (μ mol de carbonyles par g de protéines solubles).

3.3.4. Agrégation des protéines et implication des ponts disulfures

L'agrégation des protéines natives ou extraites des émulsions fraîches, incubées 24 h ou 48 h, et des phases aqueuse et crémée de ces émulsions a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), en conditions non réductrices ou réductrices. Les culots de protéines sont repris dans un tampon Laemli à pH 6,8 contenant 0,5 M de Tris, 10 g/100 g de SDS, 30 g/100 g de glycérol et du bleu de bromophénol de façon à obtenir une concentration en protéines théorique de 2 mg ml⁻¹. Du β -mercaptoéthanol est ajouté à hauteur de 8 g/100 g lorsque l'électrophorèse est réalisée en conditions réductrices. Les échantillons sont vortexés, incubés à température ambiante pendant 1,5 h et dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Des volumes de 10 µl d'échantillon ou de 20 µl de marqueur de poids moléculaire (Bio-Rad, range #161-0305) sont déposés sur des gels d'électrophorèse contenant 10% d'acrylamide (pour les échantillons de SAB) ou 12% d'acrylamide (pour les échantillons de BLG et de BCN). Le tampon de migration contient 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1 g/100 g de SDS. La migration est réalisée à 20 mA, puis les gels sont colorés avec une solution de bleu de Coomassie, décolorés puis scannés.

4. Etude des films interfaciaux impliqués dans les émulsions

4.1. Préparation de films de Langmuir et établissement d'isothermes de compression

Principe :

La balance de Langmuir est un dispositif qui permet de mesurer une tension superficielle en fonction de la densité de molécules tensioactives présentes à l'interface air-eau.

L'appareil comporte une cuve en téflon contenant la phase liquide ou sous-phase, équipée d'une ou deux barrières mobiles dont le déplacement permet de faire varier l'aire totale disponible et donc la densité des molécules à l'interface. La cuve est équipée d'un capteur de pression : une lame de Wilhelmy, permettant de mesurer la tension superficielle. Lorsqu'une lame mince est plongée dans un liquide, la tension de surface se manifeste par la formation d'un ménisque le long de son périmètre (Figure 21). La force exercée par le liquide sur la lame (F) est alors égale au poids du liquide pendant à la lame, selon l'équation :

 $F = p \gamma \cos \theta \qquad (27)$

où p est le périmètre de la lame, γ la tension interfaciale et θ l'angle de contact.

Lorsque la lame est entièrement mouillée, ce qui est le cas pour les lames en platine, en verre ou en papier, θ est nul ; la tension interfaciale est alors directement proportionnelle à la force exercée par le liquide sur la lame, soit : $\gamma = \frac{F}{p}$.



Figure 21. Représentation schématique d'une lame de Wilhelmy à la surface d'un liquide.

Les molécules tensioactives adsorbées à l'interface diminuent la tension superficielle. La pression de surface ou pression de film bidimensionnelle (π) est définie comme la différence entre la tension de surface de la sous-phase seule (γ_0) et la tension de surface de la sous-phase couverte de la couche de molécules tensioactives (γ), soit $\pi = \gamma_0 - \gamma$.

Mesure :

Pour l'étude des couches de protéines, nous avons utilisé une balance de Langmuir KSV 3000 (KSV Instruments, Helsinki, Finlande) équipée d'une cuve en téflon de surface maximale 730,5 cm² dont la température est régulée par une circulation d'eau thermostatée à 25°C dans des conduits placés directement sous la cuve. La lame est une lame de platine de périmètre 21,2 mm. Pour les films constitués d'une seule protéine, des solutions de protéines sont préparées à 1 mg ml⁻¹ dans du tampon PIPES 10 mM, NaCl 80 mM, pH 6,7 et des volumes allant de 55 à 60 μ l sont déposés à la surface de la sous-phase constituée du même tampon. Un temps d'équilibrage de 30 minutes est réglée à 10 mm min⁻¹ au cours de la compression, soit 15 cm² min⁻¹. Dans le cas des films constitués d'un mélange protéine + co-émulsifiant, la solution de co-émulsifiant (DLPC ou Tween 20) est préparée dans du chloroforme ; le dépôt du co-émulsifiant à la surface de la sous-phase constituée du sourd d'abord réalisé et suivi d'un temps d'équilibrage de 30 minutes. La solution de protéine dans du tampon est ensuite déposée, et un second temps d'équilibrage de 30 minutes appliqué avant la compression. Les concentrations des solutions de protéine et de co-émulsifiant ainsi que les

volumes déposés ont été calculés de façon à respecter les ratios interfaciaux utilisés dans les émulsions correspondantes.

Pour l'étude des couches de tensioactifs, une balance de Langmuir NIMA 302 LL (NIMA Technology Ltd, Coventry, Angleterre) équipée d'une cuve en téflon de surface maximale 267 cm² dont la température est régulée par une circulation d'eau thermostatée à 25 °C dans des conduits placés directement sous la cuve, est utilisée. La lame est une lame de platine de périmètre 21,2 mm. Les solutions de tensioactifs sont préparées dans du chloroforme. Dans le cas des films constitués de mélanges Tween 20 + co-tensioactif, les mélanges sont réalisés dans les proportions souhaitées avant le dépôt sur la sous-phase. Un temps d'équilibrage de 30 minutes est respecté avant la compression. La vitesse de fermeture des barrières est réglée à 20 mm min⁻¹ au cours de la compression, soit 20 cm² min⁻¹.

4.2. Prélèvements de films par la technique de Langmuir-Blodgett

Des films de protéines (BCN ou BLG), utilisées seules ou en mélange avec la DLPC, ont été prélevés sur balance de Langmuir en vue de les caractériser par microscopie à force atomique (AFM). Les prélèvements sont effectués selon la technique de Langmuir-Blodgett, qui consiste à transférer un film interfacial plan sur un support solide vertical, ici une plaque de mica. Le mica préalablement clivé est fixé sur un axe vertical motorisé, et immergé d'environ 10 mm dans la cuve de la balance de Langmuir KSV 3000. Des solutions aqueuses de protéines et, le cas échéant, des solutions chloroformiques de DLPC, sont ensuite déposées en surface de la sous-phase (tampon à pH 6,7) comme décrit dans le paragraphe précédent. Les dépôts sont réalisés à une pression de surface constante, la pression choisie ayant été déterminée par les isothermes de compression comme correspondant à l'aire interfaciale occupée par les protéines dans les émulsions, soit 15,8 N m⁻¹ pour les films de β lactoglobuline et 21,2 N m⁻¹ pour les films de β -caséine. Pour ce faire, la barrière de la cuve est fermée à une vitesse de 20 mm min⁻¹ jusqu'à atteindre la pression de consigne. Une fois cette pression atteinte, le film interfacial est prélevé en remontant le mica à une vitesse de 4 mm min⁻¹. Le dépôt obtenu est séché dans un dessicateur à température ambiante et conservé ainsi jusqu'à l'analyse en AFM.

4.3. Etude des films par microscopie à force atomique (AFM)

Principe :

La microscopie à force atomique est une technique qui consiste à analyser la topographie de surface d'un échantillon. Une pointe de dimensions nanométriques couplée à un micro-levier se déplace verticalement et latéralement à la surface de l'échantillon. Les déformations du micro-levier en fonction des interactions pointe-surface sont enregistrées et permettent de construire une image tri-dimensionnelle de la surface de l'échantillon. Selon la distance entre la pointe et la surface de l'échantillon, on distingue différents modes d'analyse :

- Le mode contact : la distance entre la pointe et la surface de l'échantillon est faible ; les interactions impliquées sont majoritairement répulsives.

- Le mode non-contact : le micro-levier oscille avec une faible amplitude à une distance relativement élevée de l'échantillon, la pointe n'est donc pas en contact avec la surface ; les interactions impliquées sont majoritairement attractives.

- Le mode contact intermittent ou tapping : la distance entre la pointe et la surface de l'échantillon est intermédiaire, le micro-levier oscille de façon à ce que la pointe effleure la surface en bout d'oscillation ; les interactions impliquées sont majoritairement attractives, excepté lorsque la distance pointe-surface est minimale.

Mesure :

Des images des films de Langmuir-Blodgett préalablement constitués et séchés ont été obtenues par AFM en mode tapping ou en mode contact. L'appareil utilisé est un microscope Autoprobe CPI Park Scientific Instruments (Sunnyvale, Etats-Unis). Les images sont acquises avec une sonde nitride silicone pyramidale conventionnelle (RTESPA-CP, k -20 N m⁻¹, Digital Instruments, Santa Barbara, Etats-Unis). Chaque échantillon est étudié en minimum 5 emplacements différents, en appliquant différents agrandissements : les dimensions des images acquises varient de $50 \times 50 \,\mu\text{m}$ à $1 \times 1 \,\mu\text{m}$. La force de scan est inférieure à 10 nN afin de minimiser la déformation de l'échantillon. La résolution est fixée à 256×256 pixel². Le signal de déflection est déterminé par la dérivée première du signal topographique. Les images sont analysées grâce au logiciel WSxM 4.0 (Nanotec Electronica, Espagne).

5. Traitement des données

5.1. Analyse de variance

Afin de déterminer si les concentrations en émulsifiants non adsorbés varient significativement au cours de l'incubation des émulsions, des analyses de variance à un facteur (ANOVA) ont été réalisées. Lorsqu'un effet significatif au seuil de 5% (p < 0.05) est mis en évidence, une procédure des comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls est mise en place pour confirmer l'effet observé. Ces analyses ont été effectuées avec le logiciel StatGraphics Plus 5.1 (StatPoint Technologies, Etats-Unis).

5.2. Ajustement des données d'oxydation et de fluorimétrie

Les données de consommation d'oxygène, de formation des diènes conjugués et de fluorescence des protéines dans les émulsions au cours de leur incubation ont été ajustées avec un modèle de Gompertz modifié. Ce modèle est couramment utilisé par les microbiologistes pour ajuster des courbes présentant 3 phases caractéristiques : une phase de latence, une phase exponentielle ou phase d'augmentation et un plateau. L'équation utilisée pour ajuster les données de consommation d'oxygène et de formation des DC est la suivante :

$$Y = y_0 + A \exp\left(-\exp\left(1 + \frac{\mu \exp(1) \times (L-t)}{A}\right)\right)$$
(28)

où Y est la consommation d'oxygène (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ huile) ou la formation des DC (mmol eq HP kg⁻¹ huile), y₀ est égal à zéro pour la consommation d'oxygène ou à la valeur initiale de DC dans les émulsions (mmol eq HP kg⁻¹ huile), t est le temps d'incubation (h), *A* est la valeur plateau de consommation d'oxygène (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ huile) or de DC formés (mmol eq HP kg⁻¹ huile), μ est la vitesse de consommation d'oxygène (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ huile) de DC formés (mmol eq HP kg⁻¹ huile), μ est la vitesse de consommation d'oxygène (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ huile h⁻¹) ou de formation des DC (mmol eq HP kg⁻¹ huile h⁻¹) et *L* est le temps de latence (h).

Une régression non linéaire est appliquée pour estimer L et μ avec l'algorithme de Marquardt. La valeur de A est fixée à 134 mmol O₂ kg⁻¹ d'huile pour la consommation d'oxygène ou à 80 mmol eq HP kg⁻¹ d'huile pour la formation des DC, ces valeurs ayant été déterminées expérimentalement. Les estimations initiales de L et μ sont respectivement de 1,0 et 1,0. Des intervalles de confiance asymptotiques pour L et μ sont calculés avec un niveau de signification de 95%. Le logiciel utilisé est StatGraphics Plus 5.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, Etats-Unis).

D'après les valeurs estimées pour *L* et μ , le temps (t_{1/2}, h) correspondant au temps d'incubation pour lequel la moitié de la consommation d'oxygène maximale ou de la valeur maximale de DC formés était atteinte a été calculé d'après l'équation suivante :

$$t_{1/2} = L - \frac{\left(\ln\left(-\ln\frac{Y-y_0}{A}\right) - 1\right) \times A}{\mu \times \exp(1)}$$
(29)

Dans le cas des courbes de suivi du signal d'émission de fluorescence des protéines à 334 nm, on observe une diminution du signal au cours du temps, contrairement aux courbes de consommation d'oxygène et de formation des DC pour lesquelles le paramètre étudié augmente au cours du temps. L'équation utilisée pour ajuster les données de diminution du signal de fluorescence des protéines a donc été modifiée comme suit :

$$Y = y_0 - (y_0 - A) \exp\left(-\exp\left(1 + \frac{\mu \exp(1) \times (L - t)}{y_0 - A}\right)\right)$$
(30)

où Y est l'intensité du signal d'émission de fluorescence à 334 nm normalisée par rapport à la valeur à t₀ (I / I₀, sans unité), y₀ est la valeur initiale du signal normalisé, soit y₀ = 1 (I₀ / I₀, sans unité), t est le temps d'incubation (h), *A* est la valeur plateau du signal normalisé (0,10 \leq $A \leq 0,30$), μ est la vitesse de diminution du signal normalisé (h⁻¹) et *L* est le temps de latence (h). Les estimations initiales de *L* et μ sont respectivement de 0,1 et 0,1.

Comme précédemment, une régression non linéaire est appliquée pour estimer L et μ avec l'algorithme de Marquardt. Des intervalles de confiance asymptotiques pour L et μ sont calculés avec un niveau de signification de 95%. Le logiciel utilisé est Statgraphics Plus 5.1 (StatPoint Technologies, Warrenton, Etats-Unis).

5.3. Analyse en composantes principales

Les données de consommation d'oxygène et de formation des principaux composés volatils dans les émulsions stabilisées par la SAB, la β -caséine, la β -lactoglobuline ou le Tween 20 à pH 6,7, ont été rassemblées dans une matrice notée X, comprenant 378 lignes et 9 colonnes (consommation d'oxygène et 8 composés volatils). Chaque ligne correspond à une observation pour un émulsifiant donné, un temps d'incubation donné et une condition d'incubation donnée. Les coefficients de corrélation entre chaque couple de paramètres dans

X ont été calculés, formant la matrice de corrélation notée C, de dimensions 9×9 . Chaque élément c_{ij} de C correspond au coefficient de corrélation entre les paramètres d'indices i et j. La matrice X a été traitée par analyse en composantes principales (ACP) des données normées, c'est-à-dire divisées par l'écart-type de chaque colonne de la matrice. La normalisation des données se justifie du fait que les unités des différentes colonnes sont différentes et que les intensités des données, en valeur absolue, ne sont pas comparables entre elles. L'analyse statistique a été réalisée dans l'environnement MATLAB[®] (version 7, The MathWorks, Natick, Etats-Unis).

Résultats et discussion

Introduction

La section Résultats et discussion de ce manuscrit est présentée sous forme de publications et de projets de publications dans des revues à comité de lecture, rédigés en anglais.

L'objectif de cette thèse était de montrer que la structure de l'interface entre l'huile et la phase aqueuse peut être maîtrisée de façon à protéger les lipides en émulsion contre l'oxydation. Afin d'étudier l'effet de la couche interfaciale sur l'oxydation des lipides dans ces émulsions, il a fallu formuler des émulsions en minimisant la concentration en émulsifiants non adsorbés en excès dans la phase aqueuse, et caractériser physiquement ces émulsions. Ceci a requis l'utilisation voire le développement de méthodes expérimentales permettant la récupération de la phase aqueuse des émulsions et le dosage des émulsifiants non adsorbés (protéines et/ou tensioactifs). La mise au point de ces méthodes et leur application à la caractérisation physique d'émulsions stabilisées par des protéines ou des tensioactifs fait l'objet de la première publication présentée dans le premier chapitre de cette section.

Le second chapitre décrit les résultats relatifs à l'oxydation des émulsions stabilisées par les couches interfaciales de composition les plus simples, c'est-à-dire stabilisées par un seul émulsifiant, et met l'accent sur les différences d'oxydabilité entre les émulsions stabilisées par des protéines ou par des tensioactifs. Ces différences ont tout d'abord été mises en évidence en présence d'un initiateur d'oxydation composé de fer à l'état chélaté, et sont décrites dans la deuxième publication présentée. Ce chapitre se poursuit par une troisième publication, dans laquelle les différences d'oxydabilité des émulsions précédemment décrites sont confirmées dans d'autres conditions d'incubation, impliquant divers mécanismes d'initiation de l'oxydation des lipides.

Le troisième chapitre présente une étude portant sur les modifications subies par les protéines au cours de l'incubation des émulsions stabilisées par des protéines. Ces résultats sont décrits dans la quatrième publication et soulèvent deux principaux points de discussion : le phasage des réactions impliquées dans l'oxydation des lipides et dans les modifications/dégradations subies par les protéines, et la propension des protéines à subir ces modifications/dégradations en fonction de leur localisation dans les émulsions. Enfin, le quatrième et dernier chapitre présente les résultats relatifs à l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des couches interfaciales complexes : des mélanges d'émulsifiants ou des protéines dont la conformation a été modifiée. Certaines des interfaces impliquées dans ces systèmes ont été reconstruites sur des films plans afin de permettre l'étude de leur structure par des méthodes de caractérisation physique, et d'établir si l'oxydabilité des émulsions peut être reliée aux caractéristiques de composition et de structure des couches interfaciales stabilisant les gouttelettes lipidiques. L'ensemble de ces résultats est rapporté dans deux projets de publication : le premier concerne les couches interfaciales constituées de mélanges de tensioactifs ; le second concerne les couches interfaciales constituées de protéines modifiées conformationnellement ou utilisées en mélange avec un phospholipide.

Pour terminer, cette section se conclut par une synthèse en français des résultats considérés comme les plus marquants de ce travail de thèse.

1. Formulation et caractérisation physique des émulsions (Article 1)

Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oilin-water emulsions

Journal of Colloid and Interface Science, 2011, 354, 739-748

Claire Berton, Claude Genot, Marie-Hélène Ropers*

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes, France

ABSTRACT

Unadsorbed emulsifiers affect the physical and chemical behaviour of oil-in-water (O/W) emulsions. A simple methodology to quantify unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase of O/W emulsions has been developed. Emulsions were centrifuged and filtered to separate the aqueous phase from the oil droplets and the concentration of unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase determined. The quantification of unadsorbed surfactants based on the direct transesterification of their fatty acids was validated for Tween 20, Tween 80, citric acid ester (Citrem), Span 20 and monolauroyl glycerol. To determine unadsorbed proteins, results obtained with Folin-Ciocalteu reagent or UV-spectrophotometry were compared on emulsions stabilised by β -lactoglobulin (BLG), β -casein (BCN) or bovine serum albumin (BSA). The first method gave more accurate results especially during aging of emulsions in oxidative conditions. The whole methodology was applied to emulsions stabilised with single or mixed emulsifiers. This approach enables optimization of emulsion formulations and could be useful to follow changes in the levels of unadsorbed emulsifiers during physical or chemical aging processes.

Keywords

Protein; Surfactant; Unadsorbed emulsifiers; Interface; Oil-in-water emulsion.

1. Introduction

Oil-in-water (O/W) emulsions are dispersed systems stabilized with surface-active molecules called emulsifiers. Several kinds of emulsifiers exist, including proteins, polymers, ionic and non-ionic surfactants (Grigoriev & Miller, 2009). Emulsifiers adsorb at the oil-water interface where they decrease the free energy of the system allowing its stabilization. However, only a part of the emulsifier is actually located at the interface. An unadsorbed fraction is present in the aqueous phase either as monomers or as aggregates such as micelles (McClements & Decker, 2000). Although unadsorbed emulsifiers do not directly stabilize the oil droplets, they participate to the physical and chemical properties of the systems. For example, they induce the depletion flocculation of emulsions (Dauphas et al., 2008; Dickinson & Golding, 1997; Dickinson et al., 2003; Ye, 2008). Unadsorbed proteins protect lipid droplets from oxidation by scavenging free radicals and chelating metal ions while unadsorbed surfactants interfere with lipid oxidation by forming micelles that can also solubilise fatty acids or hydroperoxides (Cheng et al., 2010; Donnelly et al., 1998; Hu et al., 2003a; McClements & Decker, 2000; Nuchi et al., 2002; Ponginebbi et al., 1999; Villière et al., 2005). Lipid oxidation in emulsions can affect the concentrations of emulsifiers at the interface due to the formation of oxidation products that take place at the interface (Genot et al., 2003). The amount of unadsorbed emulsifiers may also evolve during incubation of emulsions, which modifies the physical and chemical characteristics of the system (Bongard et al., 2009; Dalgleish et al., 2002; Euston & Mayhill, 2001). It is therefore interesting to measure unadsorbed emulsifiers not only in freshly prepared emulsions, but also along the incubation period. However, measurements of unadsorbed emulsifiers are rarely undertaken when experiments related to lipid oxidation are carried out.

Two main strategies have been developed to measure unadsorbed emulsifiers. The first one consists in evaluating directly the unadsorbed fraction through in situ measurement of a physical parameter that is modified upon the emulsifier adsorption and quantitative calibration. Accordingly, front-face fluorimetry can be used to directly evaluate unadsorbed fraction of bovine serum albumin in dodecane emulsions (Castelain & Genot, 1994). Unfortunately, the fluorescence characteristics of emulsions depends both on the oil and the protein used (Rampon et al., 2004) and the method failed to be generalized. The second strategy to evaluate unadsorbed emulsifier consists in separating the aqueous phase from the oil droplets covered by the adsorbed emulsifier and to quantify the emulsifier in one or both phases. The oil droplets are generally separated through centrifugation at moderate speed rate

(Rampon et al., 2003b). This step can be performed directly if the size of the oil droplets is sufficient to allow their creaming. If the emulsion contains small size droplets with density very close to the density of the aqueous phase density, these droplets do not cream. They can be separated thanks to dilution of the emulsion in sucrose solution to increase the density of the aqueous phase prior centrifugation that is performed on sucrose gradient (Bongard et al., 2009; Le Denmat et al., 2000; Patton & Huston, 1986). This procedure also allows avoiding the presence of remaining unadsorbed protein in the creamed phase. The emulsifier is then measured either in one phase only, or in both phases (aqueous phase and creamed layer), which makes possible to calculate mass balance. A technique employing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on the creamed phase of O/W emulsions and photometric densitometry has been developed to determine the amount and composition of adsorbed and unadsorbed proteins (Hunt & Dalgleish, 1994).

The current methods to quantify emulsifiers in aqueous solutions must be distinguished for proteins and surfactants. For proteins, the most frequent methods are based on the presence of aromatic amino acids (spectrophotometric quantification (Layne, 1957); colorimetric quantification (Lowry et al., 1951)), basic and hydrophobic amino acids (Coomassie Blue method (Bradford, 1976)), the reactivity of peptide bonds (Biuret or bicinchoninic acid reaction (Gornall et al., 1949; Smith et al., 1985)) or the determination of total nitrogen (Kjedahl method (1995)). These methods are suitable for mostly soluble proteins (Davies, 1988). The methods to determine concentrations of surfactants are chosen according to the charge of the molecules. The concentration of non-ionic surfactants are determined according to the methods of Brown & Hayes (Brown & Hayes, 1955) or Crabb & Persinger (Crabb & Persinger, 1964). The charged surfactants can be both separated and quantified according to the method of Im et al. (Im et al., 2008). These methods require numerous extraction steps with organic solvents or specific equipments.

Our objective was to develop a simple methodology allowing the quantification of unadsorbed food-grade emulsifiers in the aqueous phase of O/W emulsions during their aging whatever the underlying destabilization phenomena: physical aging (coalescence) or chemical aging (lipid oxidation). For this purpose, methods allowing the quantification of ester surfactants or proteins were chosen and optimized, when necessary. Sequential separation of the aqueous phase followed by specific measurement of the unadsorbed emulsifiers was developed, considering both the convenience of the procedure and the possible interferences due to the small oil droplets, or to the aging of the emulsion. The quantification methods were applied to emulsions stabilized with single or mixed emulsifiers, which finally enabled to

optimize the emulsion formulation or to characterize the evolution of unadsorbed emulsifiers during incubation in oxidative conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Rapeseed oil was purchased in a local supermarket. It was stripped by means of either alumina (MP Alumina N-Super I, MP Biomedicals, France) to eliminate impurities and tocopherols, or silica (Florisil, Sigma Aldrich, France) to eliminate impurities while retaining tocopherols. This solvent-free procedure was adapted from Maldonado-Valderrama et al. (2008). Briefly, approximately 15 ml absorbent and 30 ml oil were mixed in a 50 ml-polypropylene centrifuge tube. The mixture was vigorously shaken and the tubes were then rotated in the dark at 4 °C for 24 h. The tubes were then centrifuged (Jouan GT 422 centrifuge, Jouan, Inc, Winchester, VA) for 20 min at $2000 \times g$ at 20 °C to separate absorbent from stripped oil. Stripped oil was collected, centrifuged again in the same conditions and finally kept into amber glass vials after being placed under nitrogen flow for 10 min. Vials were hermetically sealed and stored at -20 °C.

Bovine serum albumin (BSA) fraction V was obtained from MP Biomedicals. β -casein (BCN) (purity \geq 98%) was purchased from Lactalis. β -lactoglobulin (BLG, purity > 99%) was purified from whey protein isolate (Prolacta 90, Lactalis) by selective precipitation (Mailliart & Ribadeau-Dumas, 1988). Tween 20 (grade Sigma Ultra), Tween 80 (grade Sigma Ultra), monolauroyl glycerol (MLG), Span 20, PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid), sodium carbonate (Na₂CO₃), potassium sodium tartrate (C₄H₄KNaO₆, 4H₂O), copper(II) sulfate (CuSO₄), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and iron(II) sulfate (FeSO₄) were purchased from Sigma Aldrich (France). NaCl, sodium dodecyl sulfate (SDS), heptadecanoic acid (C17:0, purity \geq 99.0%, Mw = 270.5 g mol⁻¹) and methyl heptadecanoate (purity \geq 99.5%, Mw = 284.5 g mol⁻¹) were purchased from Fluka Chemika (France). Sodium hydroxide (NaOH) was purchased from Merck. Monoheptadecanoyl glycerol (purity \geq 99.0%, Mw = 344.48 g mol⁻¹) was purchased from Nu-Chek-Prep (Elysian, MN). A standard mixture of fatty acid methyl esters (Sigma Chemical Co. L9405) was used for fatty acid identification. Citric acid ester (Citrem) was obtained from Danisco (Grindsted,

Denmark). Hexane of HPLC grade, toluene, methanol and acetone of analytical grade, and sulphuric acid 96% were purchased from Carlo Erba (France). The buffer was composed of NaCl (80 mM) and PIPES (10 mM), and was adjusted at pH 6.7.

The molecular structures of the surfactants (Tween 20, Tween 80, MLG, Citrem and Span 20) are shown in Fig. 1. All these surfactants contain esterified fatty acid chains of different chain lengths. Further information concerning the surfactants are indicated in Table 1.



Fig. 1. Molecular structures of (A) Tween 80, (B) Tween 20, (C) monolauroyl glycerol (MLG), (D) Span 20 and (E) Citrem.

Table 1

Characteristics of surfactants. Molecular weights were provided by the suppliers.

Surfactant	Chemical Abstracts Service (CAS) number	Molecular weight (g.mol ⁻¹)	Critical micelle concentration (CMC) (mM)	Hydrophilic – lipophilic balance (HLB)
Tween 20	9005-64-5	1228	0.050*	16.7*
Tween 80	9005-65-6	1310	0.010*	15.0*
Citrem	-	531.0	-	-
Span 20	1338-39-2	346.5	-	-
Monolauroyl glycerol	142-18-7	274.4	-	-

* (Hait & Moulik, 2001)

2.2. Methods

2.2.1. Determination of fatty acid composition of lipids and surfactants

Fatty acid composition of the oil and the surfactants was determined following a procedure adapted from Christie (Christie, 1989). Fatty acids were converted into fatty acid methyl esters (FAMEs) by transesterification in the presence of methanol and sulphuric acid. The internal standard was heptadecanoic acid. Approximately 15 mg of pure oil or surfactant were placed in a glass test tube. One hundred μ l of heptadecanoic acid, 5 mg ml⁻¹ in acetone/methanol (2/1; v/v) were added and the solvent evaporated under nitrogen flow. Rapeseed oil was dissolved in 500 µl of toluene. Two ml of methanol and 400 µl of sulphuric acid were added and the mixture was vortexed for 1 min at 3000 rpm. The tube was then hermetically sealed and heated at 100 °C for 1 h. The mixture was then cooled to room temperature and 1 ml distilled water and 2 ml hexane added. The tube was shaken and centrifuged (2 min, $1000 \times g$, 20 °C). The upper organic phase containing the FAMEs was recovered and when necessary diluted with hexane before gas chromatography (GC). The samples were injected in the injection port of the GC (Hewlett Packard 5890 Series II), set to 250 °C. The purge was opened after 1.5 min (hydrogen split flow: 20 ml min⁻¹). FAMEs were separated on a polar chromatography column (30-m long, 0.320-mm internal diameter, 0.25µm film thickness, polar stationary phase constituted of 50% cyanopropylphenyl and 50% methyl-polysiloxan; DB-225 J&W Scientific). Hydrogen at 2 ml min⁻¹ was used as the carrier gas and the temperature program was as follows: 1 min at 50 °C, 10 °C min⁻¹ until 180 °C, 5 °C min⁻¹ until 220 °C and 15 min isothermal. The eluted compounds were detected with a flame ionization detector (FID) set at 250 °C and hydrogen and air flows set at 25 and 250 ml min⁻¹, respectively. The FAMEs were identified by comparison of their retention times with a standard mixture of FAMEs (Sigma Chemical Co. L9405, Sigma Aldrich, France). Peak area values were integrated with Borwin software and compared to the peak area corresponding to the internal standard. The compositions in each fatty acid were expressed in g per 100 g fatty acids and the total content in fatty acids in μ g per mg sample.

2.2.2. Emulsion preparation and characterization

Emulsions were prepared with tocopherol-free rapeseed oil unless otherwise stated. The day before emulsion preparation, aqueous solutions of emulsifiers (proteins or surfactants) were prepared in the PIPES 10 mM pH 6.7 buffer and gently stirred overnight at 4 °C to dissolve the emulsifiers without foam formation. Aqueous solutions of monolauroyl glycerol (MLG)

or Span 20 were heated at 60 °C for 1 h to improve the dispersion of the surfactants, then stirred overnight at room temperature. Citrem was incorporated in the oil after being dissolved in dichloromethane. The solvent was evaporated under nitrogen flow at 35 °C for 1 h.

Oil-in-water (O/W) emulsions were composed of 15 g of stripped oil and 35 g of aqueous solution. The two phases were premixed for 3 min at 15000 rpm using a rotor-stator homogenizer coupled with a 12-mm diameter head (Heidolph Silent Crusher, Schwabach, Germany). The coarse emulsions were then homogenized with a one-stage low-pressure valve homogenizer (A0812 W-A-CD, Stansted Fluid Power, Stansted, U.K.) for either 5 min at 35 bars (surfactants) or 10 min at 50 bars (proteins) to get similar distributions of droplet sizes.

The size distribution of the oil droplets in the emulsions was determined immediately after homogenization and after 48 h of storage with a laser light scattering instrument (Saturn DigiSizer 5200, Micromeritics, Norcross, USA). Emulsions were diluted 10 times in 1% w/w SDS solution to separate flocculated oil droplets. The refractive index for rapeseed oil was 1.473 (Zhang et al., 2006). The emulsions used to set up the methods of quantification of the emulsifiers in the aqueous phase of emulsions had volume-surface mean diameter $[d_{3,2}]$ comprised between 1.5 and 2 µm and similar droplet size distributions.

The total mean interfacial area (S_I) in a given volume of emulsion was evaluated from the average droplet size and the mass proportion of oil in the emulsions as follows

$$S_{I} = S_{droplet} \times \frac{m_{oil}}{V_{droplet} \times \rho}$$
(1)

where $s_{droplet}$ is the surface of one droplet considering its diameter equal to the measured $[d_{3,2}]$), m_{oil} is the mass of oil in the same volume of emulsion, $V_{droplet}$ is the volume of the droplet (calculated from the $[d_{3,2}]$) and ρ is the density of oil at room temperature ($\rho = 0.92$ for rapeseed oil according to Zhang et al. (2006)).

2.2.3. Separation of aqueous phase from oil droplets

A 12-ml aliquot of emulsion was placed in a 15-ml polypropylene tube for centrifugation. The tube was then centrifuged (Jouan GT 422 centrifuge, Jouan, Inc, Winchester, VA) for 45 min at $3500 \times g$ at 20 °C to separate the aqueous phase containing unadsorbed surfactant molecules from the oil droplets. The aqueous phase was then collected by cautiously boring a hole in the bottom of the centrifugation tube. Aqueous phases were then filtered through cellulose acetate membrane filters from 0.45 down to 0.1 µm (Minisart High-Flow, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) and stored at either 4 °C if measurements could be done within 2 days, or at -80 °C.

2.2.4. Physical characterization of the aqueous phases

Dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) was used in backscattering mode with an angle of 173 degrees. Concerning the dispersed material, namely rapeseed oil, a refractive index of 1.473 and an absorption coefficient of 0.01 were applied. Concerning the dispersant phase, the parameters of pure water at 25 °C were applied (viscosity 0.8872 cP; refractive index 1.330).

2.2.5. Measurement of surfactant concentrations in aqueous solutions

The quantification is based on the direct transesterification in the presence of an internal standard of the fatty chains of the surfactants present in aqueous solutions, followed by detection of the resulting FAMEs by GC. The original transesterification procedure, developed by Christie (1989) for pure lipids, was extended here to aqueous solutions of surfactants. The internal standard was chosen through following criteria: it should contain one fatty chain only, not be present in the measured surfactant and allow obtaining accurate and linear calibration curve in a large range of surfactant concentration. A sample (0.5 ml) of aqueous solution or aqueous phase of emulsion was introduced in a glass test tube and 100 μ l of internal standard solution were added (500 μ g ml⁻¹ in acetone/methanol; 2/1; v/v). The transesterification in the presence of methanol and sulphuric acid and the FAMEs recovering protocol were then identical to the procedure previously described.

The method was first applied to aqueous solutions containing known concentrations of surfactant. The integrated areas of the identified fatty acids ($A_{fatty acid}$) were calculated from the chromatograms and divided by the area of the peak corresponding to the selected internal standard ($A_{internal standard}$). Calibration curves presenting normalized integrated areas for a chosen fatty acid ($A_{fatty acid}$ / $A_{internal standard}$) as a function of surfactant concentration in the aqueous solution were established for each surfactant. Three internal standards were tested for the Tween 20 calibration curves, namely heptadecanoic acid (C17), methyl heptadecanoate (C17-CH₃) and monoheptadecanoyl glycerol (C17-glycerol).

Then, the method was applied to aqueous phases of emulsions, containing unknown amounts of surfactants. The normalized integrated area for the chosen fatty acid ($A_{fatty acid}$ / $A_{internal standard}$) was reported on the calibration curve previously established, which indicated the concentration of unadsorbed surfactant in the aqueous phase.

The amount of residual oil in the filtered aqueous phases was evaluated according to the area of the C18:2 peak, this fatty acid being present only in rapeseed oil. The calculation was performed as follows

$$C_{\text{oil}} = \frac{A_{\text{C18:2}} \times m_{\text{internal standard}}}{A_{\text{internal standard}}} \times \frac{100}{p_{\text{C18:2}}} \times \frac{100}{P} \times \frac{1}{V}$$
(2)

where C_{oil} is the concentration of residual oil in filtered aqueous phases (mg ml⁻¹), $A_{C18:2}$ is the area of the C18:2 peak, $A_{internal standard}$ is the area of the C17:0 peak, $m_{internal standard}$ is the mass of C17:0 (mg), $p_{C18:2}$ is the proportion of C18:2 in rapeseed oil (g per 100 g total fatty acids), P is the mass proportion of fatty acids in rapeseed oil (P = 84.2 g per 100 g as indicated in Table 2) and V is the volume of aqueous phase (ml).

The interfacial area corresponding to these residual droplets in a given volume of filtered aqueous phase was calculated according to equation (1).

2.2.6. Measurement of protein concentration in aqueous solutions

The protein concentration was quantified according to either the method described by Markwell et al. (1978) or by UV-spectrophotometric method. The method of Markwell et al. consists in a modification of the Lowry method for protein determination (Lowry et al., 1951), in which sodium dodecyl sulfate is added in the alkali reagent to allow the method to be used with membranes and lipoproteins without prior solubilisation or lipid extraction. During the coloration of Folin's reagent, the concentration of the PIPES buffer was kept constant. Calibrations curves (concentration range: 0 to 100 μ g ml⁻¹) were performed for the three proteins (BSA, BCN and BLG) at pH 6.7.

The UV-spectrophotometric determination of protein concentration was performed with a UV-visible spectrophotometer (Lambda 12, Perkin-Elmer, Norwalk, USA) coupled with the Lambda 12 software. UV-visible spectra were acquired directly from aqueous phases containing unadsorbed proteins. Calibrations spectra were performed (concentration range: 0 to 1.5 mg.ml⁻¹) for the three proteins. The spectra were acquired between 200 and 600 nm with a scan speed of 240 nm min⁻¹ and a sampling interval of 1 nm. The spectral baseline drift, that was enhanced by the diffusion caused by small oil droplets remaining in the aqueous phases, was subtracted with the PeakFit software (version 4.00; Jandel Scientific, San Rafael, USA) using the quadratic model (Fig. 2). The calibration curves and unadsorbed protein concentrations in unknown samples were then calculated from the absorbance at 278 nm after subtraction of the corrected baseline. Finally, the percentage of unadsorbed proteins was calculated considering the initial protein concentration in the aqueous solution as 100%.



Fig. 2. Calculated baselines (dotted lines) of UV-visible spectra from a solution of BSA 0.5 mg ml⁻¹ (—) or of an aqueous phase of BSA-stabilized emulsion (—).

2.2.7. Catalyzed oxidation

A catalyst constituted of an equimolar mixture of $FeSO_4$ and EDTA was added to the emulsions to obtain a final concentration of 200 μ M. Aliquots (3 ml) of emulsions were distributed in 22.4-ml vials hermetically sealed. The vials were rotated in the dark at 25 °C and at 5 rpm with a test tube rotator (Labinco B. V., Ac Breda, The Nederlands) orientated at 30 degrees versus vertical position.

2.2.8. Experimental design and data treatment

Each measurement was performed at least in duplicate (protein quantification) or triplicate (surfactant determination). Quantification of unadsorbed emulsifiers was performed on at least two emulsions prepared independently. One-way variance analysis (ANOVA) was performed to determine the effect of time of storage on the amount of unadsorbed emulsifiers in O/W emulsions. When a significant effect was found (p < 0.05), a multiple range Newman-Keuls test was performed. Statistical analyses were performed with Statgraphics Plus 5.1 software (StatPoint Technologies, Warrenton, USA) and the significance level was p < 0.05 unless otherwise stated.

3. Results and discussion

3.1. Unadsorbed emulsifiers in emulsions prepared with surfactants

3.1.1. Fatty acid composition of the oil and the surfactants

The fatty acid compositions of surfactants and tocopherol-free rapeseed oil are reported in Table 2. Lauric acid (C12:0) was the only detected fatty acid in monolauroyl glycerol, and was therefore not included in the table.

Table 2

Fatty acid composition of surfactants and tocopherol-free rapeseed oil expressed in g per 100 g identified fatty acids. Main fatty acids are indicated in bold. Total content of fatty acids in the samples are expressed in mg total fatty acids per g sample. Values are means \pm standard deviations of triplicate analysis.

Fatty acids (g/100 g)		Tween 20	Tween 80	Citrem	Span 20	Rapeseed oil
Saturated fatty acids (SFA)	C8:0	5.73 ± 0.13	-	-	5.12 ± 0.17	-
	C10:0	6.45 ± 0.06	-	-	6.19 ± 0.20	-
	C12:0	53.66 ± 0.36	4.01 ± 0.04	-	48.79 ± 1.33	-
	C14:0	19.63 ± 0.42	1.93 ± 0.09	1.18 ± 0.02	19.82 ± 0.44	-
	C16:0	8.33 ± 0.15	5.38 ± 0.11	46.27 ± 0.20	11.73 ± 0.22	4.73 ± 0.10
	C18:0	5.94 ± 0.09	1.52 ± 0.02	50.34 ± 0.31	6.53 ± 0.18	1.42 ± 0.17
	C20:0	-	-	0.27 ± 0.01	-	0.54 ± 0.02
	C22:0	-	-	-	-	0.28 ± 0.04
Mono	C16:1 n-7	-	1.09 ± 0.13	0.29 ± 0.02	-	0.21 ± 0.02
unsaturated	C18:1 n-9	0.27 ± 0.04	80.91 ± 0.14	1.22 ± 0.34	1.22 ± 0.11	61.85 ± 0.60
fatty acids	C20:1 n-9	-	5.17 ± 0.12	-	-	1.25 ± 0.10
(MUFA)	C22:1 n-9	-	-	-	-	0.34 ± 0.02
Poly unsaturated	C18:2 n-6	-	-	-	0.19 ± 0.03	19.73 ± 0.21
fatty acids (PUFA)	C18:3 n-3	-	-	-	-	9.22 ± 0.42
Fatty acid content (mg total fatty acids per g sample)		99.3 ± 2.6	99.3 ± 2.0	679.1 ± 6.7	403.3 ± 45.0	842.0±1.9

Rapeseed oil does not contain fatty acids shorter than C16:0 and is constituted mainly of C18:1 which represents more than 60% of its total fatty acids. Except for monolauroyl glycerol, hydrophobic parts of surfactants are constituted of mixes of fatty acid chains with various lengths. Each surfactant can be characterized by its main fatty chain, for example C12:0 for Tween 20 or C18:1 for Tween 80. These main fatty acids were generally chosen for
surfactant quantification in aqueous solutions. Since C18:1 is the main fatty acid of both Tween 80 and rapeseed oil, the quantification of Tween 80 in the aqueous phase of emulsion according to the area of the C18:1 peak could be disturbed. Two solutions were tested to avoid this bias. On the one hand, the calculation of the amount of Tween 80 in aqueous phase was performed according to the area of the C12:0 peak, which represents about 4% of its total fatty acids. On the other hand, the area of the C18:1 peak corresponding to rapeseed oil was deduced from the area of the C18:2 peak, this fatty acid being present only in rapeseed oil. The area of the C18:1 peak corresponding to Tween 80 could then be deduced, which enabled to calculate the amount of Tween 80 in the aqueous phase. Similar results were obtained by the two calculation ways. However, when possible, it is easier to use the peaks below C16 to perform the quantification to avoid contribution from residual oil traces. The chosen internal standards contained only the fatty acid C17:0 which is lacking from all surfactants and rapeseed oil.

3.1.2. Characteristics of the aqueous phase obtained after centrifugation

Emulsions were prepared with Tween 20, Tween 80, Citrem or mixtures of surfactants. The aqueous phases recovered after single centrifugation were generally cloudy. The analysis by dynamic light scattering indicated the presence of small particles with an average diameter of around 180 nm with a distribution from 90 to 300 nm. These particles corresponded to small oil droplets that did not cream during centrifugation. These small droplets being covered by adsorbed emulsifier, they had to be eliminated to perform an accurate determination of unadsorbed surfactant. These small droplets were removed by filtering the aqueous phases through a sequential filtration from 0.45-µm to 0.1-µm cellulose acetate membrane filter, as previously described. After filtration, the aqueous phase was clear and the signal of dynamic light scattering was strongly decreased (around 140 times) but the presence of very small amounts of small droplets (diameter around 180 nm) was generally still detected. In the filtered aqueous phase of the Citrem-stabilized emulsion, no particle was detected. These few residual droplets may result either from the unequal size of the diameter pores of the filter, which allowed some few droplets not to be retained by the filter, or from the coalescence of smaller oil droplets after filtration. As no peak around 10-13 nm (size of Tween 20 or Tween 80 micelles) was detected by dynamic light scattering, we assume that the aqueous phases did not contain micelles but small oil droplets in accordance with the low amount of oil detected by GC.

Depending on the emulsions, the concentration of residual oil in filtered aqueous phases was between 0.250 and 0.450 mg ml⁻¹ as determined from GC. This amount was very low in comparison to the initial proportion of oil in the emulsions, which corresponded approximately to 300 mg ml⁻¹. However, these droplets being very small, they could represent a sizeable interfacial area. Considering an average concentration of residual oil of 0.300 mg ml⁻¹ and an average residual droplet size of 180 nm, the corresponding interfacial area in 1 ml of aqueous phase is 1.09×10^{-2} mm². In comparison, the interfacial area in 1 ml of an emulsion with 1.7 µm-average diameter droplets is 1.15 mm². Residual droplets represented therefore about 0.1% of the initial oil mass but nearly 1% of the initial interfacial area.

After filtration, the solutions were ready for the quantification step by the transesterification procedure.

3.1.3. Choice of the internal standard

Heptadecanoic acid is often used as internal standard for the determination of fatty acid content of natural fats and oils. As methylation of the free fatty acid may have a different yield than that of transmethylation of esterified fatty acids, especially in the presence of water, we tested two other internal standards: methyl heptadecanoate and monoheptadecanoyl glycerol. Methylation was applied to a range of known concentrations of Tween 20 in aqueous solutions (from 0.2 to 5 mg ml⁻¹). The normalized integrated area of the main peak of Tween 20, namely C12:0, varied linearly as a function of Tween 20 concentration, whatever the tested standard (Fig. 3). Similar results were obtained with the other fatty acids of Tween 20 (results not shown).



Fig. 3. Normalized area of the C12 peak (A_{C12}/A_{C17}) *versus* the concentration of Tween 20 for three standards: ($-\Diamond$ -) heptadecanoic acid, ($-\Box$ -) methyl heptadecanoate and ($-\blacktriangle$ -) monoheptadecanoyl glycerol. The correlation coefficients (R^2) were 0.9998; 0.9999; and 0.9998, respectively. Each point is the mean of triplicate determinations and error bars represent standard deviation.

The three standards appeared adequate for the quantification of Tween 20 in aqueous solutions. However, the slope was slightly higher with monoheptadecanoyl glycerol. As its structure is the most similar to this of the compounds studied here, we chose to use monoheptadecanoyl glycerol in the following. Calibration curves were established for aqueous solutions of the other surfactants, namely Tween 80, Span 20, Citrem and monolauroyl glycerol. Concentration ranges were 0.2 to 5 mg ml⁻¹; 0.1 to 2 mg ml⁻¹; 0.01 to 0.5 mg ml⁻¹ and 0.01 to 0.5 mg ml⁻¹, respectively. The normalized integrated area of the peaks corresponding to each surfactant fatty acids varied linearly as a function of surfactant concentrations.

3.1.4. Quantification of unadsorbed surfactants in oil-in-water emulsions

Unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase of freshly prepared oil-in-water emulsions were quantified according to the above described protocol and the established calibration curves. The results are reported in Table 3.

Table 3

Proportions of surfactants in the aqueous phase of freshly prepared emulsions (t = 0). Data represent the average and standard deviation of 3 measurements for at least 2 emulsions prepared independently.

Surfactants	Concentration in emulsion		Concentratio	Proportion of surfactant in	
	g l ⁻¹	mol l ⁻¹	g l ⁻¹	mol l ⁻¹	aqueous phase (%)
Tween 20	3.50	2.85×10^{-3}	0.47 ± 0.09	$0.383 \pm 0.073 \times 10^{\text{-3}}$	9.5
Tween 80	3.50	2.67×10^{-3}	1.68 ± 0.14	$1.28 \pm 0.11 \times 10^{-3}$	33.6
Citrem	4.20	7.91×10^{-3}	0.012 ± 0.004	$0.023 \pm 0.008 \times 10^{\text{-3}}$	0.20
Tween 20/	1.75	1.43×10^{-3}	0.39 ± 0.03	$0.317 \pm 0.024 \times 10^{\text{-3}}$	15.6
Tween 80	1.75	1.34×10^{-3}	0.20 ± 0.04	$0.153 \pm 0.031 \times 10^{-3}$	8.0
Tween 20/	3.20	2.61×10^{-3}	0.48 ± 0.03	$0.391 \pm 0.024 \times 10^{\text{-3}}$	10.5
MLG	0.27	0.984×10^{-3}	0.010 ± 0.002	$0.036 \pm 0.007 \times 10^{\text{-3}}$	2.5
Tween 20/	3.20	2.61×10^{-3}	-	-	-
Span 20	0.34	0.981×10^{-3}	-	-	-

Emulsions stabilized by single surfactant. Emulsions stabilized with single surfactants contained small proportions of excess surfactants in aqueous phase (Table 3). Citrem was almost lacking in the aqueous phase, which could be explained by its low water solubility and its initial solubilisation in oil. Tween 20 proportion in aqueous phase was below 10% at the concentration used (3.5 g l^{-1} of emulsion). The highest value of unadsorbed surfactants was observed for the Tween 80-stabilized emulsion with 35% in the aqueous phase.

Emulsions stabilized by mixtures of surfactants. The calculated proportion of Tween 20 and Tween 80 in the aqueous phase was identical, whatever the fatty acid chosen to perform the calculation (data not shown). There was thus no difference in transesterification behaviour according to the fatty acid chain length in the surfactant. As a consequence, it is possible to determine the proportion of each surfactant in mixtures if at least one fatty acid differs from one surfactant to the other. For example, in the Tween 20/Tween 80 mixture (1/1; w/w), C18:1 peak area allowed to quantify Tween 80, after subtraction of the contribution of residual rapeseed oil to this peak. This result allowed in turn to calculate and subtract the contribution of Tween 80 to C12:0 peak area that was used to determine the Tween 20 concentration in the aqueous phase. In the same way, for the Tween 20/monolauroyl glycerol mixture (11.9/1; w/w), the C14:0 peak area allowed to quantify Tween 20, then Tween 20

contribution to C12:0 peak area was calculated and subtracted to calculate monolauroyl glycerol concentration, which contained only C12:0. The results are presented in Table 3.

The freshly prepared emulsion stabilized with a Tween 20/Tween 80 mixture (1/1; w/w) contained low proportions of unadsorbed Tween 20 (around 15%) and Tween 80 (around 8%). The proportion of unadsorbed Tween 80 was lower than this of Tween 20, which is in agreement with the lower hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of Tween 80 (Table 1) and therefore its less hydrophilic properties. The concentrations of Tween 20 and Tween 80 in the aqueous phase were 0.32 and 0.15 mM, respectively. These concentrations are higher than the critical micellar concentrations (CMC) of each compound (Table 1). The presence of micelles in the aqueous phase could therefore be expected. As mentioned before, no peak around 10-13 nm (expected size of Tween 20 or Tween 80 micelles) was detected in the aqueous phase by dynamic light scattering. This analysis highlighted only the presence of small droplets around 180 nm, which was confirmed by the detection of small amounts of residual oil by GC. It can be speculated either that the detection of micelles by dynamic light scattering was hidden by the residual oil droplets, or that the aqueous phase contained actually no substantial amount of surfactant micelles. Then, it can be hypothesized that aqueous phases of emulsions correspond rather to very diluted O/W microemulsions, with a possible equilibrium between surfactants stabilizing small droplets, surfactant micelles and surfactant monomers. The emulsion stabilized with a Tween 20/monolauroyl glycerol mixture (11.9/1; w/w) contained low proportions of unadsorbed Tween 20 (around 11%) and unadsorbed monolauroyl glycerol (around 2.5%).

In the case of mixtures of surfactants containing the same fatty chains but in different proportions (Span 20/Tween 20 for example), one can assume that the fatty acid distribution at the interface for each surfactant was not modified by the presence of the other. It should be thus possible to deduce the proportion of each compound using the responses given by C12 and C14 peak areas and their ratios, these fatty acids being the two main fatty acids of both Tween 20 and Span 20. However, for this particular mixture, the differences in fatty acid compositions were not substantial enough to distinguish one contribution from another (Table 2). The transesterification method is thus not applicable to distinguish and quantify mixes of surfactants with similar fatty acid compositions.

3.2. Unadsorbed emulsifiers in emulsions prepared with proteins

The aqueous phases recovered after phase separation of protein-stabilized emulsions were turbid as those coming from surfactant-stabilized emulsions. The analysis by dynamic light scattering also showed the presence in the aqueous phase of oil droplets of small diameter (around 150 nm with a distribution from around 100 to 200 nm). These droplets were removed by sequential filtrations through cellulose acetate membrane filters from 0.45 down to 0.1 μ m. The filtered aqueous phase was clear and the signal obtained by dynamic light scattering was around 120 times reduced. Unadsorbed proteins in freshly prepared emulsions were quantified according to the Markwell's method and with UV detection at 278 nm (Table 4).

Table 4

Proportions of unadsorbed proteins in the aqueous phase of emulsions with an equivalent size of droplets. Data represent the mean and standard deviation of 2 to 8 measurements for 2 to 4 emulsions prepared independently. Concentrations of proteins were determined according to (a) Markwell's method or (b) spectroscopic UV method.

Protein	Concentration in the emulsion	Concentra aqueous pl	tion in the hase $(g l^{-1})$	Proportion of proteins in the aqueous phase (%)		
	$(g l^{-1})$	а	b	а	b	
BLG	3.5	1.52 ± 0.09	1.64 ± 0.05	30.4	32.8	
BCN	3.5	0.45 ± 0.12	0.23 ± 0.04	9.0	4.6	
BSA	2.8	1.17 ± 0.11	1.09 ± 0.06	29.3	27.3	

The amounts of proteins in the aqueous phases of freshly prepared emulsions were calculated from the data obtained with the two methods. They were very similar for the BSA- and BLGstabilized emulsions. In contrast, the aqueous concentration of BCN in aqueous phase measured with the Markwell's method was significantly (p < 0.05) higher than that determined by the spectroscopic UV method. This difference can be explained by several factors. First, among the three studied proteins, BCN possesses the lowest molar extinction coefficient (UniProt protein knowledgebase). The spectrophotometric signal of this protein was therefore small compared to the diffusion signal caused by residual oil droplets. Since the corresponding standard deviation was low, it could be assumed that spectroscopic UV method was reproducible but not accurate in comparison to Markwell's method. The modification of the spectra baseline induced by the residual small droplets was particularly considerable in the case of the BCN-stabilized emulsions, even if the preliminary filtration of the aqueous phase enabled to eliminate a large proportion of such residual droplets. Markwell's method is therefore more adequate to measure unadsorbed proteins in aqueous phases of emulsions.

Spectrometric UV method and Markwell's method do not enable to distinguish different proteins in an aqueous phase. However, Hunt & Dalgleish described a method employing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and photometric densitometry to determine protein concentration in the creamed phase of O/W emulsions stabilized with mixtures of proteins (Hunt & Dalgleish, 1994). This technique could be applied to aqueous phases of such emulsions to evaluate the concentration of each protein.

The total or partial replacement of interfacial proteins by surfactants in O/W emulsions is a well-known phenomenon (Courthaudon et al., 1991b; Courthaudon et al., 1991c; Dalgleish et al., 1995; Dickinson, 1991; Dickinson et al., 1999). It is therefore interesting to quantify the amount of unadsorbed emulsifiers in emulsions stabilized with mixtures of proteins and surfactants. Tested non-ionic surfactants (Tween 20 and Tween 80) do not absorb between 200 and 600 nm and are not assumed to interfere with the Folin-Ciocalteu reagent (Everette et al., 2010). We checked first that the presence of Tween 20 in aqueous solution did not disturb protein (SAB, BLG or BCN) quantification by Markwell's method, and second that the presence of proteins (SAB, BLG or BCN) in aqueous solution did not disturb the transesterification reaction of Tween 20 fatty acids and the GC analysis of the resulting FAMEs. For this purpose, we prepared Tween 20/proteins solutions of known concentrations and we measured by the above described methods the concentrations of Tween 20 and proteins (Table 5). The measured concentrations were very close to the expected concentrations, for both the surfactant and the proteins, except for BSA whom measured concentration in the presence of Tween 20 was overestimated by 15% compared to the expected value. Thus, in such mixtures, the transesterification method can be applied to quantify surfactants in an aqueous phase of emulsion containing proteins without any interference. In the same way, proteins could be quantified by UV spectrometric or Markwell's method. We recommend users to check for the effect of the surfactant on the protein determination by Markwell's method.

Table 5

Expected and measured concentrations of proteins and Tween 20 in solutions containing Tween 20/protein mixtures. Data of measured concentrations represent the mean and standard deviation of triplicate analysis.

	Prot	eins	Tween 20		
Protein	Expected concentration (g l ⁻	Measured concentration by Markwell's method (g l ⁻¹)	Expected concentration (g l ⁻	Measured concentration by transesterification method (g l ⁻¹)	
BLG	$2.53 \pm 0.01*$	2.62 ± 0.07	$2.50\pm0.01*$	2.54 ± 0.04	
BCN	$2.51 \pm 0.01*$	2.55 ± 0.08	$2.50\pm0.01*$	2.54 ± 0.04	
BSA	$2.02 \pm 0.01*$	2.31 ± 0.03	$2.50\pm0.01*$	2.54 ± 0.05	

* The error on the expected concentrations (ΔC) has been calculated as follows: $\Delta C = C \times ((\Delta m / m) + (\Delta V / V))$, where C is the expected concentration, Δm is the inaccuracy of the balance, m is the weighted mass of pure emulsifier, ΔV is the inaccuracy of volumetric flasks and V is the volume of prepared solution.

3.3. Application to the formulation of emulsions with optimized droplet size and protein concentration

The knowledge of the concentration of unadsorbed emulsifier is an useful parameter to optimize the amount of emulsifier required to stabilize an emulsion. The mean size $[d_{3,2}]$ of the droplets formed in emulsions stabilized by different concentrations of BLG- in similar process conditions are presented in Fig. 4. The mean droplet size decreased sharply from around 2.9 to 1.7 µm when the BLG concentration in emulsion increased from 1.4 to 3.5 g l⁻¹. It was then kept almost constant for higher concentrations. On the same time, the amount of unadsorbed proteins present in the aqueous phase increased sharply. The plot allowed to define the concentration range where the amount of BLG in the aqueous phase remained low in comparison to the adsorbed concentration. From this point of view, the concentrations between 1.4 and 2.8 g l⁻¹ were interesting. Below BLG concentrations of 1.4 g l⁻¹, emulsions were not stable since oil and aqueous phases separated rapidly after emulsion homogenization.



Fig. 4. Droplet size $[d_{3,2}]$ for fresh rapeseed O/W emulsions prepared with several concentrations in BLG (-- \diamond --) and unadsorbed amounts of protein determined according to Markwell's method ($-\Box$ -). Error bars correspond to standard deviations of triplicate determinations, some of them being within data points.

3.4. Determination of unadsorbed emulsifier concentrations in oxidized media

We studied how the incubation of emulsions in oxidative conditions could affect both the concentrations of emulsifiers at the interface and the adequacy of the previously described methods. Incubation of emulsions was performed in conditions of oxidation catalyzed by a mixture of iron and EDTA in an equimolar ratio. The amount of unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase of emulsions was quantified after 48 h of incubation at 25 °C in agitated conditions. In the case of surfactant-stabilized emulsions, the method of transesterification in the aqueous phase applied in oxidative conditions as the surfactants did not contain polyunsaturated chains. There was therefore low risk of loss of a certain amount of surfactant fatty acids due to lipid oxidation, since this phenomenon concerns mainly polyunsaturated fatty acids.

Tween 80 proportion in aqueous phase did not change significantly along the incubation period (p > 0.05) (Fig. 5). Tween 20 and Citrem proportions in aqueous phases increased significantly (p < 0.05) after 48h of incubation in the previously described conditions. However, the corresponding proportions of surfactants in aqueous phase remained low (less than 15% for Tween 20 and less than 1% for Citrem). This increase could be due to desorption of surfactant molecules from the oil droplet surface during incubation.

In the emulsion stabilized with a Tween 20/Tween 80 mixture (1/1; w/w), the proportion of unadsorbed Tween 20 did not change significantly along the incubation period (p > 0.05). In contrast, the proportion of unadsorbed Tween 80 increased significantly (p < 0.05) during incubation to reach a final value of around 34%. The emulsion stabilized with a Tween 20/monolauroyl glycerol mixture (11.9/1; w/w) contained as well a low proportion of unadsorbed Tween 20, which did not change significantly along the incubation period (p > 0.05). The proportion of unadsorbed monolauroyl glycerol increased significantly (p < 0.05) during incubation to reach a final value of around 6%. In both emulsions, no desorption of Tween 20 occurred, whereas a small amount of the second emulsifier (Tween 80 or monolauroyl glycerol, respectively) was removed from the interface of oil droplets to the aqueous phase. However, this possible desorption phenomenon remained limited and this slight increase for some emulsions did not seem to be due to coalescence as the droplet size did not increase with time.



Fig. 5. Proportions of surfactants in the aqueous phase of freshly prepared emulsions or after 48 h of incubation in oxidative conditions. Data represent the average of 3 measurements for at least 2 emulsions prepared independently. Errors bars correspond to standard deviations.

In the case of protein-stabilized emulsions, Markwell's and UV methods were not equivalent to measure unadsorbed proteins in oxidizing conditions. After 48 h of incubation, the amount of unadsorbed proteins could not be determined by the spectrometric UV method: the aqueous phase of the emulsion was yellow and the initial protein peak centered at 278 nm shifted

towards lower wavelengths even after subtraction of the spectra of an oxidized mixture containing only buffer, catalyst and rapeseed oil. The shift of the wavelength indicates protein modifications targeting aromatic amino acid residues (tyrosine, tryptophan), rendering the spectroscopic method not adequate. For the Markwell's method, the reaction was not affected neither by the oxidized products nor by the catalyst.

Emulsions stabilized with proteins were incubated either in oxidative or non oxidative conditions. In the latter case, emulsions were prepared with rapeseed oil stripped with silica instead of alumina, not to eliminate tocopherols. Additionally, no oxidation catalyst was added in the emulsions.

BLG and BSA proportions in aqueous phase did not change significantly along the incubation period (p > 0.05), for both tested conditions (Fig. 6). BCN proportion in aqueous phase increased significantly (p < 0.05) from less than 10% to almost 20% after 48 h in both incubation conditions. This protein may partly be desorbed along the incubation period, even if the final concentration of unadsorbed BCN still represented a minor part of the initial amount of BCN in the emulsion. The increase of the amount of unadsorbed BCN during incubation was therefore clearly not related to an oxidative damage of the protein or a competitive displacement of BCN by surface-active oxidized lipids. The more disordered interfacial conformation of BCN and its ability to form multilayers at the interface (Dickinson, 2001) could rather be involved in the observed desorption.



Fig. 6. Proportions of unadsorbed proteins in the aqueous phase of freshly prepared emulsions or after 48 h of incubation in non oxidative or oxidative conditions. Aqueous concentrations of proteins were determined according to Markwell's method. Data represent the mean of 2 to 6 measurements for 2 to 3 emulsions prepared independently. Errors bars correspond to standard deviations.

4. Conclusion

We developed a simple methodology allowing the quantification of unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase of O/W emulsions during their aging whatever the underlying destabilization phenomena : physical aging (coalescence) or chemical aging (lipid oxidation). Numerous surfactants used in food science are esterified forms of fatty acids. The developed methodology here applies well in this area. In the case of surfactant-stabilized emulsions, an innovative protocol was designed, whose relevance was checked for different surfactants in aqueous solutions. In the case of protein-stabilized emulsions, two quantification methods were tested and compared. Fig. 7 summarizes the methodology to apply depending on the type of emulsifier and the state of aging of the emulsion.



Fig. 7. Summary scheme of the appropriate methodologies to quantify unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase of O/W emulsions.

Acknowledgements

The financing of this work by INRA and Région Pays de la Loire is gratefully acknowledged. We also thank Michèle Viau, Lucie Ribourg, Valérie Beaumal and Elisabeth David-Briand for skilful laboratory work.

2. Oxydation d'émulsions stabilisées par des protéines ou des tensioactifs

2.2. Etude en présence de fer chélaté de la stabilité oxydative d'émulsions stabilisées par des tensioactifs ou des protéines

2.2.1. Contribution de la couche interfaciale à la protection des lipides émulsionnés contre l'oxydation (Article 2)

Contribution of the Interfacial Layer to the Protection of Emulsified Lipids against Oxidation

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 5052-5061

Claire Berton, Marie-Hélène Ropers, Michèle Viau and Claude Genot*

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes, France

ABSTRACT

The oxidative stability of oil-in-water (O/W) emulsions is highly dependant on the type of emulsifier. The purpose of this work was to investigate the specific role of the adsorbed emulsifiers on lipid oxidation of O/W emulsions. Emulsions of similar droplet size distribution and stabilized by minimum amounts of proteins or surfactants were oxidized at 25 °C in the presence of equimolar iron-EDTA complex. The pH and the amount of emulsifier in the aqueous phase were also varied to investigate the role of the droplet charge and the emulsifier in the aqueous phase. Oxygen uptake, conjugated dienes (CD) and volatile compound formation demonstrated that the protein-stabilized interfaces are less efficient to protect emulsified lipids against oxidation than surfactant-stabilized interfaces. The antioxidant effect of unadsorbed proteins was also confirmed.

KEYWORDS

Lipid oxidation; Oil-in-water emulsions; Interface; Emulsifiers; Proteins; Surfactants; Kinetic model.

INTRODUCTION

Oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is a major cause of deterioration of food quality. It is therefore of importance to have a deep understanding of the formulation factors that influence lipid oxidation kinetics in complex food matrices.

In food products, lipids are often dispersed in an aqueous phase, which affects their oxidative stability (Coupland & McClements, 1996; Genot et al., 2003; Jacobsen, 2010a; McClements & Decker, 2000; Waraho et al., 2011b). It is generally admitted that the interfacial region, which is the contact region between the oil phase and the aqueous phase, represents a critical area in the system. Surface-active compounds (emulsifiers, oxidation products, amphiphilic antioxidants, etc.) that adsorb at the oil-water interface influence lipid oxidation (Genot et al., 2003; McClements & Decker, 2000; Waraho et al., 2011b).

The charge of emulsifiers is currently considered as one of the main factors in the oxidative stability of emulsions because it governs attractive or repulsive forces between metal ions and interfaces. Accordingly, emulsions stabilized with positively charged surfactants were found more oxidatively stable than emulsions stabilized with negatively charged surfactants (Mancuso et al., 1999b; Mei et al., 1998b). However, the charge effect in protein-stabilized emulsions remains still controversial. Protein-stabilized emulsions were more oxidatively stable at low pHs where proteins are positively charged than at higher pHs in several studies (Faraji et al., 2004; Hu et al., 2003a; Mancuso et al., 1999b; Osborn-Barnes & Akoh, 2003) while the reverse effect or no relationships were noticed in other studies (Haahr & Jacobsen, 2008; Mei et al., 1998b; Sorensen et al., 2008; Villière & Genot, 2006).

As compared to surfactants, proteins have been generally found to protect better the oil phase against oxidation (Fomuso et al., 2002a; Haahr & Jacobsen, 2008; Kiokias et al., 2006; Osborn & Akoh, 2004). This was attributed to both their chelating and free radical scavenging properties as well as their ability to form thick layers at the interface (Diaz et al., 2003; Elias et al., 2005; Faraji et al., 2004; Hu et al., 2003a; Hu et al., 2003b; Rival et al., 2001; Waraho et al., 2011b). However, considering the amount of emulsifier and the oil droplet surface that has to be covered by the emulsifier in the different studies, it should be concluded that they have been carried out in the presence of large excess of emulsifier, an important proportion of which being unadsorbed. Indeed, unadsorbed protein or surfactant emulsifiers can affect the oxidative stability of emulsions by interacting with metal ions or by scavenging free-radicals in the aqueous phase (Elias et al., 2005; Faraji et al., 2004; Ries et al., 2010; Sun & Gunasekaran, 2009). In these experimental conditions, the measured effects of the emulsifiers on lipid oxidation resulted from a combined effect of both adsorbed and

unadsorbed emulsifiers. Therefore one should conclude that the effect of the interfacial layer on lipid oxidation in emulsions has not been clearly elucidated yet.

The aim of this study was to investigate the role of the composition of the interfacial layer on lipid oxidation in emulsions. For this purpose, we used optimized emulsions in which the amounts of emulsifiers were minimized to get physically stable emulsions with concentrations of unadsorbed emulsifiers as low as possible (Berton et al., 2011a). Chosen emulsifiers included proteins of different structures and interfacial conformations: bovine serum albumin (BSA), β -casein (BCN) and β -lactoglobulin (BLG), and both non-ionic and anionic surfactants: Tween 20, Tween 80 and Citrem. The pH was varied for some emulsifiers above and under the isoelectric point of the proteins to investigate the effects of pH and protein charge. Lipid oxidation was measured by methods allowing a characterization of the different stages of the reaction: oxygen (O₂) consumption, formation of conjugated dienes (CD) and formation of selected volatile compounds.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Rapeseed oil was purchased in a local supermarket. It was stripped by means of alumina (MP Alumina N-Super I, MP Biomedicals, France) to eliminate impurities and tocopherols (Berton et al., 2011a). Stripped oil contained less than 2 µg residual tocopherols per g oil. Medium chain triglycerides (MiglyolTM) were obtained from International Flavors and Fragrances (Dijon, France). BSA (fraction V, minimum 96% by agarose gel electrophoresis) was obtained from MP Biomedicals (France). BCN (purity \geq 98%) was purchased from Lactalis (France). β -lactoglobulin (BLG) has been purified at the laboratory from Prolacta 90 (Lactalis) by selective precipitation (Mailliart & Ribadeau-Dumas, 1988). The absence of contaminants was checked by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis, gel filtration and reverse phase high-performance liquid chromatography. Tween 20 (Sigma Ultra grade, average $Mw = 1228 \text{ g mol}^{-1}$), Tween 80 (Sigma Ultra grade, average $Mw = 1310 \text{ g mol}^{-1}$), 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES), sodium carbonate (Na₂CO₃), potassium sodium tartrate (C₄H₄KNaO₆, 4H₂O), copper(II) sulfate (CuSO₄), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, ethylene diamine tetraacetic acid disodium calcium salt (EDTA), iron(II) sulfate (FeSO₄), propanal, hexanal, 2-octenal, 1-octen-3-ol and 2,4-decadienal were purchased from Sigma Aldrich (France). A standard mixture of fatty acid methyl esters (FAME) (Sigma Aldrich, France) was used for the identification of fatty acids. Citric acid

ester of fatty acids (Citrem) was obtained from Danisco (Grindsted, Denmark). NaCl and SDS were purchased from Fluka Chemika (France). Monoheptadecanoyl glycerol (purity \geq 99.0%, Mw = 344.48 g mol⁻¹) was purchased from Nu-Chek-Prep (Elysian, MN). Sodium hydroxide (NaOH) was purchased from Merck (France). Sulphuric acid, orthophosphoric acid of analytical grade, acetone, methanol, hexane, pentane and isopropanol of HPLC grade were purchased from Carlo Erba (France). The neutral buffer was composed of PIPES (10 mM), NaCl (80 mM) and adjusted at pH 6.7. The acidic buffer was composed of orthophosphoric acid (10 mM), NaCl (80 mM) and adjusted at pH 3.0.

Preparation and physical characterization of O/W emulsions. The day before emulsion preparation, water soluble emulsifiers (proteins or surfactants) were dispersed in the adequate buffer (pH 6.7 or 3.0) and gently stirred overnight at 4 °C to ensure their complete solubilization without foam formation. Citrem, which was not soluble in water, was incorporated in the oil after being dissolved in dichloromethane. The solvent (70 μ l g⁻¹ oil) was evaporated under nitrogen flow at 35 °C for 1 h. The absence of traces of solvent was checked by solid-phase microextraction (SPME) coupled with gas chromatography (GC) with the parameters detailed below.

O/W emulsions were prepared with 30 g oil and 70 g aqueous solution per 100 g emulsion. The two phases were premixed for 2 min at 15000 rpm using a rotor-stator homogenizer fitted with a 12-mm diameter head (Polytron PT 3000, Kinematica, Littau, Switzerland). The coarse emulsions were then homogenized through a one-stage low-pressure valve homogenizer (A0812W-A-CD, Stansted Fluid Power, Stansted, UK). The size distribution of oil droplets in the emulsions was measured immediately after homogenization with a laser light scattering instrument (Saturn 5200, Micromeritics, Verneuil en Halatte, France). It was daily checked to monitor emulsion stability and reported as volume-surface mean diameter ($[d_{3,2}]$). The emulsifier concentration, pressure and time of emulsification were adjusted to produce stable emulsions with concentrations of unadsorbed emulsifiers as low as possible but a similar narrow droplet size distribution and average droplet size ([d_{3.2}] comprised between 1.4 and 2.2 μ m). Concentrations of emulsifiers in aqueous solutions were 4 g l⁻¹ for BSA and 5 g l⁻¹ for BCN, BLG, Tween 20 and Tween 80 (Table 1). Concentration of Citrem in oil was 12.9 g l⁻¹, which was equivalent to 6 g Γ^1 of aqueous solution. Non-ionic surfactant-stabilized emulsions were homogenized for 5 min at 35 bar while Citrem- and protein-stabilized emulsions were homogenized for 10 min at 50 bar.

Emulsions with excess emulsifier (BLG, BCN or Tween 20) in the aqueous phase were prepared according to the following procedure: 30 g oil and 60 g aqueous solution were homogenized as previously described. The aqueous solutions contained 5.83 g 1^{-1} emulsifier. After homogenization, 10 g of an emulsifier solution (35 g 1^{-1} , BLG, BCN, or Tween 20, respectively) were added to the emulsions to obtain a final proportion of 30 g oil per 100 g emulsion. The addition of excess of emulsifier *post* emulsification avoided the formation of very small oil droplets during the homogenization stage.

Emulsion droplet charge was evaluated by the measurement of Zeta potential (ξ , mV) with a dynamic light scattering instrument (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Emulsions were diluted 1000 times in salt-free buffers (pH 6.7 or 3.0) before measurements. The Smoluchowski model was applied. The refractive index of rapeseed oil was 1.473 with an absorption coefficient of 0.01. The parameters of the dispersant phase were those of water (viscosity 0.8872 cP at 25 °C, refractive index 1.330, dielectric constant 78.5).

The concentrations of unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase at t_0 and after 48 hours of incubation were measured as previously described (Berton et al., 2011a). Briefly, aliquots of emulsions were centrifuged to separate the aqueous phase from the oil droplets. The aqueous phase was collected and filtered through cellulose acetate 0.45, 0.20 and 0.10 µm-filters (Minisart High-Flow, Sartorius, Germany) to remove the small oil droplets. The amount of unadsorbed proteins was determined according to the method described by Markwell (Markwell et al., 1978). The amount of unadsorbed surfactants was determined by direct transesterification of the fatty acids of the surfactant molecules followed by GC analysis in the presence of monoheptadecanoyl glycerol.

Incubation of O/W emulsions. The catalyst consisted of an equimolar mixture of FeSO₄ and EDTA. Solutions of FeSO₄ and EDTA (12 mM) were prepared separately in ultrapure water. Equivalent volumes of each solution were mixed and the iron-EDTA complex was allowed to form under moderate magnetic stirring for at least 1 h. The mixture was then added to the emulsions to obtain a final concentration of 200 μ M of each compound. Aliquots (3 ml) of emulsions were distributed in 20.5-ml headspace vials sealed with Teflon/silicon septa and aluminum crimp caps. The vials were rotated in the dark at 25 °C, and 5 rpm for 48 h to 78 h, with a test tube rotator oriented at 30 degrees versus vertical position.

Measurements of lipid oxidation. Oxygen uptake. Oxygen uptake was determined as described by Villiere et al. (2005). A sample (100 μ l) of headspace was injected with a

gastight syringe into the injector (split rate 30 ml min⁻¹, injector temperature 50 °C) connected to a fused silica plot column (Molsieve 5A CP7535, length 10 m, internal diameter 0.32 mm, Varian, Les Ulis, France). GC analysis was performed with a HP 5890 series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Böblingen, Germany) coupled to a thermal conductivity detector (TCD) in isothermal mode at 50 °C. TCD temperature was 125 °C. Helium was used as carrier gas with a flow of 2 ml min⁻¹. Peaks corresponding to oxygen were integrated with Borwin software (JMBS Développements, Fontaine, France) and normalized in comparison to peak area of ambient air. The amount of residual oxygen in the headspace of the vials was calculated from the theoretical proportion of oxygen in air and the volume of headspace in the vials. Results were expressed in millimoles of consumed oxygen per kg oil (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ oil).

Conjugated dienes. The formation of CD, which are primary oxidation products, was determined according to the method described by Lethuaut et al. (2002). Aliquots of emulsions were diluted in isopropanol. The following solutions were centrifuged and the absorbance of the supernatants was measured at 233 nm with a UV-visible spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 12, Norwalk, CT, USA). Reference cell contained isopropanol and buffer in the same proportions as in the final dilution of the samples. Results were expressed in millimoles of equivalent hydroperoxides per kg oil (mmol eq HP kg⁻¹ oil) with 27000 M⁻¹ cm⁻¹ as the molar extinction coefficient of CD at 233 nm.

Volatile compounds. The formation of secondary oxidation products was evaluated by the quantification of two volatile compounds, namely propanal and hexanal, in the headspace of the samples. These compounds were analyzed by GC paired with a flame ionization detector (FID) after their adsorption on a SPME fiber. The fiber (75 μ m CarboxenTM – polydimethylsiloxane, Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed in the headspace of the vials for 15 min at 25 °C. The fiber was then transferred into the injector (temperature 250 °C, equipped with a liner of 0.75 mm internal diameter) of a HP 5890 series II gas chromatograph. The purge of the injector was closed for the first 5 min to ensure the complete desorption of the volatile compounds and then opened for the following 15 min with a hydrogen split flow of 30 ml min⁻¹. Volatile compounds were separated on a ZB-624 fused silica capillary column (length 30 m, internal diameter 0.32 mm, film thickness 1.80 μ m, J&W Scientific, Chromoptic, Auxerre, France). Hydrogen was used as carrier gas with a flow of 2 ml min⁻¹. The temperature program was as follows: 3 min at 40 °C, heating 10 °C min⁻¹ until 210 °C, heating 20 °C min⁻¹ until 260 °C, 4 min at 260 °C (26.5 min total). The FID temperature was set at 250 °C with hydrogen and air flows set to 25 and 250 ml min⁻¹,

respectively. The fiber aging was checked weekly by performing an analysis with a standard test tube containing standard volatile compounds dissolved in MiglyolTM (propanal, pentane, hexanal, 2-octenal, 1-octen-3-ol and 2,4-decadienal). Volatiles compounds were identified by GC (HP 5890 series II gas chromatograph) coupled to mass spectroscopy (MS) (Trace DSQII ThermoFisher Scientific mass spectrometer) in conditions similar to those of the GC-FID analysis, except for helium as carrier gas. Mass spectra were obtained with a 70 eV electron impact ionization and continuous scanning from m/z 35 to 350 at a scan speed of 2 scan s⁻¹. They were compared to spectra found in NIST library. GC-MS identification of volatile compounds was performed on 3 different emulsions. Peaks obtained with GC-FID analysis were integrated with Borwin software. The peak areas were converted into amounts of volatiles compounds (µmol kg⁻¹ oil) according to calibration curves. The external calibration was performed with Tween 20-stabilized O/W emulsions prepared with non stripped rapeseed oil in which known amounts of standard compound solutions had been incorporated. Special attention was given to obtain proportions of the eighteen main volatile compounds similar to those observed in oxidized emulsions and to comprise the highest and lowest amounts of volatiles. Calibration emulsions were distributed in vials, equilibrated at 25 °C for at least 30 min. Peak areas were obtained from SPME-GC analysis as previously described. The coefficient of variation (standard deviation divided by average value, %) was calculated for propanal and hexanal with 5 standard test tubes.

Experimental design and data treatment. For each emulsifier or pH, at least two emulsions were prepared independently. Due to the duration of each analysis, oxygen uptake was measured in 2 vials, with three headspace sampling per vial; CD were measured in one vial, with three sampling per vial; volatile compounds were analyzed in one vial, with one sampling per vial. In the particular case of emulsions containing excess emulsifiers in the aqueous phase, only oxygen uptake and formation of volatile compounds were measured.

The lag phases and rates of oxygen uptake and CD formation were calculated by adjustment by a modified-Gompertz model performed on the whole individual data, according to equation (1). After several tests, this model was found as well adapted to adjust curves presenting a lag phase, an increasing phase and a plateau.

$$Y = y_0 + A \exp\left(-\exp\left(1 + \frac{\mu \exp(1) \times (L-t)}{A}\right)\right)$$
(1)

where Y is the oxygen uptake (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ oil) or the CD formation (mmol eq HP kg⁻¹ oil), y_0 is equal to zero for oxygen uptake or to the initial amount of CD in emulsions (mmol eq HP

kg⁻¹ oil), t is the time of incubation (h), *A* is the threshold value of oxygen uptake (mmol O₂ kg⁻¹ oil) or CD formation (mmol eq HP kg⁻¹ oil), μ is the rate of oxygen uptake (mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹) or of CD formation (mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹) and *L* is the lag period (h).

A nonlinear regression was applied to estimate *L* and μ with the Marquardt algorithm. *A* was fixed to 134 mmol O₂ kg⁻¹ oil for oxygen uptake or to 80 mmol eq HP kg⁻¹ oil for CD formation, as experimentally determined. The initial estimates of *L* and μ were 1.0 and 1.0, respectively. Asymptote confidence intervals for *L* and μ values were calculated with a 95% significance level. These calculations were performed with Statgraphics Plus 5.1 software (StatPoint Technologies, Warrenton, USA).

Using estimated values of *L* and μ , the time (t_{1/2}, h) corresponding to the incubation time when half the maximum oxygen uptake or CD formation was reached, respectively, was calculated from equation (2) as follows:

$$t_{1/2} = L - \frac{\left(\ln\left(-\ln\frac{Y-y_0}{A}\right) - 1\right) \times A}{\mu \times \exp(1)}$$
(2)

RESULTS

Physical characterization of emulsions. *Particle size distribution*. Emulsions stabilized with the different emulsifiers had similar particle size distributions with an average $[d_{3,2}]$ comprised between 1.4 and 2.2 µm at t₀ (**Table 1**). Although BLG-stabilized emulsions exhibited a slight increase of the average $[d_{3,2}]$, the particle size distributions remained quite constant during incubation. Consequently, differences in oxidation rates for the different emulsions might be attributed to neither the particle size distribution nor the destabilization of the oil droplets.

Surface charge of oil droplets. At pH 6.7, emulsions stabilized with proteins were negatively charged as revealed by Zeta potential measurements: from –54.5 mV for the BLG-stabilized emulsion to –29.8 mV for the BSA-stabilized emulsion) (**Table 1**). Emulsions stabilized with non-ionic surfactants exhibited a weak net charge whereas the emulsions stabilized with the anionic surfactant Citrem were the most negatively charged (-96.9 mV). At pH 3.0, the surface charge of the BLG-stabilized emulsion was dramatically reversed (68.1 mV) whereas this of the Tween 20-stabilized emulsion was little modified.

Amount of unadsorbed emulsifiers. In the absence of excess emulsifier added after homogenization, emulsions prepared at pH 6.7 contained low amounts of emulsifier

remaining in the aqueous phase (0.012 to 1.68 g Γ^1 , **Table 1**). Emulsions stabilized with BCN, Citrem and Tween 20 contained less than 20% of the total emulsifier molecules located in the aqueous phase (**Figure 1**). Emulsions stabilized with BSA, Tween 80 and BLG at pH 6.7 contained about 30% of the total emulsifier molecules in the aqueous phase. This could not be avoided because decreasing the initial concentration of emulsifier resulted in an increase of the average droplet size and a rapid physical destabilization of emulsions. The highest proportion of unadsorbed emulsifiers was found in the emulsion stabilized with BLG at pH 3.0 which contained about 40% (2.1 g Γ^1) of the total BLG molecules in the aqueous phase. In contrast, emulsions prepared with Tween 20 contained similar amounts of unadsorbed emulsifier, whatever the pH. Distribution of emulsifiers between the interface and the aqueous phase remained overall constant during incubation except in the case of BCN stabilized emulsion in which some desorption of the protein probably occurred (Berton et al., 2011a).

When excess emulsifier (BLG, BCN or Tween 20) was added after the homogenization of the emulsions prepared at pH 6.7, the amounts of unadsorbed emulsifiers in the aqueous phase were accordingly higher (around 6 g 1^{-1} ; 3.6 g 1^{-1} or 3.4 g 1^{-1} , respectively), as shown in **Table 1**.

Table 1. Physical characteristics of the emulsions stabilized with different emulsifiers. Data represent the mean and standard deviation of three measurements on three emulsions prepared independently for $[d_{3,2}]$ and emulsifier concentration in the aqueous phase, and the mean and standard deviation of three measurements on one emulsion for Zeta potential.

Emulsifier	pН	Emulsifier initial concentration in aqueous solution (g 1 ⁻¹)	Emulsifier concentration in aqueous phase of emulsion (g l^{-1}) at t_0	$[d_{3,2}] (\mu m)$ at t ₀	$[d_{3,2}]$ (µm) at t = 48 h	Zeta potential (mV) at t ₀
BLG	6.7	5.0	$1.52 \pm 0.09 **$	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1	-54.5 ± 0.4
BSA	6.7	4.0	$1.17 \pm 0.11^{**}$	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2	-29.8 ± 1.3
BCN	6.7	5.0	$0.45 \pm 0.12^{**}$	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	-46.5 ± 1.9
Tween 20	6.7	5.0	$0.47 \pm 0.09^{**}$	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	-9.6 ± 0.8
Tween 80	6.7	5.0	$1.68 \pm 0.14 **$	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	-6.4 ± 0.1
Citrem	6.7	6.0*	$0.012 \pm 0.004 **$	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.1	-96.9 ± 3.3
BLG	3.0	5.0	2.10 ± 0.19	2.2 ± 0.1	2.7 ± 0.2	68.1 ± 1.2
Tween 20	3.0	5.0	0.56 ± 0.10	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.1	-3.8 ± 0.1
BLG	6.7	10.0	6.05 ± 0.10	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	nd
BCN	6.7	10.0	3.60 ± 0.10	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	nd
Tween 20	6.7	10.0	3.37 ± 0.17	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	nd

nd: non-determined

* Citrem was incorporated in the oil phase, with a concentration equivalent to 6 g l^{-1} of aqueous solution.

** Data from Berton et al. (2011a).



Figure 1. Proportion of unadsorbed emulsifiers in the emulsions, freshly prepared or after 48 h of incubation (25 °C, FeSO₄/EDTA; M/M; 1/1). Data represent the means of 2 to 6 measurements for at least 2 emulsions prepared independently. Errors bars correspond to standard deviations.

Oxidative stability of emulsions at pH 6.7. *Emulsions without excess of emulsifier*. Oxygen uptake started almost from the beginning of the incubation period for the BLG-stabilized emulsion, whereas a longer lag phase was observed for the other emulsions (**Figure 2a**). After the lag phase, oxygen consumption increased until a plateau at about 134 mmol O2 kg⁻¹ oil. The plateau corresponds to about 25% of oxygen initially present in the vials and is, at least in part, due to the experimental procedure (Villière et al., 2005). In the increasing phase, oxygen uptake was slower in emulsions stabilized with Tween 20, Tween 80 and BCN than in emulsions stabilized with BSA and BLG. No substantial oxygen uptake was observed for the Citrem-stabilized emulsions all along the incubation period. Therefore, a first ranking of the pH 6.7 emulsions according to their oxygen uptake was as follows: BLG < BSA < BCN < Tween 80 ≈ Tween 20 < Citrem.

Amounts of CD in freshly prepared emulsions were lower than 10 mmol eq HP kg⁻¹ oil versus 7.8 mmol eq HP kg⁻¹ in the stripped oil, which shows that emulsification did not induce substantial oxidation of the oil. Formation of CD enabled to rank the emulsions in a roughly similar order as oxygen uptake, even if the difference between the BSA- and BCN-stabilized emulsions was less obvious (**Figure 2b**).

Twenty four volatile compounds were identified during the incubation of emulsions. We chose to focus on the formation of propanal, which is a volatile compound arising from oxidation of n-3 PUFA, and hexanal, which is a volatile compound arising from oxidation of n-6 PUFA, both of them being major and current markers of lipid oxidation (Frankel, 1985; Genot et al., 2003). Formation of volatile compounds showed overall similar trends as oxygen uptake and formation of CD (**Figures 2c, 2d**). Formation of propanal was enhanced in BLG-stabilized emulsions while no substantial amount of the compound was detected in Citrem-stabilized emulsions. In between, BCN-, BSA-, Tween 20- and Tween 80-stabilized emulsions whatever the emulsifiers. The formation of hexanal was the fastest in BLG-stabilized emulsions in opposition to Citrem-stabilized emulsions, BCN-, BSA-, Tween 20-, Tween 80-stabilized emulsions being intermediate.

To summarize, the combination of the three lipid oxidation measurements (oxygen uptake and formation of CD, hexanal and propanal) showed a concordance among the obtained data. In our experimental conditions, the ranking of the emulsions according to their chemical stability is $BLG < BSA \le BCN < T$ ween $80 \approx T$ ween 20 < Citrem.



Figure 2. Oxygen uptake (a), formation of CD (b) and volatile compounds (c: propanal; d: hexanal) during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box), Tween 20 (\circ), Tween 80 (\times) or Citrem (+) at pH 6.7, at 25 °C in the dark, in the presence of FeSO₄/EDTA (1/1; M/M; 200 μ M). In graphics (a) and (b), dotted curves correspond to adjusted modified-Gompertz model drawn with the *L* and μ parameters estimated for each emulsion except for the Citrem-stabilized emulsion. Error bars represent the standard deviations for oxygen uptake and CD measurements. Coefficients of variation were 3.3% and 11.6% for propanal and hexanal formation, respectively (see text).

To compare the oxidative stability of the different emulsions with quantitative data, oxygen uptake and CD formation curves were adjusted with a modified-Gompertz model (equation 1). Correlation coefficients (R^2) obtained for the modeling were higher than 90% for all emulsions prepared at pH 6.7 (**Table 2**), indicating a rather good adjustment with the modified-Gompertz equation.

The shortest lag phases were obtained for the BLG-stabilized emulsion (L = 3.3 h for oxygen uptake and 1.4 h for CD formation). It was the longest for oxygen uptake in the Tween 20-stabilized emulsion (36.3 h) and for CD formation in the Tween 80-stabilized emulsion (28.2 h). The highest rates of oxygen uptake and CD formation were obtained for the BLG-stabilized emulsion (6.1 mmol O_2 kg⁻¹ oil h⁻¹ and 2.4 mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹, respectively).

The lowest rate of oxygen uptake was observed for the Tween 80-stabilized emulsion (2.5 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹) whereas the lowest rates of CD formation were obtained for both Tween 20- and Tween 80-stabilized emulsions, with similar values (around 1.3 mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹). The shortest t_{1/2} values were obtained for the BLG-stabilized emulsion, for which half the maximum of oxygen uptake and CD formation were reached after 14.4 h and 13.8 h, respectively. The longest t_{1/2} for oxygen uptake were obtained for both Tween 20- and Tween 80-stabilized emulsions, for which half the maximum oxygen uptake was reached after around 55 h of incubation. The longest t_{1/2} for CD formation was obtained for Tween 80-stabilized emulsion, for which half the maximum CD formation was reached after 51.8 h of incubation. These quantitative parameters confirm the order of oxidative stability for the emulsions at pH 6.7 according to the emulsifier, which is definitely as follows: BLG < BSA ≤ BCN < Tween 20 ≈ Tween 80 << Citrem.

Table 2. Lag periods (L_1 and L_2) and rates of oxygen uptake (μ_1) and CD formation (μ_2) for the emulsions. Asymptote confidence intervals for *L* and μ values were calculated with a 95% significance level. Correlation coefficients (R²) indicate the percentage of dispersion explained by the adjusted model. $t_{1/2}$ (1) and $t_{1/2}$ (2) are incubation times calculated with the model when half the maximum oxygen uptake or CD formation were reached, respectively.

	Oxygen uptake parameters				CD formation parameters				
Emulsion	<i>L</i> ₁ (h)	$\begin{array}{c} \mu_1 \text{ (mmol} \\ \text{O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ oil} \\ \text{h}^{-1} \text{)} \end{array}$	R² (%)	t _{1/2 (1)} (h)	<i>L</i> ₂ (h)	$\mu_2 \text{ (mmol)} $ eq HP kg ⁻¹ oil h ⁻¹)	R² (%)	t _{1/2 (2)} (h)	μ_1 / μ_2
BLG pH 6.7	3.3 ± 0.4	6.1 ± 0.2	98.3	14.4	1.4 ± 1.5	2.4 ± 0.2	94.2	13.8	2.5
BSA pH 6.7	14.0 ± 0.8	4.8 ± 0.3	97.1	27.9	9.4 ± 2.4	2.0 ± 0.3	93.4	27.3	2.4
BCN pH 6.7	15.0 ± 0.8	3.3 ± 0.1	96.9	35.6	2.5 ± 1.9	1.7 ± 0.2	90.1	22.2	1.9
Tween 20 pH 6.7	36.3 ± 1.8	3.6 ± 0.4	92.0	55.0	16.1 ± 2.7	1.3 ± 0.1	93.0	46.7	2.8
Tween 80 pH 6.7	28.6 ± 1.3	2.5 ± 0.2	95.7	55.5	28.2 ± 1.3	1.4 ± 0.1	97.9	51.8	1.8
BLG pH 3.0	13.4 ± 1.4	3.2 ± 0.2	96.2	34.8	4.7 ± 2.1	1.2 ± 0.1	94.6	27.4	2.7
Tween 20 pH 3.0	68.9 ± 5.2	0.6 ± 0.2	80.1	172.9	49.5 ± 3.3	0.6 ± 0.1	86.8	98.1	1.0
BLG pH 6.7 (excess BLG)	9.9 ± 1.3	3.9 ± 0.3	95.7	27.3	nd	nd	nd	nd	-
BCN pH 6.7 (excess BCN)	44.4 ± 1.2	3.9 ± 0.4	94.4	61.8	nd	nd	nd	nd	-
Tween 20 pH 6.7 (excess Tween 20)	43.2 ± 1.0	1.9 ± 0.1	97.0	77.9	nd	nd	nd	nd	-

nd: non-determined

Emulsions with excess emulsifier in the aqueous phase. Most previous studies investigating the effect of the emulsifier on lipid oxidation in O/W emulsions have been carried out in the presence of large excess of emulsifier in the aqueous phase. To evidence the effect of these unadsorbed emulsifiers, we added excess emulsifier (BLG, BCN or Tween 20) in the aqueous phase of the emulsions prepared with limited amounts of BLG, BCN or Tween 20. In the BLG-stabilized emulsion containing excess BLG, the concentration of unadsorbed BLG increased from 1.5 to 6.1 g l^{-1} (**Table 1**). In these conditions, oxygen uptake was lower than in the BLG-stabilized emulsion without excess BLG (Figure 3a). In the same way, when unadsorbed BCN or Tween 20 were added in the aqueous phase of BCN- or Tween 20stabilized emulsions, respectively, oxygen uptake was slowed down (Figures 3b, 3c). A huge increase of the lag phase $(L_1 = 44.4 \text{ h})$ was noticed in the presence of excess BCN as compared with the control consisting of BCN-stabilized emulsion with low amounts of unadsorbed BCN (Table 2). Formation of lipid oxidation volatile compounds was also decreased in the presence of the emulsifiers added in the aqueous phase (data not shown). These results demonstrate the antioxidant effect of unadsorbed emulsifiers, unadsorbed BCN being the most effective.



Figure 3. Oxygen uptake during incubation of emulsions stabilized with BLG at pH 6.7 (a) without (\triangle) or with (\blacktriangle) excess BLG in the aqueous phase; BCN at pH 6.7 (b) without (\Box) or with (\blacksquare) excess BCN in the aqueous phase; or Tween 20 at pH 6.7 (c) without (\bigcirc) or with (\bullet) excess Tween 20 in the aqueous phase at 25 °C in the dark, in the presence of FeSO₄/EDTA (1/1; M/M; 200 μ M). Dotted curves correspond to the modified-Gompertz equation with the estimated *L* and μ parameters. Error bars represent standard deviations.

Oxidative stability of emulsions at pH 3.0. In order to distinguish between the effect of interface composition and charge, we studied the oxidative stability of emulsions prepared at pH 3.0 when BLG-stabilized droplets carry globally a positive charge whereas Tween 20-stabilized droplets remain almost non-charged (**Table 1**). In contrast with the BLG-stabilized emulsion at pH 6.7 ($L_1 = 3.3$ h), a longer lag phase ($L_1 = 13.4$ h) was observed in the BLG-stabilized emulsions at pH 3.0 (**Figure 4a**). Then, oxygen uptake proceeded at a lower rate (3.2 against 6.1 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹). In the Tween 20-stabilized emulsion, the lag phase increased from 36.3 to 68.9 h when pH decreased from 6.7 to 3.0. Formation of CD showed roughly similar trends (**Figure 4b**). Rates of CD formation were slower at pH 3.0 than at pH 6.7 for both emulsifiers (**Table 2**). In the same way, formation of propanal and hexanal increased less rapidly at pH 3.0 than at pH 6.7 for both emulsifiers (**Figures 4c, 4d**).



Figure 4. Oxygen uptake (a), formation of CD (b) and volatile compounds (c: propanal; d: hexanal) during incubation of emulsions stabilized with BLG at pH 6.7 (\triangle), BLG at pH 3.0 (\blacklozenge), Tween 20 at pH 6.7 (\bigcirc) or Tween 20 at pH 3.0 (\blacklozenge), at 25 °C in the dark, in the presence of FeSO₄/EDTA (1/1; M/M; 200 µM). In graphics (a) and (b), dotted curves correspond to the modified-Gompertz equation with the estimated *L* and *µ* parameters. Error bars represent the standard deviations for oxygen uptake and CD measurements. Coefficients of variation were 3.3% and 11.6% for propanal and hexanal formation, respectively (see text).

DISCUSSION

Lipid oxidation was measured by three methods, enabling to characterize the different stages of the reaction. Results from these three methods corroborate our hypothesis. Oxygen uptake measurement was the most rapid and convenient method, both to acquire and analyze the data. Considering the standard deviations, it was also the most reproducible method and enabled better to discriminate the different emulsions in regard to their oxidative stability. Beyond the qualitative description of the lipid oxidation curves, the adjustment of the curves with the modified-Gompertz model enabled us to go further in the understanding of the mechanisms. The mathematical model allowed to estimate the lag phase, L and the oxygen uptake and CD formation rates, μ . These parameters correspond to the initiation and propagation stages of lipid oxidation, respectively (Dangles et al., 2000; Labuza, 1971). The estimated lag periods (L) were always equal or shorter for CD formation than for oxygen uptake. As CD are formed through the abstraction of a hydrogen atom from a bisallylic position followed by double bond rearrangement and oxygen fixation, this result probably comes from a higher sensitivity for the spectrophotometric measurement of conjugated dienes than for the headspace-GC measurement of oxygen uptake (Frankel, 1998). Oxygen initially dissolved in the aqueous and lipid phases of the emulsion is first and probably rapidly consumed (Genot et al., 1994). A decrease of oxygen concentration in the headspace is only detected when a sufficient amount of oxygen has diffused from the gas phase to the liquid phase. The μ_1 / μ_2 ratio for the different emulsions, except the Tween 20-stabilized emulsion at pH 3.0, was comprised between 1.8 and 2.8. This corroborates the higher maximum oxygen uptake (134 mmol O₂ kg⁻¹ oil) as compared to maximum CD concentration (80 mmol eq HP kg⁻¹ oil). This difference can be partly explained by the fact that CD simultaneously form and decompose into secondary oxidation products such as volatile compounds. In fact, for all emulsions, propanal and hexanal were detected at the same time as the formation of CD. In addition, oxygen could be also consumed without CD formation through fixation by monoenic species (namely oleic acid) and by direct reaction of oxygenated free radicals with proteins (Davies et al., 1987; Levine & Stadtman, 2001). However, no substantial decrease in the C18:1 content was observed in the oxidized emulsions (data not shown).

In our experimental conditions, namely the presence of low amounts of unadsorbed emulsifiers and iron/EDTA-catalyzed oxidation, the emulsions stabilized with surfactants exhibited a better oxidative stability than the emulsions stabilized with proteins. As summarized in **Figure 5**, protein-stabilized emulsions had shorter lag phases and higher rates of oxygen uptake and CD formation than surfactant-stabilized emulsions. This observation differs from previous results that showed a better oxidative stability for emulsions stabilized by proteins (Fomuso et al., 2002a; Haahr & Jacobsen, 2008; Kiokias et al., 2006; Osborn & Akoh, 2004). We assume that the results obtained in these previous studies corresponded to a global effect of the emulsifier, both adsorbed at the oil-water interface and solubilized in a large proportion in the aqueous phase. To test this hypothesis, we added an excess of emulsifier in the aqueous phase of the optimized emulsions. We observed a delay in the oxidation process, especially when unadsorbed proteins were used, confirming previous data (Elias et al., 2005; Faraji et al., 2004; Genot et al., 2003; Ries et al., 2010; Sugiarto et al., 2010; Sun & Gunasekaran, 2009). This also demonstrates that the emulsions designed with low amounts of emulsifiers in the aqueous phase provide information regarding mainly the

role of the emulsifier located at the interface on lipid oxidation. When emulsions samples were prepared in such conditions, the proteins adsorbed at the interface do not protect efficiently lipids against oxidation, in comparison to surfactants. We assume that surfactant-stabilized interfaces could protect lipids against oxidation because of their compactness and homogeneity, whereas protein-stabilized interfaces would be more heterogeneous and porous. Surfactants are described in the literature as more surface-active than proteins, forming more compact adsorbed layers (Bos & van Vliet, 2001; Murray & Dickinson, 1996; Wilde et al., 2004).

The emulsions stabilized with non-ionic surfactants (Tween 20 and Tween 80), exhibited similar lipid oxidation kinetics. These two surfactants only differ by their hydrophobic chains mainly composed of lauric acid or oleic acid, respectively. The size of the hydrophobic chains of the surfactants adsorbed at the interface is therefore not a main factor influencing lipid oxidation in emulsions, as previously suggested (Chaiyasit et al., 2000).

Our results indicate also that the surface charge of the droplets is not the most crucial factor influencing lipid oxidation in emulsions. First, the positively charged BLG-stabilized emulsion prepared at pH 3.0 remained less oxidatively stable than the surfactant-stabilized one (**Figure 4, Table 2**). Second, the order of Zeta potential was: Citrem < BLG pH 6.7 < BCN pH 6.7 < BSA pH 6.7 < Tween 20 \approx Tween 80 < BLG pH 3.0 (**Table 1**), which does not correlate with the order of oxidative stability previously mentioned. In particular, the Citremstabilized emulsion. Thus, the rapid oxidation in the protein-stabilized emulsions at pH 6.7 cannot be attributed only to the negative charge of the droplets. When unadsorbed emulsifiers are in low concentrations, the oxidative stability of emulsions having positively charged interfacial layers and stabilized by a protein is not better than the oxidative stability of emulsions stabilized with non-ionic surfactants.

BLG and Tween 20-stabilized emulsions were more oxidatively stable at pH 3.0 (phosphoric buffer) than at pH 6.7 (PIPES buffer). These differences can account from several physicochemical factors including pH, droplet charge, unadsorbed emulsifiers and chemical reactivity of buffers. For Tween 20-stabilized emulsions, L_1 and L_2 increased while μ_1 and μ_2 decreased when decreasing the pH, indicating that both initiation and propagation were slowed down. Tween 20 being a non-ionic surfactant, the surface charge of the droplets was weakly affected by pH, as demonstrated by Zeta potential measurements (**Table 1**). The amount of unadsorbed Tween 20 did not change substantially between pH 3.0 and pH 6.7 (**Figure 1**). Thus, in Tween 20-stabilized emulsions, the droplet charge and the amount of unadsorbed emulsifiers were not involved in the observed differences. About the effect of pH on lipid oxidation in emulsions, contradictory results had been obtained. Some authors observed that emulsions were more oxidatively stable at neutral pHs than at acidic pHs (Haahr & Jacobsen, 2008; Mei et al., 1998b; Villière & Genot, 2006). This was assumed to be due to the higher iron solubility at low pHs. However, others observed the opposite tendency (Faraji et al., 2004; Hu et al., 2003a; Mancuso et al., 1999b; Osborn-Barnes & Akoh, 2003), which corresponds to the results we obtained. The lower solubility of metals at neutral pHs than at acidic pHs would result in the precipitation of metal onto the lipid droplets, promoting more efficiently lipid oxidation (Mancuso et al., 1999b). A possible explanation for these contradictory results is the interference of several mechanisms within the pH effect. Additionally, phosphoric acid and PIPES may intervene in the oxidative stability (Tadolini, 1987; Yoshimura et al., 1992). For BLG-stabilized emulsions, L_1 and L_2 increased only slightly when decreasing the pH, whereas μ_1 and μ_2 decreased sharply (**Table 2**, **Figure 5**) showing modifications in the propagation step of the reaction. The same physico-chemical factors as above may be involved. However, the charge effect, favoring Coulombic interactions between iron ions and negatively charged interface, cannot be excluded due to the huge increase of Zeta potential values from pH 6.7 to pH 3.0 (Table 1). Finally, the amount of unadsorbed BLG was higher at pH 3.0 than at pH 6.7 (Table 1), which could also contribute to decrease the rate of oxidation in the propagation steps and to improve the oxidative stability (Table 2, Figure 3).



Figure 5. Relationships between the lag periods and (a) the rates of oxygen uptake (mmol O_2 kg⁻¹ oil h⁻¹) or (b) the rates of CD formation (mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹) for the emulsions containing limited concentrations of unadsorbed emulsifiers at pH 6.7 (\Box) or pH 3.0 (\diamond). Error bars correspond to the asymptote confidence intervals calculated with a 95% significance level.

The oxidative stability of emulsions stabilized by proteins at pH 6.7 was in the order BLG <BSA < BCN. The amount of unadsorbed proteins in the aqueous phase that could act as antioxidant increased in the reverse order (**Table 1**): BCN (0.45 g l^{-1}) < BSA (1.17 g l^{-1}) < BLG (1.52 g l⁻¹), reinforcing the conclusion that oil droplets covered by BLG oxidizes faster than oil droplets covered by BCN. In previous studies performed with excess emulsifiers, casein had already been shown to be more effective in protecting against lipid oxidation than other proteins (Clausen et al., 2009; Faraji et al., 2004; Hu et al., 2003b). This was usually explained by its ability to chelate metal ions (Faraji et al., 2004; Sugiarto et al., 2010; Villière et al., 2005), to scavenge free radicals (Clausen et al., 2009) or to form thick interfacial layers (Fang & Dalgleish, 1993b). Considering the average diameter $([d_{3,2}])$ and the amount of excess proteins in the aqueous phase (Table 1), the surface concentrations of each protein were around 1.8 mg m⁻²; 1.9 mg m⁻² and 2.9 mg m⁻² for BLG-, BSA- and BCN-stabilized emulsions, respectively. This confirms that BCN formed the most dense interfacial layer surrounding oil droplets and the possible role of the density of the interfacial layer in the oxidation of emulsified lipids (Fang & Dalgleish, 1993b). In bovine and caprine caseinstabilized emulsions, the phosphoprotein BCN was recently found by ³¹P NMR to insert its hydrophobic site compactly into the oil droplets and present its hydrophilic end on the surface. This could participate to the protecting effect against lipid oxidation of BCN compared to BLG and BSA (Mora-Gutierrez et al., 2010).

This research brings new insights about the effect of the composition of the interfacial layer on lipid oxidation in emulsions. The optimization of emulsion formulation enabled to demonstrate that protein-stabilized interfaces are less efficient to protect emulsified lipids against iron/EDTA-catalyzed oxidation than surfactant-stabilized interfaces. The antioxidant effect of unadsorbed proteins was also confirmed. Complementary work is currently performed in our laboratory to expand our results to various conditions of initiation of oxidation and to characterize the modifications undergone by the interfacial proteins in the oxidizing emulsions.

ABBREVIATIONS USED

BCN, β -casein; BLG, β -lactoglobulin; BSA, bovine serum albumin; CD, conjugated dienes; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; FAME, fatty acid methyl ester; FID, flame ionization detector; GC, gas chromatography; HP, hydroperoxides; MS, mass spectroscopy; O/W emulsion, oil-in-water emulsion; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SDS, sodium dodecyl sulfate; SPME, solid phase microextraction; TCD, thermal conductivity detector.

AKNOWLEDGEMENT

We thank Ph. Courcoux who kindly advised us in the choice of the mathematical model, and C. Sanchez, C. Dufour and D.J. McClements for their useful comments and suggestions. The financing of this work and Ph-D grant of C. Berton by INRA and Région Pays de la Loire are gratefully acknowledged.
2.2.2. Oxydation des lipides dans les émulsions contenant du Tween 20 et de la BLG

Les résultats présentés dans cet article montrent que, si les interfaces stabilisées par des tensioactifs sont plus efficaces pour limiter l'oxydation des lipides que les interfaces stabilisées par des protéines, ces dernières ralentissent nettement la réaction lorsque leur concentration dans la phase aqueuse de l'émulsion augmente. Afin de coupler les effets protecteurs des tensioactifs à l'interface et des protéines non adsorbées, une émulsion stabilisée par le Tween 20 a été formulée, puis une solution de BLG a été ajoutée post émulsification à hauteur de 5 g l^{-1} de phase aqueuse. Nous avons également suivi l'oxydation des lipides dans des émulsions préparées avec des solutions aqueuses contenant des mélanges BLG/Tween 20 dans des rapports massiques 9,7/1 ou 1,1/1. Les concentrations et proportions en BLG non adsorbée dans ces émulsions sont présentées dans le Tableau IX. Dans l'émulsion stabilisée par le Tween 20 et additionnée de BLG post émulsification, la totalité de la BLG ajoutée est effectivement contenue dans la phase aqueuse de l'émulsion. Dans les émulsions préparées à partir des mélanges d'émulsifiants BLG/Tween 20, l'utilisation de Tween 20 augmente la proportion de BLG non adsorbée, par rapport à l'émulsion stabilisée par la BLG seule. Lorsque ces deux émulsifiants sont utilisés en proportions massiques équivalentes (1,1/1; p/p), la quasi-totalité de la BLG est non adsorbée dans la phase aqueuse de l'émulsion (93,8%). Ceci s'explique probablement par la compétition pour l'adsorption entre les protéines et les tensioactifs, phénomène largement décrit dans la littérature (Courthaudon et al., 1991b; Courthaudon et al., 1991c; Dickinson, 1991; Dickinson, 2011; Dickinson & Tanai, 1992; Richards et al., 2011; van Aken, 2003).

Emulsion	Concentration de BLG en solution aqueuse $(g \Gamma^{1})$	Concentration de Tween 20 en solution aqueuse $(g l^{-1})$	Concentration de BLG en phase aqueuse $(g l^{-1})$	Proportion de BLG en phase aqueuse (%)
Stabilisée par le Tween 20 + BLG en excès*	5,00*	5,00	$5,05 \pm 0,38$	~ 100
Stabilisée par un mélange BLG/Tween 20 1,1/1 ; p/p	2,53	2,36	2,37 ± 0,18	93,8
Stabilisée par un mélange BLG/Tween 20 9,7/1 ; p/p	4,55	0,47	2,07 ± 0,04	45,5
Stabilisée par la BLG seule	5,00	-	$1,52 \pm 0,09$	30,4

Tableau IX. Concentrations et proportions en BLG dans la phase aqueuse d'émulsions fraîchement préparées (t = 0).

* La BLG a été ajoutée post émulsification.

Les données indiquées représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 mesures sur une émulsion.

Les courbes de consommation d'oxygène obtenues lors de l'incubation de ces émulsions $(25^{\circ}C, FeSO_4/EDTA 1/1; M/M; 200 \mu M)$ sont présentées dans la Figure 22.

Lorsque la BLG est ajoutée en phase aqueuse de l'émulsion stabilisée par le Tween 20 *post* émulsification, la cinétique de consommation d'oxygène dans l'émulsion n'est que très peu ralentie par rapport à l'émulsion stabilisée par le Tween 20 seul, sans BLG. Ce résultat est surprenant puisque nous avons montré que de la BLG ajoutée *post* émulsification dans une émulsion stabilisée par la BLG permettait de ralentir l'oxydation lipidique. Ce résultat est peut-être dû à des effets couplés et/ou antagonistes du couple tensioactif adsorbé (Tween 20)/protéine non adsorbée (BLG). L'utilisation d'un autre tensioactif et/ou d'une autre protéine pourrait peut-être conduire à une meilleure amélioration de la stabilité oxydative de l'émulsion.

L'utilisation de mélanges BLG/Tween 20 en tant qu'émulsifiants n'améliore pas ou peu la stabilité oxydative des émulsions par rapport à l'émulsion stabilisée par la BLG seule, même lorsque le Tween 20 est utilisé dans une proportion importante (BLG/Tween 20 1,1/1 ; p/p). Dans ce cas, quasiment toute la BLG est non adsorbée (Tableau IX) et la quantité de Tween 20 disponible pour couvrir l'interface huile/eau est deux fois plus faible que dans l'émulsion stabilisée par le Tween 20 seul (2,36 g l⁻¹ de phase aqueuse au lieu de 5 g l⁻¹ de phase aqueuse). Les gouttelettes obtenues étant toutefois de taille équivalente pour toutes les émulsions, la couverture de surface du Tween 20 est alors environ deux fois plus faible que

dans l'émulsion stabilisée par le Tween 20 seul. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'émulsion formulée à partir du mélange BLG/Tween 20 (1,1/1 ; p/p) s'oxyde rapidement par rapport à l'émulsion stabilisée par le Tween 20 seul.



Figure 22. Consommation d'oxygène au cours de l'incubation d'émulsions stabilisées par la BLG seule (\triangle), le Tween 20 seul (\circ), le Tween 20 et contenant de la BLG ajoutée en phase aqueuse (×), un mélange BLG/Tween 20 9,7/1 p/p (\blacklozenge) ou un mélange BLG/Tween 20 1,1/1 p/p (\blacksquare), à 25°C à l'obscurité, en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 µM). Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12).

2.2.3. Influence du mode d'ajout de l'initiateur FeSO₄/EDTA et interactions avec les émulsifiants

Le complexe fer/EDTA a été choisi car il est décrit dans la littérature comme un pro-oxydant efficace lorsque les deux constituants sont utilisés dans un rapport équimolaire (Samokyszyn et al., 1990). Dans ces conditions, le fer est chélaté, ce qui évite l'établissement d'interactions avec les constituants de l'émulsion et en particulier les émulsifiants. Nous avons vérifié et confirmé expérimentalement, par calorimétrie de titration isotherme (ITC), l'absence d'interactions entre le complexe fer/EDTA préalablement formé et plusieurs des émulsifiants utilisés dans cette étude (SAB, β -lactoglobuline, β -caséine et Tween 20), à pH 6,7.

La formation du complexe fer/EDTA avant son introduction dans les émulsions est essentielle. En effet, l'introduction successive de la solution d'EDTA puis de la solution de FeSO₄ dans des émulsions stabilisées par des protéines conduit à des cinétiques d'oxydation totalement différentes (*Annexe XI*).

Même si l'utilisation du complexe fer/EDTA en tant qu'initiateur chimique accélère l'oxydation des lipides tout en évitant l'établissement d'interactions avec les émulsifiants, il nous a paru important de valider la meilleure protection contre l'oxydation offerte par les interfaces stabilisées par des tensioactifs que par les interfaces stabilisées par des protéines dans d'autres conditions d'incubation des émulsions. Ce travail fait l'objet des paragraphes suivants.

2.3. Généralisation de l'effet protecteur des tensioactifs contre l'oxydation des lipides dans des conditions d'incubation variées

2.3.1. Stabilité oxydative d'émulsions huile dans eau stabilisées par des protéines ou des tensioactifs en présence de différents initiateurs d'oxydation (Article 3)

Oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized with protein or surfactant emulsifiers in various oxidation conditions

Food Chemistry, article sous presse (doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.137)

Claire Berton, Marie-Hélène Ropers, Dominique Bertrand, Michèle Viau and Claude Genot*

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes, France

ABSTRACT

Many studies have investigated the effect of emulsifiers on the oxidative stability of oil-inwater (O/W) emulsions. A better oxidative stability of surfactant-stabilized O/W emulsions as compared to protein-stabilized emulsions has been recently evidenced in conditions when the major part of the emulsifier is adsorbed at the oil-water interface and oxidation is induced by iron-ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) complex. In this work, the contribution of the interfacial layer to the oxidation of emulsified lipids is investigated in various incubations conditions, involving different oxidation mechanisms. O/W emulsions were formulated at pH 6.7 with limited amounts of emulsifiers in the aqueous phase. Emulsions were incubated either at 33 °C without initiator or at 25 °C in the presence of iron/ascorbate, metmyoglobin or 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH). Oxygen uptake and volatile compound formation confirmed that protein-stabilized emulsions are less oxidatively stable than Tween 20-stabilized ones. This work also shows complex oxidative interrelationships between oxidation initiator and certain proteins, such as β -casein and bovine serum albumin.

Keywords:

Emulsion; Lipid oxidation; Initiator; Emulsifier; Protein; Surfactant; Oxygen uptake; Volatile compounds.

1. Introduction

Oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is a major cause of deterioration of food quality. It leads to the development of off-flavors and potentially toxic compounds. Oil-inwater (O/W) emulsions are extensively used as model food matrices to study the effect of compositional and process factors on lipid oxidation. In particular, many studies have investigated the effect of the emulsifier on lipid oxidation in emulsions. As compared to small surfactants, proteins have been generally found to protect the oil phase against oxidation (Fomuso et al., 2002a; Haahr & Jacobsen, 2008; Kiokias et al., 2006; Osborn & Akoh, 2004). This antioxidant effect is often attributed to the capacity of the proteins to chelate metal ions or to scavenge free radicals (Elias et al., 2008). Recent work from our laboratory focused on the contribution of the interfacial layer on lipid oxidation in O/W emulsions (Berton et al., 2011b). It appeared that surfactant-stabilized interfaces were more efficient to protect emulsified lipids against oxidation than protein-stabilized interfaces in the presence of an oxidation catalyst constituted of an equimolar mixture of iron and ethylenediaminetetracetic acid (EDTA). However, in all these studies, these effects were obtained in one specific incubation condition and could not be extrapolated to different incubation conditions. Various incubation temperatures or oxidation initiators have been used in the literature. Iron has been widely used to accelerate lipid oxidation in emulsions (Donnelly et al., 1998; Fomuso et al., 2002b; Guzun-Cojocaru et al., 2011; Haahr & Jacobsen, 2008; Mei et al., 1998b), even if other metals such as copper have been sometimes encountered (Fomuso et al., 2002b; Osborn-Barnes & Akoh, 2003). Water-soluble azo initiators such as 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) or 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] (ABIP) have also been shown to promote efficiently lipid oxidation in O/W emulsions or fatty acid dispersions (Gotoh et al., 2010; Hanlon & Seybert, 1997; Kubouchi et al., 2002). Haem proteins such as myoglobin, one of the main forms of dietary iron, promote efficiently lipid oxidation (Baron & Andersen, 2002). Myoglobin has therefore been used as lipid oxidation catalyst in several multiphase systems (Lorrain et al., 2010b; Min et al., 2010; Roginsky et al., 2007). Incubation temperature also varied from typical food storage temperatures (2 - 4 °C) to accelerated lipid oxidation conditions (50 - 60 °C) or higher temperatures when cooking or frying were the targeted process. As there is no evidence that each experiment would have led to similar conclusions if it had been performed in different incubation conditions, it is difficult to synthesize and generalize the effects of the tested factors on the oxidative stability of emulsified lipids.

The aim of this paper is to demonstrate that the better protection against lipid oxidation offered by Tween 20-stabilized interfaces as compared with protein-stabilized interfaces is valid in various incubation conditions. We considered the same emulsifiers as previously, namely β -lactoglobulin (BLG), bovine serum albumin (BSA), β -casein (BCN), and Tween 20. The incubation conditions included the use of water-soluble non-chelated iron, metmyoglobin, AAPH, or of a higher incubation temperature. The results were compared with those obtained with chelated iron (iron/EDTA) (Berton et al., 2011b).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Rapeseed oil was purchased in a local supermarket. It was stripped by means of alumina (MP Alumina N-Super I, MP Biomedicals, France) to eliminate impurities and tocopherols (Berton et al., 2011a). Stripped oil contained less than 2 μ g residual tocopherols per g oil and 0.34 μ mol hydroperoxides per g oil. Medium chain triglycerides (Miglyol) were obtained from International Flavors and Fragrances (Dijon, France). BSA (fraction V) was obtained from MP Biomedicals (France). BCN (purity \geq 98%) was purchased from Lactalis (France). BLG has been purified at the laboratory from whey protein isolate (Prolacta 90, Lactalis, France) by selective precipitation. It was 99% pure. Tween 20 (Sigma Ultra grade) was purchased from Sigma Aldrich (France). Other chemicals were from different suppliers: Sigma Aldrich (France), Fluka Chemika (France), Carlo Erba (France). The buffer was composed of 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES, 10 mM), NaCl (80 mM) and adjusted at pH 6.7.

2.2. Preparation and physical characterization of O/W emulsions

O/W emulsions were prepared with the stripped rapeseed oil (30 % w/w) and the aqueous solution of emulsifier (4 g L⁻¹ for BSA and 5 g L⁻¹ for BCN, BLG and Tween 20) in the PIPES buffer as previously described (Berton et al., 2011a). Briefly, the emulsification process comprised a first stage with a rotor-stator homogenizer to obtain a coarse emulsion and a second stage through a valve homogenizer at 35 bar for Tween 20-stabilized emulsions and at 50 bar for protein-stabilized ones. These emulsions were shown to be physically stable

for at least 48 h of incubation in oxidative conditions, and to contain as low as possible amounts of unadsorbed emulsifiers. The size distribution of oil droplets in the emulsions was measured immediately after homogenization with a laser light scattering instrument (Saturn 5200, Micromeritics, Verneuil en Halatte, France) and after 48 h of incubation. Emulsions stabilized with the different emulsifiers had similar particle size distributions with an average volume surface mean diameter ($[d_{3,2}]$) comprised between 1.5 and 1.8 µm at t₀. The particle size distributions remained quite constant during incubation, whatever the conditions. The profiles of particle size distribution in emulsions freshly prepared or after 48 h of incubation in the various conditions are presented in the supplementary data section.

2.3. Incubation of O/W emulsions

The chosen concentrations for FeCl₃/sodium ascorbate (Na-asc), metmyoglobin (MetMb) and AAPH: 50 μ M, 1 μ M and 1 mM, respectively, or the incubation temperature in the absence of catalyst: 33 °C, were chosen to obtain rates of lipid oxidation in the same range as those previously reported for the Tween 20-stabilized emulsion incubated at 25 °C with FeSO4/EDTA (1/1; M/M; 200 μ M) (Berton et al., 2011b). The initiators were prepared in ultra-pure water. For the FeCl₃/Na-asc catalyst, aqueous solutions of FeCl₃ and Na-asc were prepared and added separately in the emulsions: FeCl₃ solution first and Na-asc solution second.

After addition of the initiator solution or the same volume of ultra-pure water to the fresh emulsion, aliquots (3 ml) of emulsions were distributed in 20.5-ml headspace vials sealed with Teflon/silicon septa and aluminium crimp caps. The vials were rotated in the dark at 5 rpm at either 25 °C or 33 °C, with test tube rotators oriented at 30 degrees versus vertical position.

2.4. Measurements of lipid oxidation

2.4.1. Oxygen uptake

Oxygen uptake was determined as previously described (Berton et al., 2011b; Villière et al., 2005). Gas chromatography (GC) analysis of headspace samples was performed with a HP 5890 - series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Böblingen, Germany) coupled to a fused silica plot column (Molsieve 5A CP7535, length 10 m, internal diameter 0.32 mm,

Varian, Les Ulis, France) and to a thermal conductivity detector. Results were expressed in millimoles of consumed oxygen per kg oil (mmol O_2 kg⁻¹ oil).

2.4.2. Volatile compounds

The formation of secondary oxidation products was evaluated by the quantification of several volatile compounds in the headspace of the samples. We focused on the formation of propanal, 2-butenal, 2-pentenal and 2,4-hexadienal, which arise from the oxidation of n-3 PUFA and of pentane, hexanal, 2-heptenal and 2-octenal, which arise from the oxidation of n-6 PUFA (Genot et al., 2003). These compounds were analyzed by GC paired with a flame ionization detector (FID) after their adsorption on a solid-phase microextraction (SPME) fiber. The fiber (75 µm CarboxenTM – polydimethylsiloxane, Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed in the headspace of the vials for 15 min either at 25 °C or at 33 °C, according to the tested incubation conditions as previously described (Berton et al., 2011b). The volatiles compounds were identified on three different emulsions by GC coupled to mass spectroscopy (MS) (Trace DSQII ThermoFisher Scientific mass spectrometer) in conditions similar to those used for the quantification by GC-FID, except for helium which was used as carrier gas instead of hydrogen. Mass spectra were obtained with a 70 eV electron impact ionization and continuous scanning from m/z 35 to 350 at a scan speed of 2 scan s-1 and compared to spectra found in NIST library. Peaks obtained with GC-FID analysis were integrated with Borwin software. The peak areas were converted into amounts of produced volatiles compounds (µmol kg⁻¹ oil) according to calibration curves. The external calibration was performed with Tween 20-stabilized O/W emulsions prepared with non-stripped rapeseed oil in which known amounts of standard compound solutions had been incorporated. Special attention was given to obtain proportions of the eighteen identified main volatile compounds similar to those observed in oxidized emulsions and to comprise the highest and lowest amounts of volatiles. Calibration emulsions were distributed in vials, equilibrated either at 25 °C or at 33 °C for at least 30 min.

2.5. Experimental design and data treatment

For each emulsifier and incubation condition, two emulsions were prepared independently. At each aging time, oxygen uptake was measured in two vials, with three headspace sampling per vial; volatile compounds were analyzed in one vial, with one sampling per vial.

2.5.1. Fitting of oxygen uptake curves

Oxygen uptake curves were modeled applying a modified-Gompertz model as previously described (Berton et al., 2011b). The rate of oxygen uptake μ (mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹) and the lag phase *L* (h) estimated by non linear regression were finally used to calculate the time (t_{1/2}, h) needed to consume half the maximum oxygen uptake. The lag phase (*L*) and rate of oxygen uptake (μ) correspond to the initiation and propagation stages of lipid oxidation, respectively.

2.5.2. Statistical analysis

The experimental data, including those obtained at 25 °C with FeSO₄/EDTA (1/1 ; 200 μ M) were gathered in a matrix *X* including 378 rows and 9 columns (oxygen uptake and eight volatile compounds). Each row corresponded to an observation for a given time of incubation, a given emulsifier, a given initiator and a given repetition. The correlation coefficients between each pair of parameters in *X* were computed and formed the correlation matrix *C*, dimensioned 9 × 9. A c_{ij} element of *C* gave the correlation coefficient of the parameters of the *i* and *j* indices.

This matrix X was processed by principal component analysis (PCA) of the normalized data. These statistical analyses were carried out in the MATLAB[®] environment (version 7, The MathWorks, Natick, MA 01760-2098, USA).

3. Results and discussion

Emulsions were formulated to limit the amount of excess of emulsifier in the aqueous phase while ensuring their physical stability, as detailed in our previous work (Berton et al., 2011b). In these optimized emulsions, the effect of emulsifier (BLG, BSA, BCN or Tween 20) on lipid oxidation was studied in different incubation conditions. Oxygen uptake was measured as a global marker of oxidation. The formation of selected volatile compounds was followed as lipid oxidation secondary compounds arising from the degradation of n-6 and n-3 PUFA.

3.1. Effect of protein or surfactant emulsifiers on lipid oxidation

3.1.1. Oxygen uptake

Oxygen uptake in the emulsions incubated at 33 °C or at 25 °C with MetMb 1 μ M, AAPH 1 mM or FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M is presented in Fig. 1. Oxygen uptake was always the

slowest in the Tween 20-stabilized emulsions whereas it was always the fastest in the BLGstabilized emulsions. The BCN- and BSA-stabilized emulsions showed intermediate oxygen uptake rates and more various behaviors from one incubation condition to the other. The estimated lengths of the lag phase (L) and rates of oxygen uptake (μ) are given in Table 1.

At 33 °C without oxidation catalyst (Fig. 1A), oxygen uptake started almost immediately in the BLG-stabilized emulsion (L = 2.3 h) and after around 12 h in the BCN-stabilized emulsion. Oxygen uptake developed then rapidly (8.0 and 9.2 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹, respectively) until a plateau corresponding to around 134 mmol O₂ kg⁻¹ oil. In contrast, oxygen uptake was much slower in the BSA- and Tween 20-stabilized emulsions, with a long lag phase (*L* around 45 h) and a rate of oxygen uptake of around 3 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹.

At 25 °C in the presence of 1 μ M MetMb (Fig. 1B), BLG- and BCN-stabilized emulsions were also the most oxidizable, with short lag phases (1.7 and 3.4 h, respectively) and rates of oxygen uptake of around 5 mmol O2 kg⁻¹ oil h⁻¹. On the contrary, BSA- and Tween 20-stabilized emulsions had longer lag phases (8.2 and 5.6 h, respectively) and lower rates of oxygen uptake (around 2 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹).

At 25 °C in the presence of 1 mM AAPH (Fig. 1C), the lag phase increased from 4.9 h to 34.1 h in the order BLG < BCN < BSA < Tween 20. The rate of oxygen uptake was around 5 mmol O2 kg-1 oil h-1 for the BLG- and BCN-stabilized emulsions, and around 3 mmol O_2 kg⁻¹ oil h⁻¹ for the BSA- and Tween 20-stabilized emulsions.

Finally, at 25 °C with FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M (Fig. 1D), the three protein-stabilized emulsions oxidized rapidly from the beginning of the incubation period (*L* comprised between 3.7 and 5.9 h) with a rate of oxygen uptake around 5 to 6 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹. The Tween 20-stabilized emulsion was by far the most oxidatively stable emulsion in this incubation condition, with a 30-h lag phase and a slow rate of oxygen uptake (2.2 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹).

By comparison, when the emulsions were incubated at 25 °C with FeSO₄/EDTA, the proteinstabilized emulsions were the most oxidizable in the order: BLG (L = 3.3 h, $\mu = 6.1$ mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹) < BSA (L = 14 h, $\mu = 4.8$ mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹) < BCN (L = 15 h, $\mu = 3.3$ mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹) (Berton et al., 2011b). The Tween 20-stabilized emulsion was the most oxidatively stable emulsion with a 36-h lag phase.

Thus, these results obtained by increasing the temperature or by adding FeCl₃/Na-asc, MetMb or AAPH confirm globally the results of our previous study showing that Tween 20-stabilized emulsions prepared with limited amounts of emulsifier and incubated at 25 °C with FeSO₄/EDTA (1/1 M/M 200 μ M) are more oxidatively stable than protein-stabilized emulsions (Berton et al., 2011b). The results also evidence that, depending on the incubation



conditions and initiators, BCN and more particularly BSA may have different effects on the oxidation kinetics.

Fig. 1. Oxygen uptake during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM or (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M. Dotted curves correspond to the modified Gompertz equation with the estimated *L* and μ parameters for each emulsion. Errors bars represent standard deviations.

Table 1

Lag phases (*L*) and rates of oxygen uptake (μ) for the emulsions incubated in various conditions. Asymptote confidence intervals for *L* and μ values were calculated with a 95% significance level. Correlation coefficients (R²) indicate the percentage of dispersion explained by the adjusted model. t_{1/2} values are incubation times when half the maximum oxygen uptake was reached.

Emulsifier	Initiator	Incubation temperature	<i>L</i> (h)	$\mu \pmod{O_2}$ kg ⁻¹ oil h ⁻¹)	R²	t _{1/2} (h)
BLG	_	33 °C	2.3 ± 0.3	1000000000000000000000000000000000000	99.3	12.1
BLG	MetMb	25 °C	1.7 ± 0.9	4.6 ± 0.2	97.9	18.7
BLG	AAPH	25 °C	4.9 ± 1.0	5.1 ± 0.3	97.7	20.2
BLG	FeAsc	25 °C	3.7 ± 0.8	6.2 ± 0.4	98.0	16.5
BLG	FeEDTA	25 °C	$3.3 \pm 0.4*$	$6.1 \pm 0.2*$	98.3*	16.3*
BSA	-	33 °C	44.4 ± 1.5	3.4 ± 0.3	91.1	67.2
BSA	MetMb	25 °C	8.2 ± 1.4	2.1 ± 0.1	96.6	45.8
BSA	AAPH	25 °C	24.4 ± 1.5	3.0 ± 0.2	95.8	50.3
BSA	FeAsc	25 °C	5.6 ± 0.6	5.3 ± 0.2	99.0	20.4
BSA	FeEDTA	25 °C	$14.0\pm0.8*$	$4.8 \pm 0.3*$	97.1*	30.2*
BCN	-	33 °C	12.4 ± 0.5	9.2 ± 0.5	99.2	20.9
BCN	MetMb	25 °C	3.4 ± 0.6	5.6 ± 0.2	98.9	17.3
BCN	AAPH	25 °C	12.3 ± 0.6	5.8 ± 0.3	98.9	25.9
BCN	FeAsc	25 °C	5.9 ± 0.7	5.4 ± 0.2	98.9	20.4
BCN	FeEDTA	25 °C	$15.0\pm0.8*$	$3.3 \pm 0.1*$	96.9*	39.0*
Tween 20	-	33 °C	45.9 ± 0.7	3.0 ± 0.1	97.9	72.1
Tween 20	MetMb	25 °C	5.6 ± 1.2	1.7 ± 0.1	97.7	50.5
Tween 20	AAPH	25 °C	34.1 ± 1.3	3.4 ± 0.3	97.5	57.1
Tween 20	FeAsc	25 °C	30.4 ± 1.4	2.2 ± 0.1	96.6	65.8
Tween 20	FeEDTA	25 °C	$36.3 \pm 1.8^{*}$	$3.6 \pm 0.4*$	92.0*	58.1*

* Data from Berton et al. (2011b).

3.1.2. Volatile compounds

The formation of volatile compounds was followed for all emulsions in all incubation conditions. Eighteen volatile compounds have been identified. Among them, pentane, propanal, 2-butenal, hexanal, 2-pentenal, 2,4-hexadienal, 2-heptenal and 2-octenal have been detected in measurable amounts and quantified during the development of oxidation in emulsions. The amounts of volatile compounds produced in each incubation condition are reported in the figures provided in the supplementary data section. Briefly, propanal was formed in the highest amounts (up to around 900 μ mol kg⁻¹ oil when the emulsions were stored at 33° C and around 400 μ mol kg⁻¹ in the other conditions). Then came hexanal (250 μ mol kg⁻¹), 2-pentenal and 2-heptenal (around 100 μ mol kg⁻¹), 2-butenal (70 μ mol kg⁻¹), 2,4-hexadienal (60 μ mol kg⁻¹) and 2-octenal (30-50 μ mol kg⁻¹, with large fluctuations in the

formation kinetics). Pentane was detected in the lowest amounts among the quantified volatiles: maximum amounts were around 30 μ mol kg⁻¹ at 33 °C, but it was often produced in much lower amounts in the other incubation conditions. At an advanced stage of oxidation in the emulsions, the volatiles, 2-octenal excepted, were produced in higher amounts at 33 °C as compared to the other incubation conditions.

BLG- and BCN-stabilized emulsions also generally produced the highest amounts of volatiles when one particular incubation condition was considered. On the opposite, the lowest amounts of volatiles were generally produced in Tween 20-stabilized emulsions. In BSA-stabilized emulsions, intermediate amounts of volatiles were produced according to the incubation conditions. At 25 °C in the presence of FeCl₃/Na-asc, the amounts of volatiles produced in BSA-stabilized emulsions were close to the amounts produced with the two other proteins and higher than the amounts produced in Tween 20-stabilized emulsions. In the other incubation conditions, they were similar to those produced in Tween 20-stabilized emulsions. Propanal, hexanal and 2-pentenal at 33 °C; 2-butenal at 25 °C in the presence of MetMb were even produced in the lowest amounts in the BSA-stabilized emulsions.

The formation of volatile compounds issued from lipid oxidation globally confirms the oxygen uptake data and the fact that, in conditions avoiding a large excess of emulsifier in the aqueous phase, protein-stabilized emulsions are overall less oxidatively stable than Tween 20-stabilized emulsions. They also evidence that in specific conditions some discrepancy may occur between oxygen uptake and formation of some lipid oxidation volatile compounds. It was especially the case for BSA-stabilized emulsions.

Through a principal component analysis (PCA) performed on normalized data, we tried to observe the relationships between oxygen uptake and volatile compound formation in each incubation condition. The correlation plot in the two first components of the PCA (PC score #1, 71.3 % of the total inertia of the system ; PCA#2: 11.5 % of the total inertia of the system.) is presented in Fig. 2 and the corresponding correlation coefficients are given in Table 2. All the studied parameters are gathered in the same area of the PC#1,#2 plot and mostly represented by the first component. The plot of individual data also showed that these parameters were strongly linked to the duration of the incubation of the emulsions (not shown). This suggests that the measured parameters were well related to the same phenomenon that proceeded during the emulsion incubation: the oxidation of the lipid components in the emulsions.

Oxygen uptake was closely correlated with the formation 2-butenal, 2-pentenal and 2-heptenal (correlation coefficients > 0.8). The correlation of oxygen uptake with the formation

of propanal, hexanal and 2,4-hexadienal was slightly weaker, correlation coefficients being 0.71, 0.75 and 0.69, respectively. It was low with the formation of pentane, and 2-octenal (correlation coefficients around 0.50). As highlighted by the correlation plot and the correlation coefficients, volatile compounds partitioned in three groups. The saturated aldehydes, propanal and hexanal were strongly correlated together (correlation coefficient of 0.92) but did not correlate strongly with any of the other volatile compounds. The monounsaturated aldehydes 2-butenal, 2-pentenal and 2-heptenal were well correlated with oxygen uptake and together (correlation coefficients > 0.9). They were also correlated in a lesser extent with the di-unsaturated aldehyde 2,4-hexadienal (correlation coefficients of 0.80, 0.79, 0.78). In contrast, pentane and 2-octenal were not well correlated with any of the other measured parameters. These compounds were produced in much lower molecular amounts than the other volatile compounds and in the limits for their accurate quantification by the SPME-GC method. One may underline that among the quantified volatile compounds, the correlations were the highest among either the saturated or the unsaturated aldehydes, but no particular correlation was found for volatiles arising from the same fatty acid series: n-3 or n-6.

The projection of the individual data on the PC#1, #2 of the PCA map did not evidence any clustering of the samples according to the incubation mode or the emulsifier (not shown). Therefore, even if quantitative differences in the production of volatile compounds could be found, the global proportions of volatiles in the headspace remained similar whatever the system. This could indicate that the interactions which are likely to occur between selected volatile compounds such as aldehydes and protein emulsifiers were quantitatively minor and that specific reaction routes for formation of volatile compounds data confirm the oxygen uptake data, evidencing that adsorbed proteins emulsifier do not protect lipids against oxidation as compared to surfactant emulsifier, whatever the incubation conditions. Our results also show that the measurement of oxygen uptake is a reliable method to evaluate lipid oxidation in emulsions.



Fig. 2. PCA of the data (oxygen uptake and volatile compounds). Correlation plot of PC scores #1 and #2. The dotted circle indicates the level of 50% explained variance.

Table 2

Correlation matrix of the data (oxygen uptake and volatile compounds) for all emulsions incubated in all incubation conditions. Correlation coefficients ≥ 0.80 are indicated in bold to underline the highest correlations.

	0 untaka	Dentane	Propagal	2 hutanal	2-	Hovenel	2,4-hexa	2-	2 octanal
	O_2 uptake	rentane	Fiopaliai	2-Dutenai	pentenal	Пехана	dienal	heptenal	2-Octeniai
O2 uptake	1.00								
Pentane	0.51	1.00							
Propanal	0.71	0.39	1.00						
2-butenal	0.83	0.48	0.74	1.00					
2- pentenal	0.87	0.52	0.76	0.97	1.00				
Hexanal	0.75	0.39	0.92	0.77	0.76	1.00			
2,4-hexa dienal	0.69	0.59	0.67	0.80	0.79	0.71	1.00		
2- heptenal	0.85	0.51	0.60	0.95	0.94	0.67	0.78	1.00	
2-octenal	0.46	0.43	0.28	0.56	0.53	0.30	0.73	0.59	1.00

3.2. Efficiency and mechanisms of the different oxidation initiators in emulsions

The incubation conditions, namely temperature and initiator concentrations, were chosen to obtain a similar order of oxidative stability for the Tween 20-stabilized emulsions, as evidenced by the $t_{1/2}$ varying from 50.5 to 72 h (Table 1). The molar amount of FeSO₄/EDTA was four times higher than that of FeCl₃/Na-asc (200 µM and 50 µM, respectively), which was itself 50 times higher than that of MetMb (1 µM). The highest concentration was used for AAPH (1 mM). These highly different concentrations demonstrate a large range of oxidation efficiencies for the different catalysts, which is in accordance with the literature. For instance, myoglobin was found 14 times more efficient than Fe³⁺/ascorbate and 80 times more efficient than Fe²⁺ to decompose linoleic acid hydroperoxides at neutral pH (Frankel, 2005). Haem iron is known for its very efficient prooxidant properties in aqueous or multiphase media (Pokorny, 1987). It is also a main prooxidant in the diet through the consumption of meat products. Addition of MetMb can be therefore a very interesting way to promote lipid oxidation in multiphase food model systems without huge modifications of the molar chemical composition of the systems. On the opposite, the molar amount of AAPH (1 mM) used to obtain similar oxidation kinetics in the Tween 20-stabilized emulsion was high in comparison to the emulsifier concentration (4 mM). This oxidation catalyst can thus hardly represent phenomena occurring in food or biological systems because of the high concentrations needed. However, AAPH remains useful to measure reaction rate constants in model systems because it produces radicals at constant rates.

Interestingly, oxidation in Tween 20-stabilized emulsions proceeded in different ways according to the incubation conditions, as evidenced from *L* and μ values calculated from the oxygen uptake data (Table 1). The catalysis by MetMb led to short lag phases and quite slow oxygen uptake rates. On the opposite, the four other incubation conditions led to longer lag phases and higher rates of oxygen uptake, and distinguished from each other particularly by the length of the lag phase (from 30.4 to 45.9 h). These differences can be related to the various mechanisms of lipid oxidation initiation encountered for the tested initiators (Table 3). In the presence of MetMb (1 μ M), the oxidation kinetic differed clearly from the others. The lag phase was much shorter, i.e. the oxidation started earlier, but the oxygen uptake rate was lower than in the other incubation conditions (Table 1). The most probable explanation for this short lag phase is the presence of trace hydroperoxides in the freshly prepared emulsions, which would be rapidly decomposed by MetMb (eq. 5) (Baron & Andersen, 2002; Carlsen et al., 2005). Accordingly, we determined that the stripped rapeseed oil contained about 0.34

 μ mol hydroperoxides g⁻¹. Lorrain et al. (Lorrain et al., 2010a) proposed that the decomposition of hydroperoxides catalyzed by MetMb would involve a one-electron oxidized MetMb intermediate (eq. 6). In addition, MetMb is an amphiphilic molecule which, contrary to the other tested initiators, exhibits surface activity (Min et al., 1998), and is able to adsorb at the interface of O/W emulsions (Volden et al., 2011). It can be then hypothesized that MetMb adsorbs at the surface of the oil droplets after emulsification, which could contribute to its greater efficiency as oxidation initiator.

In the absence of added oxidation catalysts, lipid oxidation presumably starts either by the direct formation of radicals from lipid molecules or by the decomposition of trace hydroperoxides in the oil substrate by trace metal ions (Frankel, 2005). This second mechanism may apply during the incubation at 33 °C as the stripped rapeseed oil contained 0.34 μ mol hydroperoxides g⁻¹. These reactions are favored when temperature increases, which explains why this factor is often encountered to accelerate lipid oxidation. At this temperature, the decomposition of the hydroperoxides that are formed during incubation of the emulsions is also favored, which could explain why the amounts of volatile compounds were often higher than with the other incubation conditions.

In the presence of FeSO₄/EDTA (1/1 M/M 200 μ M) or FeCl₃/Na-asc (1/1 M/M 50 μ M), the kinetics of oxygen uptake in the Tween 20-stabilized emulsions were very similar. Mixtures of iron with chelator or reductant in appropriate concentrations lead to the concomitant presence of ferrous (Fe²⁺) and ferric (Fe³⁺) iron, which is necessary to initiate lipid peroxidation (Table 3). An equimolar mixture of Fe²⁺ and EDTA promotes both Fe²⁺ autoxidation (eq. 1) and lipid peroxidation (Samokyszyn et al., 1990), which is explained by the ability of the iron/EDTA complex to enhance the solubility and redox potential of iron (Mahoney & Graf, 1986). Ascorbate present in low enough concentrations behaves as prooxidant in the presence of iron because of its ability to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ (Table 3, eq. 2) (Buettner & Jurkiewicz, 1996; Halliwell, 1996). Fe²⁺ decomposes trace hydroperoxides, leading to lipid radicals which can themselves abstract hydrogen atoms from other lipid molecules (Table 3, eq. 3), propagating the chain reaction (Cheng & Li, 2007). Oxygen reactive species are also produced during these reactions. They are involved in the Fenton reaction, which is the most mentioned mechanism to explain the catalytic activity of iron (Table 3, eq. 4).

As already mentioned, high molar amount of AAPH (1 mM) had to be used to obtain oxidation kinetics in the Tween 20-stabilized emulsions similar to those observed in the other incubation conditions. Water-soluble azo initiators such as AAPH initiate lipid peroxidation

by decomposing with a constant rate into free radicals responsible for hydrogen abstraction from peroxidizable lipids (Table 3, eq. 7, 8, 9) and subsequent formation of hydroperoxides (Hanlon & Seybert, 1997). However, azo initiators are not involved in the decomposition of the hydroperoxides, which is another argument to explain why their use in food and biological model systems may be not relevant (Frankel, 2005).

Table 3

Mechanisms for the lipid oxidation reaction with various oxidation initiators: equimolar mixture of Fe^{2+} and EDTA; equimolar mixture of Fe^{3+} and Na-ascorbate; metmyoglobin; AAPH.

Incubation condition	Structure	Lipid oxidation mechanisms		
Fe ²⁺ /EDTA (equimolar mixture) (a)	Fe ²⁺	$O_2 + 4Fe^{2+}(EDTA) + 2H_2O \rightarrow$ 4Fe ³⁺ (EDTA) + 4OH ⁻ (1)	$LOOH + Fe^{2+} \rightarrow LO^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^{-}(3)$ $H_{2}O_{2} + Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + Fe^{3+} + OH^{-}(4)$ $LH \qquad \qquad LOO^{\bullet}$ $H \text{ abstraction}$ $LH \qquad LOO^{\bullet}$ LOO^{\bullet} $LH \qquad LOO^{\bullet}$ LOO^{\bullet} $LO^$	
Fe ³⁺ /ascorbate (equimolar mixture) (b)	но он Fe ³⁺ он	$Fe^{3+} + ascorbate \rightarrow Fe^{2+} + ascorbate^{\bullet} (2)$ $HO \qquad \qquad$	LOOH Fe ²⁺ LO ⁺ (C)	
Metmyoglobine (MetMb) (d)	OH ₂ Fe ³⁺ Heme N Proximal histidine Globin	LOOH heme-Fe(IV)=O	$(III) \qquad \downarrow LOO' + H_2O \\ LOOH + H^+ (5) \\ \downarrow LOOH + H^- (5) \\ \downarrow I) \qquad [heme-Fe(III) - 1e^-] \\ \downarrow LOOH \\ LOO' \qquad (6)$	
AAPH (e)	HN H ₂ N H ₂ N H ₂ N H ₂ N H ₂	R-N=N-R R• + O ROO• + L-H	$\begin{array}{l} 2 \rightarrow 2 \ \mathbb{R}^{\bullet} + \mathbb{N}_{2} \ (7) \\ _{2} \rightarrow \mathrm{ROO}^{\bullet} \ (8) \\ \mathbb{I} \rightarrow \mathrm{ROOH} + \mathbb{L}^{\bullet} \ (9) \end{array}$	

a (Bernasconi & Baerends, 2009; Gambardella et al., 2005)

b (Buettner et al., 1996; Halliwell, 1996)

c (Cheng et al., 2007; Frankel, 2005)

d (Baron et al., 2002; Carlsen et al., 2005; Lorrain et al., 2010a)

e (Hanlon et al., 1997)

3.3. Involvement of interfacial structure and emulsifier-initiator interrelationships in lipid oxidation

We found that in emulsions prepared with limited amounts of emulsifier in the aqueous phase, protein-stabilized emulsions were generally less oxidatively stable than Tween 20-stabilized emulsions. We showed in previous work that other surfactants, namely Tween 80 and Citrem, formed emulsions with a similar or even higher oxidative stability than Tween 20-stabilized emulsions in the presence of FeSO₄/EDTA (Berton et al., 2011b). The favored oxidation when oil droplets are covered by protein-stabilized interfaces as compard to surfactantstabilized interfaces could result, at least in part, from the structures and physical properties of the involved interfaces. On the one hand, our results apparently contradict the hypothesis for a structural barrier provided by interfacial proteins, which is supported by several information related to the composition and the structure of the interfacial layer. Typical surface loads encountered for protein-stabilized interfaces range from 1.5 to 4.5 mg m⁻², depending on the protein type and the pH (Atkinson et al., 1995; Bos & van Vliet, 2001) while surface loads are lower for surfactant-stabilized interfaces, i.e. 1-2 mg m⁻² (Bos & van Vliet, 2001). Additionally, the interface thicknesses of surfactant-stabilized emulsions are much thinner than in protein-stabilized emulsions. They vary from 0.5-1 nm for surfactant-stabilized interfaces to 1-15 nm for protein emulsifiers (Atkinson et al., 1995; Dalgleish, 1993; Dickinson, 2009; Fang & Dalgleish, 1993; Singh, 2011). Proteins form immobile and viscoelastic interfacial films (Damodaran, 2004; Dickinson, 1992; Murray & Dickinson, 1996; Wilde et al., 2004), whereas surfactants form fluid interfaces with a substantial surface lateral diffusion coefficient (Mackie et al., 2007; Wilde et al., 2004). The relatively thick and viscoelastic interfaces formed by proteins around lipid droplets were accordingly suggested to be at least partly responsible for the highest oxidative stability of protein-stabilized emulsions as compared to surfactant-stabilized emulsions (Donnelly et al., 1998; Fomuso et al., 2002a; Haahr & Jacobsen, 2008; Kiokias et al., 2006; McClements & Decker, 2000). However, it should be underlined that in most of these studies, the emulsions were formulated with large amounts of unadsorbed emulsifiers. The gas permeability of emulsifier films at the air/water interface has been also shown to be higher for Tween 80 than for whey protein isolate (WPI) (Bezelgues et al., 2008). This effect was confirmed by investigations in O/W emulsions, showing that the oxygen diffusion coefficient at the oil/water interface was higher for SDSstabilized emulsions than for WPI-stabilized emulsions, indicating a higher gas permeability of the surfactant-stabilized interface (Tikekar et al., 2011).

On the other hand, in agreement with our observations, the ability of surfactants to exhibit better barrier properties than proteins is supported by several data. First, surfactant molecules possess similar alkyl chains that interact between each other by means of Van der Waals interactions and therefore form an homogeneous layer. They are consequently tightly packed at the oil/water interface, which is particularly marked for polyoxyethylene sorbitan esters as Tween 20 (Grigoriev & Miller, 2009; Wilde et al., 2004). It results that nearly 100% of the interface is covered with surfactants. On the opposite, only 30-40% are actually covered with proteins because only a part of the polypeptidic chain is actually in direct contact with the oil/water interface, the other protein segments being located in the aqueous phase (Dickinson, 1992).

Our results were obtained with emulsions stabilized with the minimum amount of emulsifiers, which amplifies the contribution of the interface as compared to previous studies. We hypothesize that the close-packed, compact and homogeneous structure of surfactant-stabilized interfaces could contribute to explain the better oxidative stability of the Tween 20-stabilized emulsions as compared to the protein-stabilized ones. Nevertheless, the various oxidative behaviors observed in BCN- and BSA-stabilized emulsions indicate that chemical interrelationships between emulsifiers and initiators are also involved.

To have a clearer outlook of the interrelated effects between catalysts and emulsifiers on lipid oxidation, we reported the estimated oxygen uptake rates *versus* the estimated lag phases for all emulsions under all incubation conditions (Fig. 3). A first look at Fig. 3 with a special emphasis on the incubation conditions enables to underline that the emulsions incubated in the presence of MetMb are gathered in the same region characterized by an early beginning of oxygen uptake. This confirms a rapid initiation of oxidation by this initiator, probably primarily due to its high efficiency to decompose trace hydroperoxides and its surface activity, as already mentioned. In contrast, the other incubation conditions were more dispersed according to the emulsifier, evidencing interrelationships between the emulsifier and the initiator led to two opposite behaviors: either the highest rates of oxygen uptake with short lag phases (BLG- and BCN-stabilized emulsions) or low rates of oxygen uptake with the longest lag phases (BSA- and Tween 20-stabilized emulsions). In the presence of AAPH, oxidation behaviors of emulsions were distinguished mainly by their lag phase, in the increasing order: BLG < BCN < BSA < Tween 20.

When looking at Fig. 3 with a special emphasis on the emulsifiers, it allows to highlight the effect of the incubation conditions on the oxidation kinetics. In BLG-stabilized emulsions, the

oxidation kinetics were very close whatever the incubation conditions and characterized by short lag phases and high rates of oxygen uptake (Table 1). The emulsions were consequently gathered in the same region of Fig. 3 and exhibited systematically the worse oxidative stability. In BCN-stabilized emulsions, the lag phases were longer than in BLG-stabilized ones and the oxygen uptake rates were very close, except with FeSO₄/EDTA. In BSA-stabilized emulsions, the lag phases spanned over a large range whereas the oxygen uptake rates varied moderately. Therefore, according to the incubation conditions, the order of oxidative stability can be reversed between BSA- and BCN-stabilized emulsions. In addition, volatile compounds were produced in higher amounts in BCN-stabilized emulsions than with the other emulsifiers. By contrast, the lowest amounts of volatiles compounds were produced in the BSA-stabilized emulsions as compared to the other emulsifiers, Tween 20 included, when the emulsions were incubated at 33°C.

In our previous study (Berton et al., 2011b), we hypothesized that the better protection against oxidation in BCN-stabilized emulsions probably resulted from the more important surface concentration of BCN at the interface of oil droplets. As the ranking of the protein emulsifiers differed when modifying the incubation conditions of the emulsions, the surface concentration of proteins is not the only parameter explaining the sensitivity of emulsified lipids to oxidation.

The surface charge is often invoked to explain some differences in the oxidative stability of emulsions. In our emulsions prepared at pH 6.7, the Zeta potential for the BLG-, BCN- and BSA stabilized droplets was -54.5, -46.5 and -29.8 mV, respectively (Berton et al., 2011b). As the isoelectric point of MetMb is around 7.3 and amidinium moieties of AAPH exhibit a pKa > 12 (Hanlon & Seybert, 1997), these compounds are positively charged at pH 6.7, as well as Fe^{2+} and Fe^{3+} ions. The more negative charges of the BLG- and BCN-stabilized droplets may help the positively charged initiators to locate at the interface, promoting oxidation more efficiently as assumed by several authors (Donnelly et al., 1998; Mei et al., 1998a; Mei et al., 1998b). This explanation correlates well with the worst oxidative stability of the BLG- and BCN-stabilized emulsions when incubated with MetMb or AAPH. If trace metals were involved in the lipid oxidation initiation at 33 °C without initiator, the droplet charge could also explain the better oxidative stability of the BSA-stabilized emulsion as compared to the other protein-stabilized emulsions in this incubation condition. However, the order of Zeta potential did not correlate with the order of oxidative stability in the presence of FeSO₄/EDTA (1/1 M/M 200 µM) or FeCl₃/Na-asc (1/1 M/M 50 µM). In the latter condition, the three protein-stabilized emulsions exhibited similar oxidative stabilities. Moreover, the

surface charge cannot explain the similar oxidation kinetics of the emulsions stabilized by BSA or by the non-ionic surfactant Tween-20 when they were incubated at 33 °C or at 25 °C in the presence of MetMb. The surface charge of the droplets is therefore not the only factor controlling the oxidative stability of emulsions.

The three proteins used in this work exhibit various metal chelating and free radical scavenging properties. Casein exhibits better iron-binding properties as compared with BSA, whey protein isolate or pure BLG (Faraji et al., 2004; Sugiarto et al., 2010; Villière et al., 2005). Casein also exhibits higher free radical scavenging properties than BLG (Clausen et al., 2009) and than BSA (Villière et al., 2005). The order of both iron-binding and radical scavenging properties is then: BLG, BSA < BCN. This order does not correspond to the order of oxidative stability of emulsions in most tested incubation conditions, BSA-stabilized emulsions being often the most stable among the protein-stabilized emulsions. One should therefore conclude that the order of oxidative stability of the protein-stabilized emulsions cannot be explained by one single factor, but rather by a combination of the protein properties associated with their chemical environment, including the oxidation initiators.



Fig. 3. Relationship between lag phases and oxygen uptake rates for emulsions stabilized with (\triangle) BLG, (\diamondsuit) BSA, (\Box) BCN or (\bullet) Tween 20 in various incubation conditions. Errors bars correspond to the asymptote confidence intervals calculated with a 95% significance level.

4. Conclusions

This study demonstrates that protein-stabilized emulsions are generally less oxidatively stable than Tween 20-stabilized emulsions, whatever the incubation conditions and the oxidation initiator. The generalization of this study to other surfactants than Tween 20 could be relevant to go further in the mechanisms which could be involved in the protective effect of surfactantstabilized interfaces. This work also shows that, in the particular case of the BSA-stabilized emulsion, the oxidative stability can be dramatically dependent on the incubation conditions. These results may therefore explain, at least in part, the contradictory results sometimes encountered when synthesizing the literature about the effect of compositional parameters on lipid oxidation in emulsions.

Acknowledgements

We thank Q. Pottiez for his help in emulsion preparation and lipid oxidation measurements. The financing of this work and Ph-D grant of C. Berton by INRA and Région Pays de la Loire are gratefully acknowledged.



Supplementary data - Particle size distributions in emulsions

Particle size distributions in emulsions stabilized with BLG (A), BCN (B), BSA (C) or Tween 20 (D), freshly prepared (\blacklozenge) or after 48 h of incubation at 33 °C without catalyst (\Box) or at 25 °C with MetMb 1 μ M (\triangle), AAPH 1 mM (+) or FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M (O). Data indicated in the tables correspond to the volume-surface mean diameter ([d_{3,2}], μ m) at t = 0 or after 48 h of incubation determined from two emulsions prepared and incubated independently.



Supplementary data – Volatile compound formation

Formation of **propanal** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.



Formation of **hexanal** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.



Formation of **pentane** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.



Formation of **2-butenal** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.



Formation of **2-pentenal** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.



Formation of **2,4-hexadienal** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.



Formation of **2-heptenal** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.



Formation of **2-octenal** during incubation of emulsions stabilized with BLG (\triangle), BSA (\diamond), BCN (\Box) or Tween 20 (\bullet), at pH 6.7 at (A) 33 °C without catalyst or at 25 °C with (B) MetMb 1 μ M, (C) AAPH 1 mM, (D) FeCl₃/Na-asc 1/1 M/M 50 μ M or (E) FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.

2.3.2. Discussion relative au choix des conditions d'incubation

Ce travail montre que le choix des conditions d'incubation des émulsions n'est pas anodin, et notamment que des interactions complexes entre certains des constituants du système et les initiateurs chimiques peuvent s'établir. Lors des études de l'oxydation des lipides en émulsion, le choix des conditions d'incubation doit être réfléchi en fonction du contexte et de de la problématique de recherche. Ainsi, les conditions choisies seront différentes selon que l'on souhaite étudier l'oxydation des lipides en milieu digestif ou physiologique, dans des matrices alimentaires contenant des ions métalliques, en reproduisant des procédés de stockage ou de transformation, ou dans une problématique de modélisation chimique et/ou mathématique du phénomène. Un autre critère déterminant le choix de l'initiateur d'oxydation à utiliser peut également être lié aux rapports molaires entre émulsifiants et initiateurs. Dans les émulsions stabilisées par des protéines et incubées en présence des initiateurs FeSO₄/EDTA (200 µM) et AAPH (1 mM), le nombre de moles d'initiateur dans l'émulsion est supérieur au nombre de moles d'émulsifiant (Tableau X), ce qui implique une modification conséquente de la composition chimique des systèmes. A l'inverse, lorsque la MetMb (1 µM) est utilisée comme initiateur d'oxydation, sa molarité est très inférieure à celle des émulsifiants, pour une efficacité pro-oxydante du même ordre de grandeur que celle obtenue avec les autres initiateurs.

Tableau X. Ratios molaires entre émulsifiants et initiateurs dans les différents systèmes
étudiés. Les concentrations sont exprimées en mmol ou µmol par litre d'émulsion. Les cases
grisées correspondent aux systèmes dans lesquels le nombre de moles d'initiateur est
supérieur au nombre de moles d'émulsifiant.

Emulsifiant Initiateur	BLG (190 μM)	SAB (42 µM)	BCN (146 µM)	Tween 20 (2,85 mM)
FeSO ₄ /EDTA (200 µM)	0.95	0.21	0.73	14.3
FeCl ₃ /ascorbate (50 µM)	3.8	0.84	2.9	57
MetMb (1 µM)	190	42	146	2850
AAPH (1 mM)	0.19	0.042	0.15	2.9

3. Modifications des protéines dans les émulsions au cours de l'oxydation

3.1. Modifications des protéines interfaciales au cours de l'oxydation d'émulsions huile dans eau (Article 4)

Modifications of interfacial proteins in oil-in-water emulsions prior to and during lipid oxidation

Soumis à Free Radical Biology and Medicine

Claire Berton, Marie-Hélène Ropers, Dominique Guibert, Véronique Solé and Claude Genot*

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 NANTES, France

ABSTRACT

Lipid oxidation is a major cause for the degradation of biological systems and food matrices. These complex multiphase systems contain various components other than lipids, which can also undergo chemical modifications. However, the imbricated relationships between lipid and protein oxidation remain unclear. The objective of this work was to analyze separately the modifications undergone by the interfacial or the unadsorbed proteins in oil-in-water emulsions, while investigating the kinetic aspect of the mechanisms, i.e. the sequence of the reactions leading to lipid oxidation and protein modifications. A coupled approach of protein modifications and lipid oxidation in protein-stabilized oil-in-water emulsions was carried out, through the measurement of tryptophan (Trp) fluorescence and oxygen uptake, respectively. Estimated kinetic parameters demonstrated that protein modifications occurred as an early event in the sequence of the reactions. Then the reactions of oxidized lipids and proteins led to a loss of protein solubility, to protein aggregation and carbonylation. These modifications concerned more specifically the proteins adsorbed at the oil/water interface.

Keywords

Lipid oxidation; Protein modification; Emulsion; Interface; Aqueous phase; Reaction sequence; Front-surface fluorescence; Carbonyls.

Introduction

Oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is a chemical reaction which has a deleterious influence on biological and food systems. The reaction decreases the nutritional and sensory properties of food products (Frankel, 2005). It also contributes in a great extent to the oxidative stress in vivo (Logani & Davies, 1980; Vigo-Pelfrey, 1990). In these complex and multi-component systems, proteins participate with phospholipids, polar lipids and cholesterol in the stabilization of biological structures, for instance lipoproteins and biological membranes. Therefore, lipid oxidation generally occurs simultaneously with "co-oxidation" phenomena, which lead to the damage of other molecules such as proteins or lipophilic micronutrients (Schaich, 2008). Protein oxidation is not only involved in various human diseases (Hawkins & Davies, 2001) and aging (Levine & Stadtman, 2001), but also in the degradation of the sensory properties of food products such as texture (Schaich, 2008) and in the loss of protein digestibility (Zamora & Hidalgo, 2001). Oil-in-water (O/W) emulsions have been extensively used as model food systems to study the effect of compositional factors on their oxidative damage during processing or storage. In real food emulsions, the oil droplets are generally stabilized by proteins, used alone or mixed with smaller size surfactants, because these amphiphilic molecules adsorb at the oil/water interface and decrease the free energy of the systems. Unadsorbed proteins are also present in the aqueous phase of the dispersed systems. Since the 70's, it has been found that the proteins present in food emulsions are susceptible to be attacked by the free radicals, hydroperoxides and secondary products as aldehydes resulting from lipid oxidation, leading to the formation of various reaction products (Gardner, 1979; Genot et al., 1990; Karel et al., 1975). For the last ten years, the question of the oxidative modifications of proteins in food products and related food models has been identified as an emerging and even crucial subject. The prevailing question lies in the nutritional and toxicological consequences of protein modifications linked to lipid oxidation during food processing and storage (Schaich, 2008). These aspects have not been fully elucidated yet, nor the involved mechanisms.

Several authors observed a strong time relationship between lipid and protein oxidation in multiphase systems, and described the two phenomena as "correlated" (Dalsgaard et al., 2010), "concomitant" (Estévez et al., 2008) or "simultaneous" (Hidalgo & Zamora, 2002). In the same way, Lund et al. (2011) reported a timely coincidence between lipid and protein oxidation in muscle foods. It seems therefore obvious that lipid and protein oxidation are clearly linked but it is difficult to figure out which of the phenomena first starts. On the one

199

hand, protein light-induced oxidation increased with the proportion of PUFA in complex matrices (Mestdagh et al., 2011). The occurrence of a transfer of radicals from the lipids to the proteins was demonstrated during light-induced oxidation (Dalsgaard et al., 2010). On the other hand, Ostdal et al. (2002) highlighted that fatty acid oxidation could be induced by bovine serum albumin (BSA) radicals; Salminen et al. (2010) reported that amino acid residues of β -lactoglobulin (BLG) were oxidized prior to the propagation of lipid oxidation in O/W emulsion.

The location of proteins is another key element that has to be taken in account when looking at oxidation in multiphase systems. In O/W emulsions, proteins are either adsorbed at the interface surrounding the oil droplets, or remain unadsorbed in the aqueous phase once the interface is entirely covered. To our knowledge, few studies considered the question of the link between the protein location within multiphase systems and their degradation. Rampon et al. (2001) highlighted that during oxidation of BSA-stabilized O/W emulsions, unadsorbed BSA was by far less modified than BSA adsorbed onto the oil droplets, as revealed by front-surface fluorescence measurements.

Recently, we investigated the effect of pH, excess of protein in the aqueous phase and oxidation catalyst on lipid oxidation in protein-stabilized emulsions as compared to surfactant-stabilized emulsions (Berton et al., 2011b; Berton et al., in press). Tested proteins included BLG, β -casein (BCN) and BSA. The results highlighted first that when limited amounts of emulsifiers remained in the aqueous phase of emulsions, protein-stabilized emulsions were more prone to oxidation than surfactant-stabilized emulsions. Second, it was found that in the emulsions stabilized with the different proteins, lipid oxidation proceeded with various kinetic behaviors according to the incubation conditions. In the present study, we focus on the damage undergone by the proteins during oxidation of protein-stabilized O/W emulsions. Our objective was to analyze separately the modifications undergone by the interfacial or the unadsorbed proteins, while investigating the kinetic aspect of the mechanisms, i.e. the sequence the reactions leading to lipid oxidation and protein modifications. As in our previous work, the emulsions were stabilized with BLG, BCN or BSA, which exhibit different amino acid compositions, secondary and tertiary structures, emulsifying properties and interfacial behaviors.
Materials and methods

Materials

Rapeseed oil was purchased in a local supermarket. It was stripped by means of alumina (MP Alumina N-Super I, MP Biomedicals, France) to eliminate impurities and tocopherols (Berton et al., 2011a). Stripped oil contained less than 2 μ g residual tocopherols per g oil. BSA (fraction V, minimum 96% by agarose gel electrophoresis) was obtained from MP Biomedicals (France). BCN (purity \geq 98%) was purchased from Lactalis (France). β -lactoglobulin (BLG) has been purified at the laboratory from Prolacta 90 (Lactalis) by selective precipitation (Mailliart & Ribadeau-Dumas, 1988). 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES), ethylene diamine tetraacetic acid disodium calcium salt (EDTA), iron(II) sulfate (FeSO₄) were purchased from Sigma Aldrich (France). NaCl and SDS were purchased from Fluka Chemika (France). All other chemicals and solvents were at least of analytical grade and purchased from Sigma Aldrich (France) or Carlo Erba (France). The buffer was composed of PIPES (10 mM), NaCl (80 mM) and adjusted at pH 6.7.

Preparation and physical characterization of emulsions

O/W emulsions were prepared according to the procedure described by Berton et al. (2011a). The protein concentration and emulsification conditions had been adjusted to produce physically stable emulsions with concentrations of unadsorbed proteins as low as possible, with a volume-surface mean diameter ($[d_{3,2}]$) comprised between 1.4 and 2.2 µm (Berton et al., 2011a). Concentrations of proteins in aqueous solutions were 4 g l⁻¹ for BSA and 5 g l⁻¹ for BCN and BLG.

The day before emulsion preparation, proteins were dispersed in the pH 6.7 buffer and gently stirred overnight at 4 °C to ensure their complete solubilization without foam formation. O/W emulsions were prepared with 30 g oil and 70 g aqueous solution per 100 g emulsion. The two phases were premixed for 2 min at 15000 rpm using a rotor-stator homogenizer fitted with a 12-mm diameter head (Polytron PT 3000, Kinematica, Littau, Switzerland). The coarse emulsions were then homogenized (10 min, 50 bar) through a one-stage low-pressure valve homogenizer (A0812W-A-CD, Stansted Fluid Power, Stansted, UK). The size distribution of the oil droplets in the emulsions was measured immediately after homogenization and after 48

h of incubation with a laser light scattering instrument (Saturn 5200, Micromeritics, Verneuil en Halatte, France). Emulsions with excess protein (BLG-stabilized emulsion with excess BLG or BCN-stabilized emulsion with excess BCN) in the aqueous phase were prepared according to the following procedure: 30 g oil and 60 g aqueous protein solution (5.83 g l^{-1}) were homogenized as previously described. After homogenization, a volume of protein solution (35 g l^{-1}) was added to the emulsions to obtain a final proportion of 30 g oil per 100 g emulsion. The addition of the excess of protein *post* emulsification avoided the formation of very small oil droplets during the homogenization stage.

Recovery of aqueous and creamed phases of emulsions

The concentration of unadsorbed proteins in the aqueous phase at t_0 and after 48 hours of incubation was measured as previously described (Berton et al., 2011a). Briefly, aliquots of emulsions were centrifuged ($3500 \times g$, 45 min, 20 °C) to separate the aqueous phase from the oil droplets. The aqueous phase was collected and filtered through 0.45, 0.20 and 0.10 µm-cellulose acetate filters (Minisart High-Flow, Sartorius, Germany) to remove the residual small oil droplets. The amount of unadsorbed proteins was determined according to the method described by Markwell et al. (1978). Table 1 reminds the main characteristics of these systems (data from Berton et al., 2011b). The creamed phase was collected separately.

Table 1

Physical characteristics of O/W emulsions stabilized with different proteins. Emulsions contained 30 g stripped rapeseed oil and 70 g protein solution in pH 6.7 buffer (PIPES 10 mM, NaCl 80 mM). Data represent the mean and standard deviation of three measurements on three emulsions prepared independently (data from Berton et al., 2011b). Data at t = 48 h have been determined after 48 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.

Protein	Excess protein	Pr	[d ₂] at to		
		In aqueous solution (total)	In aqueous phase of emulsion at t_0	In aqueous phase of emulsion at $t = 48$ h	(μm)
BLG	-	5.00	1.52 ± 0.09	1.16 ± 0.14	1.5 ± 0.1
BLG	BLG	10.00	6.05 ± 0.10	5.77 ± 0.15	1.5 ± 0.1
BSA	-	4.00	1.17 ± 0.11	0.98 ± 0.03	1.8 ± 0.1
BCN	-	5.00	0.45 ± 0.12	0.99 ± 0.03	1.7 ± 0.1
BCN	BCN	10.00	3.60 ± 0.10	3.94 ± 0.17	1.9 ± 0.1

Incubation of emulsions

FeSO₄/EDTA catalyst was prepared in ultra-pure water as described in our previous work (Berton et al., 2011b) and added at a final concentration in emulsions of 200 μ M. The equivalent volume of ultra-pure water was added when emulsions were incubated at 33 °C. Aliquots (3 ml) of emulsions were distributed in 20.5-ml headspace vials sealed with Teflon/silicon septa and aluminium crimp caps. The vials were rotated in the dark at 5 rpm, with test tube rotators oriented at 30 degrees versus vertical position, either at 25 °C with FeSO₄/EDTA or at 33 °C without catalyst. Some experiments were also performed in the previously described incubation conditions (Berton et al., in press), namely at 25 °C in the presence of metmyoglobine (1 μ M), FeCl₃/sodium ascorbate (1/1, M/M, 50 μ M) or 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH) (1 mM).

Oxygen uptake in oxidizing O/W emulsions

The measurement of oxygen uptake in hermetically sealed vials is a relevant marker of lipid oxidation (Berton et al., 2011b; Lethuaut et al., 2002; Villière et al., 2005). It was determined as described by Villière et al. (2005) and Berton et al. (2011b). Gas chromatography (GC) analysis of headspace samples was performed with a HP 5890 - series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Böblingen, Germany) coupled to a fused silica plot column (Molsieve 5A CP7535, length 10 m, internal diameter 0.32 mm, Varian, Les Ulis, France) and to a thermal conductivity detector. Results were expressed in millimoles of consumed oxygen per kg oil (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ oil).

Front-surface fluorescence spectroscopy

The evolution of the fluorescence signal of proteins during incubation of emulsions was followed *in situ* in front-surface fluorescence mode (Castelain & Genot, 1994; Rampon et al., 2001). Front-surface fluorescence spectra were obtained with a Hitachi F-4500 spectrofluorometer (Tokyo, Japan) fitted with a variable angle front-surface accessory set at 56°. Excitation and emission slit widths were set at 5.0 nm and 2.5 nm, respectively. Approximately 140 μ l of sample (whole emulsion, aqueous phase or creamed phase) were put in a quartz cell with a 0.5-mm optical pathway (Hellma, 106 QS). Tryptophan (Trp) emission spectra were acquired between 290 and 350 nm, with an excitation wavelength set to 290 nm,

a scan speed of 240 nm min⁻¹ and steps of 0.2 nm. Experiments were performed in a controlled-temperature room (22 ± 3 °C). Results were expressed in signal intensity at 334 nm (I) normalized with the intensity at t₀ (I₀).

Extraction of proteins

Two hundred microliters of sample (whole emulsion, aqueous phase or creamed phase) were introduced in 2-ml Eppendorf tubes. The proteins were precipitated and washed twice by addition of 1800 μ l isopropanol. The tubes were shaken and centrifuged (14000×g, 5 min, 10 °C). The supernatants were discarded and the washed proteins were stored at –20 °C until further analysis.

Protein solubility and protein-bound carbonyls

Protein carbonyls were determined after their solubilization in guanidine chloride (GuCl) 6 M. Therefore, the solubility of proteins from whole emulsions, aqueous phase or creamed phase of emulsions was determined as follows: proteins recovered as described above were dispersed in 500 µl 2N HCl solution, for 60 min in the dark. Proteins were precipitated again with 500 µl of 400 g Γ^1 trichloroacetic acid solution for 10 minutes in ice. The tubes were centrifuged (14000×*g*, 5 min, 10 °C) and the supernatants were discarded. The pellets were washed twice with 1 ml ethanol/ethyl acetate 1/1 v/v, once with 1 ml isopropanol and dissolved in 1 ml guanidine chloride 6 M at 37 °C for 30 min to 12 h. The tubes were finally centrifuged (14000×*g*, 3 min, 10 °C) to eliminate the insoluble fraction, if any. The amount of GuCl 6 M-soluble proteins was determined in the supernatants using the bicinchoninic acid assay microtitration (BC Assay, (Smith et al., 1985)) coupled with calibration curves established with standard solutions for each protein (BLG, BCN or BSA). Results were expressed as percentage of soluble proteins as compared to the t₀ value.

Protein carbonyls were determined according to the procedure described by Levine et al. (1990). The method is based on the derivatization of carbonyls with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). Three test tubes were prepared for each sample. The protocol was this described above for the determination of protein solubility, except that total proteins were first dispersed in 500 μ l 10 mM DNPH solution in 2N HCl. The absorbance of the supernatants was measured at 370 nm, the control supernatants (without DNPH) being

used as blanks. The protein-bound carbonyl content was calculated using a molar absorption coefficient of 22000 M^{-1} cm⁻¹ (Levine et al., 1990). Results were expressed in µmol carbonyl per g soluble proteins.

Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed under either non-reducing or reducing conditions. Protein pellets obtained from isopropanol precipitation were dissolved in a pH 6.8-buffer constituted of Tris 0.5 M, SDS 10%, glycerol 30% and bromophenol blue. The volume of added buffer in each sample (whole emulsion, aqueous phase or creamed phase) was determined to obtain a theoretical concentration of 2 mg mL⁻¹ protein in the t_0 samples, as expected from the initial amounts of proteins used to prepare the emulsion samples. Eight percent β -mercaptoethanol were added when reducing conditions were applied. Samples were vortexed, incubated at room temperature for 1h30 and heated at 95 °C for 5 min. Then, either 10 µL of a molecular weight marker (Bio-Rad, range #161-0305) or 10 µL of protein solution were brought onto a 10%- (BSA) or 12%- (BLG, BCN) polyacrylamide gel coupled with a pH 8.3-migration buffer constituted of Tris 25 mM, glycine 192 mM and SDS 0.1%. Electrophoresis was performed at 20 mA and the gels were stained with a Coomassie blue solution. Destained gels were finally scanned. For each protein, electrophoresis characterization was performed in triplicate.

Molar balance of substrates and reaction products in oxidized emulsions

The molar balance between oxidation substrates (oxygen, PUFA) and oxidation products (conjugated dienes (CD), volatile compounds and protein carbonyls) was established in the BLG-stabilized emulsion after 30 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA (1/1, M/M, 200 μ M). The molar amount of PUFA in rapeseed oil and lipid phase extracted from the oxidized emulsion was determined with a protocol adapted from Christie (1989), previously described (Berton et al., 2011a). The molar amounts of CD and volatile compounds (propanal and hexanal) were measured as detailed in previous work (Berton et al., 2011b). Results were expressed in mmol per kg of emulsion (mmol kg⁻¹ emulsion).

Experimental design and data treatment

For each emulsifier and incubation condition, two emulsions were prepared independently. At each aging time, oxygen uptake was measured in 2 vials, with three headspace sampling per vial. Fluorescence spectra were collected in triplicate using three aliquots of each sample. Protein-bound carbonyls were measured with three test tubes and one control tube. The results correspond to the mean \pm standard deviation calculated from the collection of individual data obtained in two emulsions prepared independently.

Curves of Trp fluorescence at 334 nm were adjusted from the collection of individual data with a modified-Gompertz model. The applied equation was as follows:

$$Y_{1} = y_{0} - (y_{0} - A_{1}) \exp\left(-\exp\left(1 + \frac{\mu_{Trp} \exp(1) \times (L_{Trp} - t)}{y_{0} - A_{1}}\right)\right)$$
(1)

where Y_1 is the intensity of the signal of protein fluorescence at 334 nm normalized with the t_0 intensity (I / I₀), y_0 is the initial value of the normalized signal, namely $y_0 = 1$, t is the incubation time (h), A_1 is the threshold value of the normalized signal, μ_{Trp} is the rate of decrease of the normalized signal (h⁻¹) and L_{Trp} is the lag phase (h).

A nonlinear regression was applied to estimate *L* and μ with the Marquardt algorithm. The value of A_1 was comprised between 0.10 and 0.30. The initial estimates of L_{Trp} and μ_{Trp} were 0.1 and 0.1, respectively. Asymptote confidence intervals for *L* and μ values were calculated with a 95% significance level. These calculations were performed with Statgraphics Plus 5.1 software (StatPoint Technologies, Warrenton, USA).

The incubation time when half the minimum normalized intensity of protein fluorescence ($t_{1/2}$, T_{rp} , h) was calculated from equation (1) as follows:

$$t_{1/2, Trp} = L_{Trp} - \frac{\left(\ln \left(-\ln \frac{y_0 - (A_1/2)}{y_0 - A_1} \right) - 1 \right) \times (y_0 - A_1)}{\mu_{Trp} \times \exp(1)}$$
(2)

Curves of oxygen uptake were as well adjusted from the collection of individual data with a modified-Gompertz model as previously described (Berton et al, 2011b). This enabled us to estimate the lag period before the beginning of oxygen uptake (L_{O2} , h), the oxygen uptake rate (μ_{O2} , mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹) and the incubation time when half the maximum oxygen uptake was reached ($t_{1/2, O2}$, h).

Results

Fluorescence of Trp and oxygen uptake in the protein-stabilized emulsions

Evolution of Trp fluorescence and oxygen uptake were followed concomitantly during the incubation of emulsions (Fig. 1, 2). Fluorescence spectra recorded for an excitation wavelength of 290 nm are presented in Fig. 1A, B, C at three different times of incubation in the presence of FeSO₄/EDTA (t_0 , t = 24 h and t = 48 h) for the three protein-stabilized emulsions. For any emulsion, Trp fluorescence decreased sharply with time. At t = 48 h, the emission spectra presented no more peak corresponding to Trp fluorescence (Fig. 1A, B, C). We reported the intensity of the emission peak at 334 nm *versus* time and the corresponding oxygen uptake (Fig. 1D, E, F) for the emulsions stored at either 33 °C or at 25 °C with FeSO₄/EDTA. The experimental data were adjusted with the modified Gompertz equation to estimate the lag phase before the beginning of oxygen uptake (L_{O2}) or the decrease of the protein fluorescence signal (L_{Trp}), respectively, and the rate of oxygen uptake (μ_{O2}) or of the decrease of the protein fluorescence signal (μ_{Trp}), respectively (Table 2).

In the BLG-stabilized emulsions (Fig. 1D), the Trp fluorescence decreased rapidly from the beginning of the incubation period, as highlighted by estimated L_{Trp} values close to zero (Table 2). Fluorescence finally reached a plateau corresponding to less than 20% of the initial intensity. Half this threshold value was reached after 6.5 or 3.0 h, depending on the incubation conditions, as indicated by the $t_{1/2, \text{Trp}}$ values. Oxygen uptake also proceeded rapidly whatever the incubation conditions and reached a plateau corresponding to approximately 134 mmol O₂ kg⁻¹ oil, as already shown (Berton et al., 2011b). The lag phases estimated for oxygen uptake (L_{O2}) were rather short (3.3 and 2.3 h) but yet longer than those estimated for the curves of Trp fluorescence (0.2 and ~ 0 h).

In the BCN-stabilized emulsions (Fig. 1E), the Trp fluorescence decreased as well rapidly from the beginning of the incubation period, then reached a plateau corresponding to the total extinction of Trp fluorescence. Less than 10 h were necessary to reach half the minimum intensity of Trp fluorescence (Table 2). The estimated lag phases before the decrease of Trp fluorescence were short (1.0 and 3.2 h). Substantially longer lag phases (15.0 and 12.4 h) were observed for oxygen uptake in both incubation conditions, after what oxygen was rapidly consumed when incubation was performed at 33 °C ($\mu_{O2} = 9.2 \text{ mmol } O_2 \text{ kg}^{-1}$ oil), and

more slowly when incubation was performed at 25 °C with FeSO₄/EDTA (μ_{O2} = 3.3 mmol O₂ kg⁻¹ oil).

In the BSA-stabilized emulsions (Fig. 1F), the decrease of Trp fluorescence started from the beginning of the incubation period at 25 °C in the presence of FeSO₄/EDTA ($L_{Trp} \sim 0$), whereas a substantial lag phase (40.3 h) was estimated when incubation was performed at 33 °C (Table 2). According to the estimated parameters, half the minimum intensity of Trp fluorescence was reached after 12.9 or 47.9 h, respectively. In agreement with the decrease of protein fluorescence, oxygen was consumed substantially faster when incubation was performed at 25 °C with FeSO₄/EDTA than at 33 °C (Berton et al., in press). Estimated lag phases for oxygen uptake in each incubation conditions were 14.0 and 44.4 h, respectively. They were thus shorter than the corresponding lag phase estimated for Trp fluorescence. It is noticeable that although the estimated lag phase for oxygen uptake in the presence of FeSO₄/EDTA was 14.0 h, oxygen was apparently consumed in a small extent during the first hours of incubation (Fig. 1F).

When an excess of proteins was added in the aqueous phase of BLG- or BCN-stabilized emulsions (Fig. 2), no lag phase was still detected for Trp fluorescence (Table 2) but the decrease of Trp fluorescence was slowed down. Accordingly, the rates of decrease of Trp fluorescence (μ_{Trp}) were markedly lower ($3.7 \times 10^{-2} h^{-1}$ instead of $6.8 \times 10^{-2} h^{-1}$ for the BLG-stabilized emulsions, and $1.3 \times 10^{-2} h^{-1}$ instead of $5.8 \times 10^{-2} h^{-1}$ for the BCN-stabilized emulsions). Oxygen uptake was also slowed down in the presence of an excess of proteins. This led to a substantial increase of the length of the lag phases: 9.9 h instead of 3.3 h for the BLG-stabilized emulsions, and 44.4 h instead of 15.0 h for the BCN-stabilized emulsions.

To summarize these observations, the results obtained with the three proteins highlight first a good global correlation between oxygen uptake and decrease of Trp fluorescence (Fig. 1, 2). When the decrease of Trp fluorescence started early in the emulsions, oxygen uptake started early as well. On the opposite, when the decrease of Trp fluorescence did not start immediately, a rather long lag phase was observed for oxygen uptake. This relationship is highlighted in Fig. 3A. The estimated time to reach half the threshold Trp fluorescence ($t_{1/2}$, T_{rp}) increased linearly with the estimated time to reach half the maximum oxygen uptake ($t_{1/2}$, O_2), not only in the above mentioned incubation conditions but also in the other incubation conditions. Second, $t_{1/2}$, T_{rp} was always shorter than $t_{1/2}$, O_2 show that the lag phases estimated for Trp fluorescence were always shorter than these estimated for oxygen uptake

(Fig. 3B). As oxygen uptake in our systems is primarily due to lipid oxidation through the formation of CD hydroperoxides (Berton et al., 2011b), these results indicate that early protein modifications precede the development of lipid oxidation in the emulsions.



Fig. 1. Evolution of protein fluorescence and oxygen uptake in the protein-stabilized O/W emulsions at pH 6.7 without excess of protein. Left: Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$) of (A) BLG, (B) BCN or (C) BSA in emulsions freshly prepared (t = 0) or after 24 h or 48 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M. Right: Normalized Trp fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 334 \text{ nm}$) (full symbols) and oxygen uptake (empty symbols) in emulsions stabilized with (D) BLG, (E) BCN or (F) BSA incubated at 33 °C (O,•) or at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M (\diamond ,•). Dotted curves correspond to the modified Gompertz equation with the estimated *L* and μ parameters for each emulsion. Errors bars represent standards deviations.



Fig. 2. Effect of excess of proteins in the aqueous phase of emulsions on the normalized Trp fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 334 \text{ nm}$) (full symbols) and oxygen uptake (empty symbols). Emulsions were stabilized with (A) BLG or (B) BCN at pH 6.7, without (\diamond, \blacklozenge) or with (\Box, \blacksquare) excess of protein in the aqueous phase, and incubated at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M. Dotted curves correspond to the modified Gompertz equation with the estimated *L* and μ parameters for each emulsion. Errors bars represent standards deviations.

Table 2

Lag periods (L_{Trp} and L_{O2}) and rates of the decrease of normalized Trp fluorescence (μ_{Trp}) and of oxygen uptake (μ_{O2}) for the emulsions incubated in various conditions. Asymptote confidence intervals for *L* and μ values were calculated with a 95% significance level. t_{1/2, Trp} and t_{1/2, O2} values are incubation times calculated with the model when half the minimum Trp fluorescence or maximum oxygen uptake were reached, respectively. Correlation coefficients (**R**²) indicate the percentage of dispersion explained by the adjusted model.

		Para	Parameters of Trp fluorescence			Parameters of oxygen uptake*			
Emulsion	Incubation	$L_{\mathrm{Trp}}\left(\mathrm{h}\right)$	$\mu_{\rm Trp} ({\rm h}^{-1}), \\ \times 10^2$	R²	t _{1/2, Trp} (h)	L_{02} (h)	μ_{02} (mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ oil h^{-1})	R²	$t_{1/2, O2}(h)$
BLG	FeEDTA	0.2 ± 0.9	6.8 ± 1.0	96.0	6.5	3.3 ± 0.4	6.1 ± 0.2	98.3	14.4
Excess BLG	FeEDTA	~ 0	3.7 ± 0.4	96.4	8.8	9.9 ± 1.3	3.9 ± 0.3	95.7	27.3
BLG	33 °C	~ 0	14.4 ± 1.5	98.6	3.0	2.3 ± 0.3	8.0 ± 0.3	99.3	12.1
BCN	FeEDTA	1.0 ± 0.8	5.8 ± 0.7	97.8	8.4	$\begin{array}{c} 15.0 \pm \\ 0.8 \end{array}$	3.3 ± 0.1	96.9	35.6
Excess BCN	FeEDTA	~ 0	1.3 ± 0.2	83.2	25.1	44.4 ± 1.2	3.9 ± 0.4	94.4	61.8
BCN	33 °C	3.2 ± 0.3	7.3 ± 0.4	99.7	9.2	12.4 ± 0.5	9.2 ± 0.5	99.2	20.9
BSA	FeEDTA	~ 0	3.2 ± 0.4	96.9	12.9	$\overline{\begin{array}{c}14.0\pm\\0.8\end{array}}$	4.8 ± 0.3	97.1	27.9
BSA	33 °C	40.3 ± 2.0	4.9 ± 1.3	91.1	47.9	44.4 ± 1.5	3.4 ± 0.3	91.1	67.2

* Oxygen uptake parameters from Berton et al. (2011b) and Berton et al. (in press).



Fig. 3. Correlations between the estimated parameters for Trp fluorescence and oxygen uptake: (A) $t_{1/2, Trp}$ as a function of $t_{1/2, O2}$; (B) L_{Trp} as a function of L_{O2} . Data represent the parameters estimated during incubation of emulsions stabilized with BLG (black symbols), BCN (grey symbols) or BSA (white symbols), at 33 °C without oxidation initiator (circles) or at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M (diamonds) or with the other oxidation initiators (squares). In graph (A), the large-dotted line represents the linear model applied to the whole data set (R² = 0.84). Errors bars represent the asymptote confidence intervals calculated for *L* values with a 95% significance level. In graph (B), the small-dotted line represents the theoretical curve according to which both lag phases would be equal.

Modifications of adsorbed and unadsorbed proteins in the oxidizing emulsions

To distinguish the modifications undergone by proteins adsorbed on the droplet surface from those undergone by unadsorbed proteins in the aqueous phase, we collected these two fractions after centrifugation of emulsion samples at various incubation times.

Protein fluorescence. Fig. 4 represents the fluorescence spectra acquired for the aqueous and creamed phases of BLG-, BCN- and BSA-stabilized emulsions at pH 6.7 without excess of protein, freshly prepared or after 24 h or 48 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M. In accordance with the distribution of proteins within emulsions (Table 1), the initial fluorescence intensity was higher in the creamed phase samples than in the aqueous phase samples, especially in the BCN-stabilized emulsion, where the BCN concentration in the aqueous phase was very low (0.45 g 1⁻¹, Table 1). In all creamed phases, the Trp

fluorescence decreased dramatically upon incubation. After 48 h of incubation, no more peak was detectable in these two fractions. On the opposite, the Trp fluorescence decreased less tremendously in the aqueous phase of the BLG- and BSA-stabilized emulsions, a substantial peak with a maximum located at 334 nm being present even after 48 h of incubation.



Fig. 4. Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$) of the creamed phase or aqueous phase of emulsions stabilized by BLG, BCN or BSA without excess of protein, freshly prepared (t = 0) or after 24 h or 48 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M.

Protein solubility. The solubility of proteins extracted from whole emulsions, aqueous phase or creamed phase of BLG-, BCN- and BSA-stabilized emulsions at pH 6.7, without excess of

protein, was investigated by determining the concentration of soluble proteins in guanidine chloride 6 M at t_0 , after 24 h or 48 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M (Fig. 5).



Fig. 5. Decrease in protein solubility in whole emulsions, creamed phase or aqueous phase of emulsions stabilized with (A) BLG, (B) BCN or (C) BSA, without excess of protein, in freshly prepared emulsions (white bars) or after 24 h (dotted bars) or 48 h (grey bars) of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M. Results are expressed in percentage of soluble proteins as compared with the t₀ value (%). Errors bars represent standard deviations.

In the BLG- and BSA-stabilized emulsions and in their creamed phases, the solubility of proteins decreased dramatically during the incubation period. After 48 h of incubation it reached in the creamed phases less than 10% of the solubility at t₀. In the BCN-stabilized emulsion, the solubility of the proteins from whole emulsion or creamed phase was not modified after 24 h of incubation, but was around half-reduced after 48 h of incubation. In contrast, for all emulsions, the solubility of the proteins of the aqueous phases remained unaffected whatever the incubation time.

Protein aggregation – SDS PAGE. To investigate the modifications undergone by the proteins during incubation of emulsions, proteins from whole emulsions, aqueous phase or creamed phase of BLG-, BCN- and BSA-stabilized emulsions at pH 6.7, without excess of protein, were analyzed by SDS-PAGE at t_0 , after 24 h or 48 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 µM (Fig. 6). The possible involvement of disulfide bonds was examined by performing SDS-PAGE in either non-reducing or reducing conditions. The lanes for native BLG presented a main band at around 18 kDa, which corresponds to the monomer form of the protein, and a less intense band at around 37 kDa, which corresponds to its dimer form. The lanes for native BCN presented a main band at around 24 kDa corresponding to the monomer form, two thin bands with a slightly lower molecular weight, and a low intense band at around 50 kDa corresponding presumably to the dimer form. The lanes for native BSA comprised a main band at around 66 kDa corresponding to the monomer form, several bands of higher molecular weight corresponding either to traces of BSA aggregates or to contaminating proteins (immunoglobulins), and a few thin bands with a slightly lower molecular weight.

In the aqueous phase of BLG-stabilized emulsions, no modifications in the SDS-PAGE profiles occurred along the incubation period. In contrast, for the whole emulsion and creamed phase, the intensity of the bands corresponding to the monomers of protein decreased markedly along the incubation period, in both non-reducing and reducing conditions. Concomitantly, high molecular weight fractions corresponding to aggregates ranging from around 30 to more than 100 kDa appeared. The decreasing intensity of the BLG monomer band was more marked in the creamed phase than in the whole emulsion samples, due to the contribution of the aqueous phase. In the non-reducing conditions, no more band was still detectable for the creamed phase sample after 48 h of incubation. When the electrophoresis of the proteins from the creamed phase was performed in reducing conditions, high molecular

weight fractions remained present but the intensity of the BLG monomer band was partially recovered, especially after 48 h of incubation.

For the aqueous phase of BCN-stabilized emulsions, the intensity of the main band at around 24 kDa increased at t = 24 h and t = 48 h of incubation as compared to t_0 . This is in accordance with the increase of the concentration of unadsorbed BCN during the incubation of emulsion (Table 1) (Berton et al., 2011a). For the whole emulsion and creamed phase samples, the intensity of the main band decreased but in a lesser extent than for BLG. This agrees with the lower BLG solubility in the creamed phase after 48 h of incubation as compared with BCN (Fig. 5). The development of higher molecular weight fractions occurred, as highlighted by the emergence of diffuse bands attributed to aggregates. No difference was found between the non-reducing and reducing conditions, since BCN does not contain any cysteyl residue nor disulfide bonds.

Finally, in BSA-stabilized emulsions, no modification in the profile was observed for the aqueous phase samples along the incubation period. In the same time, a huge decrease of the intensity of the monomer band was observed in the whole emulsion and creamed phase samples. In the latter sample, the band was not longer detectable after 48 h of incubation when electrophoresis was performed in non-reducing conditions. The monomer band was hardly recovered when the reducing conditions were applied. This suggests that the protein aggregation induced during the incubation period was only partly due to the formation of disulfide bonds. Contrary to the observations in BLG and BCN profiles, higher molecular weight fractions were not detected in the incubated whole emulsion and creamed phase samples of BSA. BSA aggregation may lead to very high molecular weight polymers, which could not penetrate into the gel.

To summarize, whatever the protein, the intensity of the bands corresponding to the protein monomers did not decrease along the incubation period in the aqueous phase samples. On the opposite, the intensity of the bands corresponding to the protein monomers decreased for the whole emulsion and creamed phase samples, in both non-reducing and reducing conditions. These observations are in accordance with the results of protein solubility presented above, and thus confirm that in the oxidizing emulsions, the proteins present in the aqueous phase were less modified than the adsorbed proteins.



Fig. 6. SDS-PAGE profiles of proteins extracted from whole emulsions (lanes 3, 4, 5: t0, t = 24 h, t = 48 h), aqueous phase (lanes 6, 7, 8: t0, t = 24 h, t = 48 h) or creamed phase (lanes 9, 10, 11: t0, t = 24 h, t = 48 h) of emulsions, without excess of protein, during the incubation of BLG-, BCN- or BSA-stabilized emulsions at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M. In each gel, lane 1 corresponds to the native protein and lane 2 to the molecular weight marker.

Formation of protein-bound carbonyls. The formation of carbonyls onto the proteins extracted from whole emulsions, aqueous phase or creamed phase of BLG-, BCN- and BSA-stabilized emulsions at pH 6.7, without excess of protein, was investigated at t_0 , after 24 h or 48 h of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M (Fig. 7).



Fig. 7. Protein-bound carbonyls in whole emulsions, creamed phase or aqueous phase of emulsions stabilized with (A) BLG, (B) BCN or (C) BSA, without excess of protein, in freshly prepared emulsions (white bars) or after 24 h (dotted bars) or 48 h (grey bars) of incubation at 25 °C with FeSO₄/EDTA 1/1 M/M 200 μ M. Results are expressed in μ mol carbonyls per g soluble proteins. Errors bars represent standard deviations.

For the three proteins, the formation of carbonyls was dramatically higher in the creamed phases than in the aqueous phases. The amounts of protein-bound carbonyls formed in the whole emulsions were accordingly intermediate. In the BLG-stabilized emulsions, around 7

and 10 μ mol carbonyls per g of soluble proteins were detected at t₀ in the whole emulsion and creamed phase samples, respectively. These amounts increased gradually during the incubation period, finally reaching 40, 12 and 70 μ mol g⁻¹ of soluble proteins in the whole emulsion, aqueous phase and creamed phase samples, respectively. In the BCN-stabilized emulsions, very low initial amounts of carbonyls were detected (lower than 2 μ mol g⁻¹ of soluble proteins). The carbonyl formation remained limited after 24 h of incubation, but reached substantial values after 48 h of incubation, especially in the samples containing adsorbed proteins: more than 20 and almost 50 μ mol g⁻¹ of soluble proteins in the whole emulsion and creamed phase samples, respectively. Finally, in the BSA-stabilized emulsions, low initial amounts of carbonyls were detected: lower than 5 µmol g⁻¹ of soluble proteins whatever the sample (whole emulsion, aqueous phase or creamed phase). The formation of carbonyls occurred rather rapidly for the first 24 h of incubation, especially for the creamed phase sample in which the maximum amount of carbonyls was already reached after 24 h of incubation (around 50 μ mol g⁻¹ of soluble proteins). The formation of carbonyls in the aqueous phase was more gradual, suggesting a slower degradation of the unadsorbed proteins as compared with the adsorbed ones. Finally, the amount of protein-bound carbonyls formed after 48h of incubation in the aqueous phase of BSA-stabilized emulsions (20 μ mol g⁻¹ of soluble proteins) was higher than in the aqueous phase of the BLG- and BCN-stabilized emulsions (around 12 and $6 \mu mol g^{-1}$ of soluble proteins, respectively).

Molar balance of substrates and reaction products in oxidized emulsions

The contribution of lipid oxidation in the measurement of oxygen uptake can be evaluated from molar balances. Calculations are based on the amount of PUFA in rapeseed oil freshly stripped or extracted from an oxidized emulsion and the amounts of oxygen uptake, CD, volatile compounds arising from PUFA oxidation and protein bound carbonyls. In the oxidized BLG-stabilized emulsion at pH 6.7 after 30 h of incubation (25 °C; FeSO₄/EDTA, 1/1, M/M, 200 μ M), approximately 8% of C18:2 n-6 and 17% of C18:3 n-3 were lost as compared with the initial oil contents. The amount of consumed dioxygen was close to the total amount of oxidized PUFA, although slightly higher (Table 3).

Table 3. Molar balance in BLG-stabilized emulsion after 30 h of incubation (25 °C; FeSO₄/EDTA, 1/1, M/M, 200 μ M). Molar concentration of BLG-bound carbonyls was determined considering that only 34% of BLG was soluble after 24 h of incubation. Indicated values correspond to the mean of at least triplicate determinations.

	Initial amount of PUFA (mmol kg ⁻¹ emulsion)	Amount of PUFA in oxidized emulsion, t = 30 h (mmol kg ⁻¹ emulsion)	Amount of oxidized PUFA, t = 30 h (mmol kg ⁻¹ emulsion)	Consumed O_2 , t = 30 h (mmol kg ⁻¹ emulsion)	Amount of CD, t = 30 h (mmol kg ⁻¹ emulsion)	Amount of volatiles, t = 30 h (mmol kg ⁻¹ emulsion)	Ratio volatile compounds / PUFA	Protein- bound carbonyls, t = 24 h (mmol kg ⁻¹ emulsion)
C18:2	168	154	14	-	-	0.022 (bexanal)	0.13×10^{-3}	-
C18:3 n-3	81	67	14	-	-	0.137 (propanal)	1.69×10^{-3}	-
Total	249	221	28	39	22	0.159	-	0.031

The amount of CD was approximately twice lower than the amount of consumed oxygen, which can be explained by the simultaneous formation and decomposition of CD and by a contribution of the oxidation of monounsaturated fatty acids. The amounts of volatile compounds (propanal and hexanal) were very low in comparison with the amounts of consumed oxygen and CD. The ratio between propanal and initial C18:3 n-3 amount was sharply higher than the ratio between hexanal and initial C18:2 n-6 amount. This can be explained by either the higher sensitivity of C18:3 n-3 to oxidation, or the reactivity of hexanal. The amount of protein bound carbonyls was low in comparison with the amount of consumed oxygen, showing that the contribution of protein oxidation to the measurement of oxygen uptake can be neglected.

Discussion

Protein modifications as en early event in the oxidative chain reactions

This work evaluated simultaneously the oxygen consumption and the evolution of the fluorescence signal of the proteins in protein-stabilized O/W emulsions incubated in oxidizing conditions, i.e. at 25 °C with FeSO₄/EDTA catalyst, or at 33 °C. Several phenomena presumably contribute to oxygen uptake in our emulsions: the formation of lipid

hydroperoxides (Frankel, 2005), the fixation of oxygen by proteins (Schaich, 2008) and the reaction of the iron/EDTA complex with oxygen (Gambardella et al., 2005; Bernasconi & Baerends, 2009). The molar balance in the BLG-stabilized emulsion showed that the molar amounts of consumed oxygen matches with the formed CD hydroperoxides and lost PUFA (Table 3). This agrees with previous work demonstrating that oxygen uptake in proteinstabilized emulsions containing polyunsaturated lipids is strongly related to lipid oxidation (Berton et al., 2011b; Berton et al., in press; Lethuaut et al., 2002; Villière et al., 2005). Parallel to the evaluation of lipid oxidation in the emulsions through oxygen uptake, the modifications undergone by the proteins were first assessed and followed by the evolution of Trp fluorescence measured in situ by front-surface fluorescence. This method is recognized as a global indicator of protein degradation in oxidizing systems (Andersen et al., 2005; Davies et al., 1987; Elias et al., 2005; Estévez et al., 2008; Lund et al., 2011; Rampon et al., 2001; Salminen et al., 2010). In these papers using model systems or real foods, protein modifications were timely linked with lipid oxidation. In our emulsions stabilized with either BLG, BCN or BSA, incubated in various conditions, a close time coincidence between protein modifications and lipid oxidation was as well observed (Fig. 3A). The comparison of the lag phases demonstrates that the decrease of Trp fluorescence measured in situ in proteinstabilized emulsions precedes oxygen uptake (Fig. 3B, Table 2). The various sensitivities of the oxygen uptake method and the front-surface fluorescence one cannot explain the gap observed between the estimated lag phases. Otherwise, the difference between the L_{Trp} and L_{O2} parameters would have been constant, which was not the case here (Table 2). Thus, we assume that protein modifications start before the radical attack of the lipid phase and the propagation step. This hypothesis would also explain the high $t_{1/2, O2}$ / $t_{1/2, Trp}$ ratios encountered in some emulsions, until more than 4 (Table 2). The reaction sequence between lipid and protein oxidation in complex multiphase matrices is currently questionable in the literature. Our results are in agreement with recent work on model emulsions showing that BLG present in the aqueous phase or myofibrillar proteins oxidized prior to the detection of lipid oxidation (Elias et al., 2005; Estévez et al., 2008; Salminen et al., 2010). These early modifications of proteins do not exclude a transfer of oxidative reactions from lipids to proteins in the latest stages of oxidation when lipid oxidation propagates, as claimed by several authors (Dalsgaard et al., 2010; Hidalgo & Zamora, 2002; Lund et al., 2011; Mestdagh et al., 2011; Schaich, 2008).

Adsorbed proteins as the main target of protein modifications in oxidizing emulsions

The fluorescence intensities measured in whole emulsions result from the signals emitted by both adsorbed and unadsorbed proteins. Although our emulsions were formulated to avoid the presence of a large excess of proteins in the aqueous phase, 90 to 70% of proteins were actually located at the interface (Table 1). In these emulsions, the decrease of protein fluorescence (Fig. 1, 2) was thus mostly related to the adsorbed proteins. To distinguish between these two contributions, Trp fluorescence spectra were acquired on the creamed and aqueous phases of the emulsions. The results showed that the proteins adsorbed at the surface of oil droplets were deeply more modified during oxidation of emulsion than the remaining proteins unadsorbed in the aqueous phase (Fig. 4). When excess of proteins was added in the aqueous phase, the decrease of Trp fluorescence was accordingly slowed down (Fig. 2). Our results are in accordance with Rampon et al. (2001) who demonstrated that decreasing the size of oil droplets in BSA-stabilized emulsions, and thus increasing the total interfacial area and the proportion of adsorbed proteins, led to a faster and more marked decrease of Trp fluorescence. They concluded that BSA was more modified when located at the oil droplet surface than unadsorbed in the aqueous phase.

The strong decrease of protein solubility in the creamed phases of oxidizing emulsions corroborates the higher modifications of the adsorbed proteins in comparison to the proteins in the aqueous phase. The loss of solubility of interfacial proteins during the incubation of emulsions is presumably related to the aggregation and covalent modifications of proteins. Protein cross-linking induced by oxidation is assumed to occur via either cysteyl residues, forming disulfide bonds, or tyrosyl residues, leading to dityrosyl crosslinks or quinone structures which can themselves form complex crosslink structures by reacting with other amino acids (lysine, cysteine, proline) (Gerrard, 2002; Lund et al., 2011; Ostdal et al., 2002). BLG and BSA are prone to aggregation in oxidizing conditions (Genot et al., 1990; Kerkaert et al., 2011; Mestdagh et al., 2011). They both comprise one free cysteyl residue in their peptidic chains, which allows the formation of disulfide bonds. The involvement of disulfide bonds in the aggregation of adsorbed BLG and BSA was highlighted from the results of SDS-PAGE (Fig. 6), which showed a partial recovery of the monomer band in the reducing conditions, as compared with the non-reducing ones. On the opposite, BCN does not contain any free cysteyl residue and no difference between the SDS-PAGE profiles in reducing and non-reducing conditions was thus observed. BLG, BSA and BCN contain tyrosyl residues (4, 20 and 4, respectively). This makes possible the formation of dityrosine, widely mentioned as a factor involved in aggregation of proteins in the presence of oxygen reactive species (Davies et al., 1987; Gerrard, 2002; Levine & Stadtman, 2001; Lund et al., 2011) or radicals arising from oxidizing lipids (Dalsgaard et al., 2010; Dalsgaard et al., 2011; Schaich, 2008). Proteins can also undergo covalent modifications induced by aldehydes arising from lipid oxidation (Schaich, 2008). 4-hydroxynonenal (4-HNE) and 4-oxononenal were demonstrated to form covalent adducts with nucleophilic amino acids (cysteine, histidine, lysine and arginine) (Doorn & Petersen, 2003). Such covalent interactions were highlighted between milk proteins and 2-hexenal or in a lesser extent hexanal, involving lysyl and histidyl residues (Meynier et al., 2004). A mass spectroscopy analysis of BCN extracted from an oxidized emulsion revealed an increase of approximately 300 Da in the protein mass, which was attributed to the addition of unsaturated aldehydes arising from oil oxidation on BCN (Leaver et al., 1999).

Ultimately, the favored oxidation of adsorbed proteins as compared to the unadsorbed ones was clearly highlighted from the measurement of protein-bound carbonyls (Fig. 7). Carbonylation is usually recognized as one of the most remarkable chemical modifications of oxidized proteins (Estévez, 2011; Levine et al., 1990; Nyström, 2005). Carbonyl derivatives can be formed by direct oxidative attack of prolyl, arginyl, lysyl and threonyl residues, especially in the presence of metal ions. They can also arise from secondary reactions between lipid oxidation products and lysyl, cysteyl and histidyl residues (Nyström, 2005). In our work, it is probable that the involved pathway of carbonyl formation is mainly the reaction involving lipid oxidation products. The unadsorbed proteins, which were early in contact with the reactive oxygen species in the aqueous phase, were by far less prone to carbonylation than the proteins in contact with the lipid phase. This is in agreement with the results of Refsgaard et al. (2000), who showed that the presence of PUFA stimulated the formation of BSA-bound carbonyls. It is also noteworthy that protein-bound carbonyls were quantified only in the fraction of soluble proteins, which represented only a slight part of the total proteins contained in the oxidized emulsions and creamed phases (Fig. 5). The protein fraction that could not be dissolved had presumably undergone many more modifications. It appears therefore all the more relevant to use *in situ* methods as front-surface fluorescence, which provide information about the whole protein fraction contained in the samples.

The role of unadsorbed proteins in this work remains nevertheless ambiguous. On the one hand, unadsorbed proteins were clearly less oxidized and modified than adsorbed proteins, which was demonstrated through all the tested methods. On the other hand, the addition of excess proteins in the aqueous phase of emulsions tremendously delayed and sometimes slowed down lipid oxidation, which implies that unadsorbed proteins are able to delay the

diffusion of prooxidant species towards the lipid core of oil droplets. It can be hypothesized that unadsorbed proteins can scavenge free radicals and/or chelate metal ions, as mentioned earlier (Clausen et al., 2009; Faraji et al., 2004; Sugiarto et al., 2010; Villière et al., 2005) but are not irreversibly modified. We assume that unadsorbed proteins probably exert their antioxidant role mainly during the initiation step of oxidation, during which low amounts of free radicals are involved. This hypothesis would explain why unadsorbed proteins undergo low damage while delaying efficiently lipid oxidation. Then, once the propagation step is engaged, larger amounts of radical species would be involved and the oxidative reactions between proteins and lipids at the interface would predominate.

Conclusion

This study brings both kinetic and spatial insights regarding protein degradations in lipidbased multiphase systems, as summarized in Fig. 8. First, a strong time relationship is found between lipid oxidation and protein modifications. The estimation of kinetic parameters indicated that protein modifications started prior to lipid oxidation. Second, the location of proteins within the emulsions appears as a crucial factor controlling the extent of their oxidative modifications. The proteins adsorbed onto the oil droplet surface were dramatically modified along the incubation of emulsions, whereas the unadsorbed proteins underwent no substantial degradations.



Fig. 8. Summary scheme of the possible protein and lipid oxidation mechanisms in O/W emulsions in the presence of metals ions.

Acknowledgements

Claire Berton thanks the Région Pays de la Loire and INRA for the financial support of Ph.D grant. We also thank Michèle Dalgalarrondo (INRA BIA), Chantal Houée-Levin and Filippo Rusconi (Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris-Sud 11) for their useful comments and suggestions.

3.2. Test de consommation d'oxygène dans les solutions aqueuses de protéines

Nous avons incubé des solutions de protéines (SAB, β -lactoglobuline, β -caséine) à 6 g l⁻¹ et à pH 6,7 (PIPES 10 mM, NaCl 80 mM) en présence de l'initiateur fer/EDTA introduit dans un rapport molaire protéines/initiateur équivalent à celui appliqué dans les émulsions, réparties en fractions de 2 ml dans des flacons hermétiquement fermés (25°C, obscurité, agitation rotative 5 rpm). La consommation d'oxygène dans l'espace de tête de ces solutions a été suivie pendant 72 h d'incubation. Aucune consommation d'oxygène n'a été détectée pendant cette période. Ceci est cohérent avec les résultats présentés dans cet article, qui démontrent que les protéines en phase aqueuse des émulsions subissent peu de modifications et de dégradations oxydatives. Ce résultat indique également que la présence de lipides insaturés est nécessaire à l'oxydation des protéines dans ces conditions d'incubation. Comme évoqué précédemment, le transfert de radicaux lipidiques ou de produits d'oxydation des lipides aux protéines peut provoquer l'oxydation des protéines (Schaich, 2008). Pour expliquer la détection des modifications des protéines de l'interface avant le démarrage de l'oxydation des lipides, il est possible que le changement de conformation des protéines lors de leur adsorption à l'interface huile/eau favorise l'exposition et l'accessibilité d'acides aminés pouvant être préférentiellement attaqués par les espèces pro-oxydantes provenant de la phase aqueuse (espèces réactives de l'oxygène, ions métalliques).

4. Modulation de la structure de l'interface : conséquences sur l'oxydation des émulsions et caractérisation des films interfaciaux impliqués

4.1. Effet de l'hétérogénéité structurale d'interfaces mixtes tensioactif/tensioactif sur l'oxydation des lipides en émulsion (Article 5)

Dans le travail présenté ici, nous avons comparé l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par un tensioactif, le Tween 20, utilisé seul ou en mélange avec des co-tensioactifs de façon à moduler la composition, l'épaisseur et l'homogénéité du film interfacial. Les couches de tensioactifs et de leurs mélanges ont été reconstituées sur des films de Langmuir afin de caractériser la miscibilité des tensioactifs et l'homogénéité de leurs distributions aux interfaces. Le couplage de ces deux modèles d'étude a permis, *in fine*, de relier le développement de l'oxydation des lipides dans les émulsions et les caractéristiques des interfaces impliquées.

Effect of the structural heterogeneity of mixed surfactant-stabilized interfaces on lipid oxidation in oil-in-water emulsions

En préparation pour soumission à Journal of Colloid and Interface Science

Claire Berton, Claude Genot, Dominique Guibert, Marie-Hélène Ropers*

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 NANTES, France

ABSTRACT

The development of lipid oxidation in oil-in-water (O/W) emulsions is widely influenced by the properties of the interfacial layer between the oil and water phases. In this work, the effect of the composition and structure of the interface on the oxidative stability of Tween 20stabilized O/W emulsions was investigated. Emulsions were prepared with either single Tween 20 or Tween 20/co-surfactant mixtures. Tested co-surfactants included Span 20 and monolauroyl glycerol (MLG), which have the same hydrophobic tail as Tween 20 but differ through the size and composition of their polar headgroup. Metal-catalyzed lipid oxidation in the emulsions was monitored through the measurement of oxygen uptake, formation of conjugated dienes (CD) and volatile compounds. The single Tween 20-stabilized emulsion was more oxidatively stable than the surfactant mixture-stabilized ones. This observation could be related either to the chemical protection provided by the polar headgroup of Tween 20, or by the structural heterogeneity of the interfacial layer induced by the co-surfactants. This second hypothesis was supported by the reconstitution of Tween 20/co-surfactant films at the air/water interface, which highlighted that the Tween 20/co-surfactant mixtures exhibited a non-ideal behavior with the establishment of repulsive interactions.

Keywords

Oil-in-water emulsion; Interface; Surfactant; Co-surfactant; Lipid oxidation; Polar headgroup.

1. Introduction

Oil-in-water (O/W) emulsions are often used as model food systems to study the effect of formulation and compositional parameters on their reactivity and functionality. These systems are constituted of oil droplets dispersed in an aqueous phase. The interfacial layer between the oil and aqueous phases is covered by single or a mixture of emulsifiers (McClements, 2005). In food emulsions, the lipid phase often contains polyunsaturated fatty acids (PUFA), whose oxidation is a major cause of nutritional and sensory deterioration (Frankel, 2005). It is generally admitted that lipid oxidation in O/W emulsions is highly dependant on the properties of the interfacial layer (Coupland & McClements, 1996; McClements & Decker, 2000; Waraho et al., 2011b). A recent study highlighted that protein-stabilized interfaces were less effective to protect emulsified lipids against oxidation than surfactant-stabilized interfaces (Berton et al., 2011b). The authors suggested that surfactants could provide a compact and homogenous barrier protecting the lipid core of oil droplets against oxidation, whereas protein layers would be more heterogeneous and porous. The size of the hydrophobic tail of non-ionic surfactants did not influence substantially lipid oxidation in emulsions (Berton et al., 2011b; Chaiyasit et al., 2000). On the opposite, increasing the size of the polar headgroup of Brij non-ionic surfactants decreased substantially lipid oxidation (Silvestre et al., 2000). Thus, the size and the structure of the polar headgroup of non-ionic surfactants were assumed to be parameters which intervene in the development of lipid oxidation in O/W emulsions. However, no physical characterization of the involved interfacial layers was carried out to support this hypothesis with experimental evidence.

The objective of this work is to determine how the composition of the interfacial layer in relation with the structure of the polar headgroup of food-grade surfactants impacts the oxidative stability of O/W emulsions. First, oxidizable O/W emulsions stabilized by either one single non-ionic surfactant, namely Tween 20, or its mixtures with co-surfactants constituted of the same hydrophobic tail but of different polar headgroups (Fig. 1) were designed, the concentrations of surfactants remaining in the aqueous phase being the lowest possible. Lipid oxidation was then followed in the emulsions through the measurement of oxygen uptake, formation of conjugated dienes (CD) and of selected oxidation volatile compounds. The involved interfacial layers were finally reconstituted as Langmuir films to characterize the miscibility of Tween 20 and co-surfactants at the air/water interface and the homogeneity of the films in an attempt to relate these data to the development of lipid oxidation in emulsions.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Rapeseed oil was purchased in a local supermarket. It was stripped by means of alumina (MP Alumina N-Super I, MP Biomedicals, France) to eliminate impurities and tocopherols (Berton et al., 2011a). Stripped oil contained less than 2 µg residual tocopherols per g oil and 0.34 µmol hydroperoxides per g oil. Tween 20, Span 20, monolauroyl glycerol (MLG), 1,4piperazinediethanesulfonic acid (PIPES), ethylenediaminetetraacetic acid calcium disodium salt (EDTA), iron(II) sulfate heptahydrate (FeSO₄) were purchased from Sigma Aldrich (France). The hydrophobic tail of Tween 20, Span 20 and MLG is mainly constituted of lauric acid (C12:0), as experimentally verified in previous work (Berton et al., 2011a), but the three surfactants distinguish through their polar headgroup (Fig. 1). The headgroup of Tween 20 is constituted of a sorbitan ring on which several polyoxyethylene (POE) chains are attached. The headgroup of Span 20 comprises as well a sorbitan ring but without POE, whereas this of MLG consists only of the residual glycerol group. Tween 20, Span 20 and MLG have molecular weights of 1228 g mol⁻¹, 346.5 g mol⁻¹ and 274.4 g mol⁻¹, respectively, as specified by the supplier. Sodium chloride (NaCl) was purchased from Fluka Chemika (France). Isopropanol and chloroform of HPLC grade were purchased from Carlo Erba (France). The buffer was composed of PIPES (10 mM), NaCl (80 mM) and adjusted at pH 6.7.



Fig. 1. Molecular structures of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20, left), sorbitan monolaurate (Span 20, middle) and monolauroyl glycerol (MLG, right). In the Tween 20 molecule, w + x + y + z = 20.

2.2. Preparation, physical characterization and incubation of O/W emulsions

The day before emulsion preparation, surfactant solutions were prepared in the buffer. Tween 20 solutions were gently stirred overnight at 4 °C to entirely dissolve the surfactant molecules without foam formation. Span 20 and MLG solutions were stirred for 1 h at 60 °C and then overnight at room temperature. Immediately before emulsion preparation, Span 20 solutions were homogenized for 2 min at 15000 rpm using a rotor-stator homogenizer fitted with a 12-mm diameter head (Polytron PT 3000, Kinematica, Littau, Switzerland). When mixtures of surfactants were used, equal volumes of each pure surfactant solutions were 5.00 g Γ^1 when Tween 20 was used alone; 4.60 g Γ^1 for Tween 20 and 0.49 g Γ^1 for Span 20 when Tween 20/MLG mixtures were used. For each mixture, the molar ratio (R_{mol}) of co-surfactant (Span 20 or MLG) was approximately 30% (Table 1). The characteristics of the surfactant mixtures used to stabilized O/W emulsions are presented in Table 1. Hydrophilic-lipophilic balance (HLB) values of surfactant mixtures (HLB_{mix}) could be calculated from equation (1) (Dai et al., 1997):

 $HLB_{mix} = HLB_A \times A\% + HLB_B \times B\%$ (1)

where HLB_A and HLB_B are the HLB values of pure Tween 20 and pure co-surfactant, respectively, A% is the mass percentage of Tween 20 and B% is the mass percentage of the co-surfactant. HLB values of Tween 20, Span 20 and MLG are 16.7; 8.6 and 5.2, respectively (Hait & Moulik, 2001). Calculated HLB_{mix} values are presented in Table 1.

Table 1

Characteristics of surfactant mixtures applied in emulsions. HLB_{mix} values were calculated from eq. (1).

Tween 20/Co- surfactant mixture	Molar ratio of co- surfactant (R _{mol} , mol %)	Mass ratio of co- surfactant (R _w , g/100 g)	HLB _{mix}
Tween 20/Span 20	29.3	10.5	15.9
Tween 20/MLG	29.3	8.5	15.7

O/W emulsions were prepared as described by Berton et al. (2011a). These emulsions had been shown to be physically stable for at least 48 h of incubation in oxidative conditions, and

to contain low amounts of unadsorbed surfactants. Briefly, 30 g oil and 70 g aqueous solution of surfactants were premixed for 2 min at 15000 rpm using the rotor-stator homogenizer (Polytron PT 3000, Kinematica, Littau, Switzerland). The coarse emulsions were then homogenized through a one-stage low-pressure valve homogenizer (A0812W-A-CD, Stansted Fluid Power, Stansted, UK) for 5 min at 35 bar. The size distribution of oil droplets in the emulsions was measured immediately after homogenization with a laser light scattering instrument (Saturn 5200, Micromeritics, Verneuil en Halatte, France) and after 48 h of incubation. Emulsions stabilized with the different emulsifiers had similar droplet size distributions with a volume-surface mean diameter ($[d_{3,2}]$) comprised between 1.5 and 1.8 µm at t₀. The droplet size distributions remained constant during incubation.

Emulsions were incubated in the presence of an oxidation catalyst constituted of an equimolar mixture of FeSO₄ and EDTA (1/1, M/M, final concentration in emulsions 200 μ M), as previously described (Berton et al., 2011b). Aliquots (3 ml) of emulsions were distributed in 20.5-ml headspace vials hermetically sealed. The vials were rotated at 25 °C, in the dark at 5 rpm for 72 h with a test tube rotator oriented at 30° *versus* the vertical position.

2.3. Measurements of lipid oxidation

Oxygen uptake. Oxygen uptake was determined as described by Villière et al. (2005) and Berton et al. (2011b). Gas chromatography (GC) analysis of headspace samples was performed with a HP 5890 - series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Böblingen, Germany) coupled to a fused silica plot column (Molsieve 5A CP7535, length 10 m, internal diameter 0.32 mm, Varian, Les Ulis, France) and a thermal conductivity detector. Results were expressed in millimoles of consumed oxygen per kg oil (mmol O_2 kg⁻¹ oil).

Conjugated dienes (CD). The formation of CD, which are primary oxidation products, was determined from their absorbance at 233 nm according to the method described by Lethuaut et al. (2002) and Berton et al. (2011b). Results were expressed in millimoles of equivalent hydroperoxides per kg oil (mmol eq HP kg⁻¹ oil) with 27000 M⁻¹ cm⁻¹ as the molar extinction coefficient of CD at 233 nm (Pryor & Castle, 1984).

Volatile compounds. To evaluate the formation of secondary oxidation products, two volatile compounds, namely propanal and hexanal were quantified by GC coupled to a flame ionization detector (FID) after they have been sampled in the headspace of emulsion by solid-

phase microextraction (SPME) with a Carboxen-polydimethylsiloxane (PDMS) fiber according to the procedure described by Berton et al. (2011b).

2.4. Monolayer surface pressure-area isotherms

Monolayer experiments were carried out on a subphase constituted of the previous buffer (PIPES 10 mM, NaCl 80 mM, pH 6.7). Monolayer surface pressure-area isotherms for pure surfactants (Tween 20, Span 20 and MLG) and for Tween 20/Span 20 or Tween 20/MLG mixtures in various ratios were obtained with a Langmuir film balance (NIMA 302 LL, NIMA Technology Ltd, Coventry, England) coupled with a Teflon trough (maximum surface 267 cm²) thermostated at 25 °C. Solutions of pure or mixed surfactants were prepared in chloroform and spread on the subphase using a 100 µl-microsyringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). Once the surfactant solution was spread, the monolayer was equilibrated for 30 minutes. The monolayer was then compressed by Teflon barriers moving at 20 mm min⁻¹. The surface pressure (mN m⁻¹) of the monolayer was measured using a platine Wilhelmy plate (21.2 mm-perimeter) as a function of the molecular area (Å²). The compression lasted approximately 10 minutes, with 1.3 surface tension measurements per second.

2.5. Experimental design and data treatment

For each formulation, lipid oxidation was followed in two emulsions prepared independently. At each aging time, oxygen uptake was measured in 2 vials, with three headspace sampling per vial; CD were measured in one vial, with three sampling per vial; volatile compounds were analyzed in one vial, with one sampling per vial.

Monolayer surface pressure-area isotherms were established between 1 and 4 times for each pure surfactant or surfactant mixture. The isotherms for pure Tween 20 and for high Tween 20-content mixtures (Tween 20 molar percentage $\geq 40\%$) were performed at least in triplicate because the ability of Tween 20 to solubilize into the subphase made more difficult to obtain reproducible results.

Oxygen uptake and CD formation curves were adjusted applying a modified-Gompertz model as previously described (Berton et al., 2011b). The rate of oxygen uptake μ_1 (mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹), of CD formation μ_2 (mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹) and the lag periods L_1 and L_2 (h) estimated by non linear regression were finally used to calculate the times (t_{1/2 (1)} and t_{1/2 (2)}, h) needed to consume half the maximum oxygen uptake or to form half the maximum CD value. The lag
periods (L_1, L_2) and rates of oxygen uptake or of CD formation (μ_1, μ_2) correspond to the initiation and propagation stages of lipid oxidation, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Oxidative stability of emulsions

The evolution of lipid oxidation in emulsions was followed through different markers to characterize the different stages of the reaction: oxygen uptake (Fig. 2A), formation of conjugated dienes (CD) (primary oxidation compounds, Fig. 2B) and of propanal and hexanal (volatile secondary oxidation compounds, Fig. 2C and 2D).

In all emulsions, oxygen uptake started after a lag phase and developed then over the considered incubation period (Fig. 2A). The development of oxygen uptake was very similar in the emulsions stabilized with the Tween 20/Span 20 and the Tween 20/MLG mixtures. Oxygen uptake proceeded earlier in the emulsions stabilized with surfactant mixtures (Tween 20/Span 20 or Tween 20/MLG) than in the emulsion stabilized with only Tween 20. These observations were confirmed by the kinetic parameters estimated from the adjusted curves (Table 2). The lag phase calculated for oxygen uptake decreased substantially in the Tween 20/Span 20- or Tween 20/MLG-stabilized emulsions as compared with the single Tween 20-stabilized one (23.6 h or 21.1 h, respectively, instead of 36.3 h). However, no clear difference was highlighted regarding the estimated rates of oxygen uptake, which were comprised between 3.1 and 3.6 mmol $O_2 \text{ kg}^{-1}$ oil h⁻¹ whatever the emulsion formulation. As a result, 55 h of incubation were necessary in the Tween 20-stabilized emulsions to reach half the maximum of oxygen uptake ($t_{1/2(1)}$) whereas 45 h or 42 h were enough in the Tween 20/Span 20- or Tween 20/MLG-stabilized emulsions, respectively.

Similar trends were found through the measurement of CD formation (Fig. 2B) and estimation of the corresponding parameters (Table 2). The estimated lag phase for CD formation in the Tween 20-stabilized emulsions lasted 22.6 h, and was reduced by more than 30% in the Tween 20/Span 20- or Tween 20/MLG-stabilized emulsions. Similar rates of CD formation were estimated in all emulsions, i.e. around 1.5 mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹. Half the maximum CD amount was reached after around 39 h in the surfactant mixture-stabilized emulsions, instead of 47.5 h in the single Tween 20-stabilized one.

Formation of propanal and hexanal (Fig. 2B, 2C) confirmed the above-mentioned trends. These two volatile compounds developed in a greater extent in the surfactant mixture-stabilized emulsions than in the single Tween 20-stabilized one. The formation of hexanal developed very similarly in both Tween 20/Span 20- and Tween 20/MLG-stabilized emulsions, whereas more propanal was formed in the Tween 20/Span 20-stabilized emulsion in the last part of the incubation period.



Fig. 2. Oxygen uptake (A), formation of CD (B) and volatile compounds (C, propanal; D, hexanal) during the incubation of emulsions stabilized with Tween 20 (\blacklozenge), Tween 20/Span 20 mixture (\Box) or Tween 20/MLG mixture (\triangle), at 25 °C, in the dark, with FeSO₄/EDTA (1/1 M/M 200 μ M). In panels A and B, dotted curves correspond to the adjusted modified-Gompertz model and error bars represent the standard deviations for oxygen uptake (n = 6 to 12) and CD measurements (n = 3 to 6), some of them being within data points. In panels C and D, error bars correspond to the two values measured in two emulsions prepared independently.

Table 2

Lag periods (L_1 and L_2) and rates of oxygen uptake (μ_1) and of CD formation (μ_2) for the emulsions. Asymptote confidence intervals for L and μ values were calculated with a 95% significance level. Correlation coefficients (\mathbb{R}^2) indicate the percentage of dispersion explained by the adjusted model. $t_{1/2}$ (1) and $t_{1/2}$ (2) are incubation times calculated with the model when half the maximum oxygen uptake or CD formation was reached, respectively.

	Oxygen uptake parameters				CD formation parameters			
	L_1 (h)	$\begin{array}{c} \mu_1 (\mathrm{mmol} \\ \mathrm{O}_2 \mathrm{kg}^{\text{-1}} \\ \mathrm{oil} \mathrm{h}^{\text{-1}}) \end{array}$	R ² (%)	$t_{1/2(1)}(h)$	L_2 (h)	$\mu_2 \text{ (mmol)} $ eq HP kg ⁻¹ oil h ⁻¹)	R ² (%)	$t_{1/2(2)}(h)$
Tween 20	36.3 ± 1.8	3.6 ± 0.4	92.0	55.0	22.6± 2.4	1.4 ± 0.1	94.9	47.5
Tween 20 / Span 20	$\begin{array}{c} 23.6 \pm \\ 0.9 \end{array}$	3.1 ± 0.2	97.7	45.4	15.7 ± 0.9	1.5 ± 0.1	98.9	38.6
Tween 20 / MLG	21.2± 1.2	3.2 ± 0.2	96.9	42.1	15.3 ± 1.0	1.5 ± 0.1	99.1	39.3

All measured lipid oxidation markers led to corroborating results, i.e. lipid oxidation developed in a lower extent in the single Tween 20-stabilized emulsion than in the surfactant mixture-stabilized ones. Table 2 and Fig. 2 indicate clearly that the development of lipid oxidation in the three emulsions differed mainly by the lag phases. The incorporation of Span 20 or MLG in Tween 20-stabilized emulsions decreased the length of the lag phase by around 30%, but did not change the oxidation rates as compared with the single Tween 20-stabilized emulsion. This implies that mixing Tween 20 with a co-surfactant accelerates the initiation step of lipid oxidation but does not modify the propagation step. The removal of 30% (molar) Tween 20 shortened the $t_{1/2}$ values by around 20% for oxygen uptake and by around 18% for the formation of CD in both Tween 20/Span 20- and the Tween 20/MLG-stabilized emulsions (Table 2). This result is in accordance with the work of Silvestre et al. (2000), who demonstrated that the oxidative stability of O/W emulsions stabilized with one single surfactant containing POE linear chains as headgroup (Brij 76 or Brij 700) was positively associated with the length of the POE chains (10 oxyethylene units for Brij 76 and 100 oxyethylene units for Brij 700).

To explain the shorter lag phase in the surfactant mixture-stabilized emulsions, we propose several hypotheses in the following. First, we considered the chemical properties of Tween 20 and co-surfactants that may be involved in oxidation phenomena. Second, we investigated the possible involvement of the physical heterogeneity of the interfacial layers.

3.2. Chemical reactivity of polyoxyethylene units

The oxidative behaviors of emulsions stabilized by either a Tween 20/Span 20 mixture or a Tween 20/MLG mixture were very similar. As the number of surfactant molecules at the interface, and therefore this of hydrophobic tails, increased when the surfactant mixtures were used as compared with Tween 20 alone, this strengthens the hypothesis that the hydrophobic tails of surfactants presumably have a negligible effect on lipid oxidation in emulsions (Chaiyasit et al., 2000). To explain the better oxidative stability in the single Tween 20stabilized emulsion than in the surfactant mixture-stabilized ones, the first hypothesis lies in the ability of Tween 20 molecules to undergo autoxidation through the cleavage of their POE chains (Kerwin, 2008). This cleavage leads to the formation of POE hydroperoxides, which was experimentally evidenced and quantified. Mancuso et al. (1999a) determined that fresh and old Tween 20 samples contained 16.8 µmol hydroperoxide per gram and 34.9 µmol hydroperoxide per gram, respectively. Our Tween 20 sample contained 24.3 µmol hydroperoxide per gram, which indicates that it could undergo further oxidation. As the total amount of POE chains was more important in the single Tween 20-stabilized emulsion than in the surfactant mixture-stabilized ones, these chains could have been the prior substrate of oxidation induced by the FeSO₄/EDTA catalyst, thus explaining the higher lipid oxidation delay. However, such an antioxidant effect is unlikely because the radical compounds formed through POE chain autoxidation are not stable, and would have therefore a subsequent prooxidative effect by favoring the radical chain reaction and thus the propagation step. The lipid oxidation rate, and thus the μ_1 and μ_2 values, would have then increased dramatically, which was not experimentally observed. Furthermore, previous work demonstrated a prooxidative effect of high-hydroperoxide Tween 20 in O/W emulsions (Mancuso et al., 1999a; Nuchi et al., 2001), which was related to the metal-catalyzed decomposition of surfactant hydroperoxides. The protective effect of the polar headgroups of Tween 20 through the formation of a chemical shield surrounding the oil droplets is therefore unlikely.

3.3. Physical properties of Tween 20/co-surfactant interfacial layers

The presence of co-surfactants with a much smaller headgroup in the Tween 20-stabilized interfacial layer surrounding the oil droplets results in the physical heterogeneity of the layer, making the oil substrate sterically more accessible to the water-soluble pro-oxidants. This heterogeneity could be more or less important according to the distribution of the co-

surfactant within the surfactant film as previously demonstrated for Tween 40/Span 40 mixtures (Pilpel & Rabbani, 1988) and Tween 80/Span 80 mixtures (Lu & Rhodes, 2000). To support or invalidate this hypothesis, Tween 20/co-surfactant-stabilized interfaces were reconstituted via Langmuir mixed monolayers at the air/water interface to study the interactions between surfactants and to deduce the distribution of Span 20 and MLG in Tween 20 layers. Fig. 3A and 4A show the surface-pressure isotherms obtained for pure Tween 20, pure co-surfactants (MLG or Span 20, respectively) and their mixtures in various proportions at the air/buffer interface. The mean molecular area (MMA) was widely larger for Tween 20 molecules than for co-surfactant ones, due to the branched POE chains on the sorbitan ring of Tween 20. For all isotherms, no sharp changes in the curves were observed, indicating that no transition to a solid phase occurred. This agrees with the relatively short hydrophobic tails (mainly C12:0), which enable the surfactants to form a liquid expanded film (Gaines, 1966; Peltonen & Yliruusi, 2000). The Tween 20/co-surfactant mixtures exhibited intermediate surface-pressure isotherms. To characterize the interactions between Tween 20 and cosurfactant molecules, the interfacial area covered by one molecule of Tween 20 in a pure Tween 20-stabilized emulsion was calculated according to the average droplet size and the amount of adsorbed Tween 20 at the oil/water interface in emulsions. The calculated MMA was 90 Å², which corresponded to a surface pressure of 16 mN m⁻¹. Then, we reported for all isotherms the MMA at this surface pressure as a function of the molar ratio of co-surfactant (MLG or Span 20) in the mixture (Fig. 3B and 4B, respectively). The obtained curves exhibited a positive deviation from the straight line joining the MMA of pure Tween 20 and pure co-surfactant. Gaines (1966) established that in either an ideal or a totally immiscible mixed composition film, the MMA varies linearly with the molar percentage composition. Deviations from the linear profile reflect either the exclusion from one component by the other (positive deviations), or the condensation of molecules in the film, showing attractive interactions (negative deviations). Therefore, repulsive interactions occurred between Tween 20 and co-surfactants in mixed films at the air/buffer interface (Fig. 5). These repulsive interactions were more important for Tween 20/MLG mixtures than for Tween 20/Span 20 ones as the positive deviation was more marked in the former case.



Fig. 3. A: Surface pressure-area isotherms for monolayers of Tween 20 (\diamond), monolauroyl glycerol (MLG) (\blacklozenge) or Tween 20/MLG mixtures (16.4% (\Box), 29.3% (\triangle), 61.5% (×), 78.8% (*), 89.7% (\bigcirc) or 97.1% (+), indicating the molar percentage of MLG in the monolayer, mol %). B: Average area (n = 1 to 4) covered per molecule at 16 mN m⁻¹ as a function of the molar percentage of MLG in the monolayer (mol %). The dotted curve represents the polynomial model adjusting the experimental data (R² = 0.93). The full curve joins linearly the average area obtained for both pure surfactants.



Fig. 4. A: Surface pressure-area isotherms for monolayers of Tween 20 (\diamond), Span 20 (\blacklozenge) or Tween 20/Span 20 mixtures (16.4% (\Box), 29.3% (\triangle), 61.5% (×), 78.8% (*), 89.7% (O) or 97.1% (+), indicating the molar percentage of Span 20 in the monolayer, mol %). B: Average area (n = 1 to 4) covered per molecule at 16 mN m⁻¹ as a function of the molar percentage of Span 20 in the monolayer (mol %). The dotted curve represents the polynomial model adjusting the experimental data (R² = 0.95). The full curve joins linearly the average area obtained for both pure surfactants.

These results are in accordance with the work of Lu & Rhodes (2000), who demonstrated that at air/water interfaces, Span 80 (sorbitan monooleate) was not easily miscible with Tween 80 (POE sorbitan monooleate). Strong repulsive interactions were also highlighted between Tween 40 (POE sorbitan monopalmitate) and Span 40 (sorbitan monopalmitate) at a sunflower oil/water interface (Pilpel & Rabbani, 1988). Although the interactions between mixed surfactants at an oil/water interface are presumably highly dependent on the nature of oil (Borwankar & Wasan, 1988), sunflower oil and rapeseed oil are very similar as they contain mainly triacylglycerols. Therefore, it is probable that the repulsive interactions observed between Span 20 and Tween 20 on the one hand and MLG and Tween 20 on the other hand at the air/buffer interface, also occur at the rapeseed oil/buffer interface. Thus, the co-surfactants would not be homogeneously dispersed in the film of Tween 20 at the interface. Span 20 and MLG would form separated domains from Tween 20, leading to a phase separation with possible low coverage of surfactants located at the junctions between the domains. In emulsions, the oil substrate would thus be more sterically accessible to the water-soluble pro-oxidants (reactive oxygen species, metal ions). Moreover, previous work suggested that Tween and Span molecules in mixed air/water interfaces could have their polar headgroup located at various depth in the aqueous phase, according to their different hydrophilicity, especially when the film pressure increased (Boyd et al., 1972; Pilpel & Rabbani, 1988). This could also contribute to increase the structure heterogeneity of the interface and thus the accessibility of oil to the water-soluble pro-oxidants.

From the surface-pressure isotherms, the surface coverage of Span 20 and MLG in the Tween 20/co-surfactant layers with a molar ratio of 30% of co-surfactant were determined. At the surface pressure of 16 mN m⁻¹, MMA of 32 Å² and 19 Å² were found for pure Span 20 and pure MLG. If the same coverage values were encountered at the oil/water interface in emulsions, Span 20 and MLG would cover 13.9% or 8.1% of the available interfacial area, given that emulsions contained 30% oil (w/w) and the average droplet size was 1.5 μ m. This calculation considers that almost all the co-surfactant molecules were located at the interface in emulsions, which was demonstrated for MLG (Berton et al., 2011a) and probably applies also for Span 20 as the molecule exhibits as well low water solubility and HLB. It can then be concluded that the replacement of low proportions (8 to 14%) of the interfacial area covered with Tween 20 by co-surfactants in emulsions resulted in a substantial decrease of their oxidative stability.



Fig. 5. Summary scheme of the possible organization and interactions within surfactant monolayers at the air/water interface: Tween 20 (A), Tween 20/Span 20 mixture (B) and Tween 20/MLG mixture (C). Arrows represent repulsive interactions.

4. Conclusion

This study demonstrates that mixing Tween 20 with co-surfactants possessing a smaller headgroup leads to a decrease of the oxidative stability of O/W emulsions containing PUFA. All tested surfactants contained the same hydrophobic tail but various headgroup size and composition. The chemical barrier provided by the oxidizable POE chains carried by the headgroup of Tween 20 molecules is unlikely as the subsequent formed radical species would rather favor the development of lipid oxidation. The study of reconstituted Langmuir monolayers highlights that repulsive interactions occur between Tween 20 and co-surfactants at the air/water interface. Such repulsive interactions could presumably occur as well at the

rapeseed oil/water interface in emulsions. The co-surfactants would then not be homogeneously distributed within the Tween 20 layer, creating areas where the interfacial layer is thinner, and junctions where the coverage of the interface is less dense. These areas and junctions could therefore promote the contacts between the oil substrate containing PUFA and the water soluble prooxidants.

Acknowledgements

The financing of this work and Ph.D grant of CB by INRA and Région Pays de la Loire is gratefully acknowledged.

4.2. Effet de la modulation de la structure d'interfaces protéiques sur l'oxydation des lipides en émulsion (Article 6)

Dans cette étude, l'oxydation des lipides a été étudiée dans des émulsions stabilisées par la β lactoglobuline dont la conformation a été modifiée *pre* émulsification, ou par des mélanges de protéines (β -lactoglobuline ou β -caséine) et d'un phospholipide, la dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC). Les interfaces mixtes protéines/DLPC ont été reconstruites sur des interfaces air/eau puis prélevées sur support solide avant d'être caractérisées physiquement par microscopie à force atomique (AFM). Les informations obtenues en termes d'ultrastructure des films reconstitués sont discutées en lien avec la stabilité oxydative des émulsions correspondantes.

Effect of Structural Modifications of Protein-Stabilized Interfaces on Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions

En préparation pour soumission à Journal of Agricultural and Food Chemistry

Claire Berton, Claude Genot, Cédric Gaillard, Dominique Guibert and Marie-Hélène Ropers*

INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44316 Nantes, France

ABSTRACT

The oxidative stability of oil-in-water (O/W) emulsions is highly dependant on the type of emulsifier. As interfaces stabilized by native proteins have been recently shown to protect less efficiently emulsified lipids against oxidation than the surfactant-stabilized interfaces, we attempted in this work to improve the barrier properties of protein-stabilized interfacial layers by controlled modifications of their composition and structure.

O/W emulsions of similar droplet size distribution were stabilized by minimum amounts of bovine β -lactoglobulin (BLG) or β -casein (BCN) and oxidized at 25 °C in the presence of equimolar iron-EDTA complex. Thermally denaturated BLG did not modified oxidation as shown by oxygen uptake and formation of conjugated dienes. In contrast, aggregated BLG tended to decrease lipid oxidation, especially formation of volatile compounds. The incorporation of dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC) at the interface did not either improve the protective role of the protein-stabilized interfaces. The protein interfacial layers reconstituted as Langmuir-Blodgett films and scrutinized by atomic force microscopy (AFM) revealed interfacial heterogeneity and strengthened the hypothesis that it is a key factor in controlling lipid oxidation.

KEYWORDS

Oil-in-water emulsion; Lipid oxidation; Interfacial layer; Protein; Protein heat-denaturation; Protein aggregates; Interface heterogeneity; Phospholipid.

INTRODUCTION

Oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is a major cause of deterioration of food quality. In food emulsions, the interfacial region, which is the contact region between the dispersed lipids and the aqueous phase, represents a critical area for oxidation development. Surface-active compounds (emulsifiers, polar lipid oxidation products, amphiphilic antioxidants) that adsorb at the oil/water interface influence noticeably lipid oxidation (Genot et al., 2003; Waraho et al., 2011b). In recent work, protein-stabilized interfaces have been shown to protect emulsified lipids against oxidation generally less efficiently than surfactant-stabilized interfaces (Berton et al., 2011b; Berton et al., in press). Proteins being widely used as emulsifiers in food products, developing strategies which could improve their protective effect against lipid oxidation when located at the oil/water interface in O/W emulsions seems relevant.

Transglutaminase-catalyzed cross-linking of interfacial proteins was one solution tested in previous studies. The treatment prevented casein displacement by surfactants from the emulsion droplet surface but these emulsions did not present increased oxidative stability as compared to untreated emulsions (Kellerby et al., 2006a). Heat-denaturation of whey proteins or β -lactoglobulin (BLG) performed *post* emulsification did not improve the oxidative stability of emulsions (Kellerby et al., 2006b) or even slightly increased the rate of oxidation (Djordjevic et al., 2004). In contrast, heat-denaturated BLG added in the aqueous phase of surfactant-stabilized emulsions protected better the oil phase against oxidation as compared with native BLG (Elias et al., 2007). As unfolded proteins spread better at the interface (Dickinson, 1992), the heat-denaturation of proteins prior to emulsification could be a good strategy to overcome the poor protecting effect of native BLG against lipid oxidation (Berton et al., 2011b; Berton et al., in press). A recent study proved that co-surfactants partially displaced proteins from the interface and did not improve the oxidative stability of emulsions (Richards et al., 2011). Another possible pathway could be to use of phospholipid/protein mixed interfaces, as phospholipids can exert an antioxidant role in multiphase systems (Fomuso et al., 2002a; Frankel, 2005; Haahr & Jacobsen, 2008; Helgason et al., 2009).

In this study we attempted to improve the barrier properties of protein-stabilized interfacial layers and their ability to protect the lipid phase of O/W emulsions by controlled modifications of their composition and structure. For this purpose, we used optimized emulsions in which the amounts of proteins were minimized to get physically stable emulsions keeping concentrations of unadsorbed proteins as low as possible (Berton et al., 2011a). Tested proteins were BLG and β -casein (BCN). A first set of experiments consisted

in emulsions stabilized either with native BLG, heat-denatured BLG or partially aggregated BLG. A second set of experiments was based on oxidation in emulsions stabilized by mixed protein/dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC) interfacial layers. Lipid oxidation was measured by methods allowing a characterization of the different stages of the reaction: oxygen (O₂) consumption, formation of conjugated dienes (CD) and formation of selected volatile compounds. To approach the structure of the involved interfacial layers we reconstructed the interfacial films involved in the protein/DLPC-stabilized emulsions at air/water interfaces and analyzed the structure of the Langmuir-Blodgett films with atomic force microscopy (AFM). We finally attempted to link lipid oxidation in emulsions and interfacial layer organization.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Rapeseed oil was purchased in a local supermarket. It was stripped by means of alumina (MP Alumina N-Super I, MP Biomedicals, France) to eliminate impurities and tocopherols (Berton et al., 2011a). Stripped oil contained less than 2 µg residual tocopherols per g oil and 0.34 µmol hydroperoxides per g oil. BCN (purity \geq 98%) was purchased from Lactalis (France). β-lactoglobulin (BLG) has been purified at the laboratory from Prolacta 90 (Lactalis) by selective precipitation (Mailliart & Ribadeau-Dumas, 1988). Dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC), 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES), ethylenediaminetetraacetic acid calcium disodium salt (EDTA), iron(II) sulfate heptahydrate (FeSO₄) were purchased from Sigma Aldrich (France). Sodium chloride (NaCl) was purchased from Fluka Chemika (France). Isopropanol, dichloromethane and chloroform of HPLC grade were purchased from Carlo Erba (France). The buffer was composed of PIPES (10 mM), NaCl (80 mM) and adjusted at pH 6.7.

Solutions of denaturated or partially aggregated BLG. Denaturated BLG was obtained by heating a solution of native BLG in ultra-pure water (10 g L^{-1}) at 80 °C for 45 min under moderate magnetic stirring. After being cooled to ambient temperature, the solution was half-diluted in a twice-concentrated buffer (PIPES 20 mM, NaCl 160 mM, pH 6.7).

The solution of partially aggregated BLG (10 g aggregates per 100 g total BLG) was prepared by mixing 1 volume of a solution of native BLG (9 g L^{-1} in PIPES 10 mM, NaCl 80 mM buffer, pH 6.7) and 1 volume of a solution containing 1 g L^{-1} of BLG aggregates. These aggregates have been prepared by heat treatment in the presence of NaCl as described by Rullier et al. (2008) and had an average hydrodynamic radius of 35 nm as determined by dynamic light scattering.

Preparation and physical characterization of O/W emulsions. The day before emulsion preparation, protein solutions were prepared in the buffer and gently stirred overnight at 4 °C. In the presence of DLPC, the proportions of each emulsifier had been chosen to theoretically cover 90% of the interfacial area with the protein and the remaining 10% of the interfacial area with DLPC. DLPC was incorporated in the oil after being dissolved in dichloromethane. The solvent was evaporated under nitrogen flow at 35 °C for 1 h. The absence of trace solvent was checked by solid-phase microextraction (SPME) coupled with gas chromatography (GC) as previously detailed (Berton et al., 2011b). The final concentration of DLPC was 64 mg per 100 g oil. Final concentrations of proteins in aqueous solutions are indicated in **Table 1**.

O/W emulsions were prepared as described by Berton et al. (2011a). Briefly, 30 g oil and 70 g aqueous solution were premixed for 3 min at 15000 rpm using the rotor-stator homogenizer (Polytron PT 3000, Kinematica, Littau, Switzerland). The coarse emulsions were then homogenized through a one-stage low-pressure valve homogenizer (A0812W-A-CD, Stansted Fluid Power, Stansted, UK) for 10 min at 50 bar. The size distribution of oil droplets in the emulsions was measured immediately after homogenization with a laser light scattering instrument (Saturn 5200, Micromeritics, Verneuil en Halatte, France) and after 48 h of incubation. The concentration of unadsorbed proteins in the aqueous phase of emulsions was measured in freshly prepared emulsions or after 48 h of incubation as previously described (Berton et al., 2011a). Briefly, aliquots of emulsions were centrifuged to separate the aqueous phase from oil droplets. The aqueous phase was collected and filtered through cellulose acetate 0.45, 0.20 and 0.10-µm filters (Minisart High-Flow, Sartorius, Germany) to remove the remaining small oil droplets. The amount of unadsorbed proteins was determined according to the method described by Markwell et al. (1978).

Main emulsifier	Concentration of main emulsifier in aqueous solution (g L ⁻¹)	Co-emulsifier	Mass ratio of co-emulsifier (R _{mass} , %)	Molar ratio of co-emulsifier (R _{mol} , %)
BLG	5.0	-	-	-
BLG	4.5	BLG aggregates	10%	10%
Denaturated BLG	5.0	-	-	-
BLG	4.6	DLPC	6%	65%
BCN	5.0	-	-	-
BCN	4.5	DLPC	5%	69%

Table 1. Proteins or protein/co-emulsifier mixtures used to prepare O/W emulsions.

Incubation of O/W emulsions. Emulsions were incubated in the presence of an oxidation catalyst constituted of an equimolar mixture of FeSO₄ and EDTA (1/1, M/M, final concentration in emulsions 200 μ M), as previously described (Berton et al., 2011b). Aliquots (3 ml) of emulsions were distributed in 20.5-ml headspace vials hermetically sealed. The vials were rotated at 25 °C, in the dark at 5 rpm for 72 h with a test tube rotator oriented at 30° *versus* the vertical position.

Measurements of lipid oxidation. Oxygen uptake was determined as described by Villière et al. (2005) and Berton et al. (2011b). GC analysis of headspace samples was performed with a HP 5890 - series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Böblingen, Germany) coupled to a fused silica plot column (Molsieve 5A CP7535, length 10 m, internal diameter 0.32 mm, Varian, Les Ulis, France) and to a thermal conductivity detector. Results were expressed in millimoles of consumed oxygen per kg oil (mmol O_2 kg⁻¹ oil).

The formation of conjugated dienes (CD), which are primary oxidation products, was determined according to the method described by Lethuaut et al. (2002) and Berton et al. (2011b). Aliquots of emulsions were diluted in isopropanol. The following solutions were centrifuged and the absorbance of the supernatants was measured at 233 nm with a UV-visible spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 12, Norwalk, CT, USA). Reference cell contained isopropanol and buffer in the same proportions as in the final dilution of the samples. Results were expressed in millimoles of equivalent hydroperoxides per kg oil (mmol eq HP kg⁻¹ oil) with 27000 M⁻¹ cm⁻¹ as the molar extinction coefficient of CD at 233 nm.

To evaluate the formation of secondary oxidation products, the formation of two volatile compounds, namely propanal and hexanal, in the headspace of the samples was followed. These compounds were quantified by GC coupled to a flame ionization detector (FID) and to SPME according to the procedure described by Berton et al. (2011b).

Monolayer surface pressure-area isotherms. Experiments were carried out on the buffer as subphase. Surface pressure-area isotherms for proteins (BLG or BCN), DLPC and BLG/DLPC or BCN/DLPC mixtures were obtained with a Langmuir film balance (Langmuir KSV 3000, KSV Instruments, Helsinki, Finland) thermostated at 25°C. Protein layers were formed by spreading the protein buffered solution at 1 g L⁻¹ whereas the DLPC layer was formed from a chloroform solution at 0.1 g L⁻¹. We formed mixed layers of protein and DLPC by spreading first DLPC and after 30 min the aqueous solution of protein. The volumes of

protein and DLPC solutions have been calculated to correspond to the proportions applied in emulsions. Thirty min were allowed for the monolayer to equilibrate. The surface pressure of the monolayer was measured using a platine Wilhelmy plate (21.2 mm-perimeter). The monolayer was compressed by Teflon barrier moving at 10 mm min⁻¹.

Preparation of Langmuir-Blodgett films. Protein or protein/DLPC films were transferred on mica substrate by the Langmuir-Blodgett method. First, mica was freshly cleaved then immersed in the trough filled by the buffer. The films were formed as previously described and were compressed until the desired pressure. Film transfer onto the mica substrate was performed at constant surface pressure and a 4 mm min⁻¹-speed. The transferred films were dried and stored in a desiccator at room temperature.

AFM data acquisition and analysis. Atomic force microscopy images of the Langmuir-Blodgett films were obtained in dry tapping or contact mode using Autoprobe CPI Park Scientific Instruments (Sunnyvale, US). Images were recorded using conventional pyramidal silicon nitride probe RTESPA-CP, k-20 N m⁻¹ (Digital Instruments, Santa Barbara, US). Scanning force was less than 10 nN to minimize the deformation of the sample (soft phase). Resolution was set to 256×256 pixels². Deflection signal was determined by the first derivative of the topographic signal. The images were analyzed by WSxM 4.0 software (Nanotec Electronica, Spain).

Experimental design and data treatment. Lipid oxidation was followed in two emulsions prepared independently for each formulation, except for emulsions stabilized with denaturated or partially aggregated BLG in which lipid oxidation was followed only once. At each aging time, oxygen uptake was measured in 2 vials, with three headspace sampling per vial; CD were measured in one vial, with three sampling per vial; volatile compounds were analyzed in one vial, with one sampling per vial.

Monolayer surface pressure-area isotherms were established between 2 and 4 times for proteins, DLPC or protein/DLPC mixtures. For AFM measurements, each sample was investigated at least in five different areas with various magnification to ensure a good representativeness.

Oxygen uptake and CD formation curves were adjusted applying a modified-Gompertz equation as previously described (Berton et al., 2011b). The equation uses two variables L and μ that characterize the initiation and propagation stages of lipid oxidation, respectively. The

indices 1 or 2 were apposed to *L* and μ to differentiate between the oxygen uptake and the CD formation, respectively. The variables were estimated by non linear regression and were finally used to calculate the times (t_{1/2 (1)} and t_{1/2 (2)}, h) needed to consume half the maximum oxygen uptake or to form half the maximum CD value.

RESULTS

Physical characterization of emulsions. Emulsions stabilized with BLG or BCN had similar particle size distributions, whatever the protein conformational state (native, denaturated or partially aggregated) and the presence of DLPC (**Table 1**). At t_0 , the average $[d_{3,2}]$ was comprised between 1.4 and 1.8 µm for all emulsions. Although some of the BLG-based emulsions exhibited a slight increase of the average $[d_{3,2}]$, the particle size distributions remained overall constant during the incubation period.

In the BLG-stabilized emulsions (native, denaturated or partially aggregated), the unadsorbed BLG concentration ranged from 1.33 to 1.52 g L⁻¹ (**Table 2**), which corresponded to approximately 27 to 30% of the total available BLG remaining unadsorbed in the aqueous phase of the emulsion. In the presence of DLPC, the proportion of unadsorbed BLG remained constant. The proportion of unadsorbed BLG was thus neither substantially affected when heat treatments were applied to the protein solutions prior to the emulsification, nor when BLG was mixed with DLPC. We showed in previous work that the proportion of unadsorbed BLG in the same native BLG-stabilized emulsion did not change significantly along an incubation period in conditions similar to those applied in the present study (Berton et al., 2011a). In the present work, the same trends were observed whatever the emulsion formulation, i.e. the proportion of unadsorbed BLG remained constant after 48 h of incubation for all BLG-based emulsions (**Table 2**).

In the BCN-stabilized emulsions, roughly 9% of the total available protein remained unadsorbed in the aqueous phase, which corresponded to around 0.5 g L^{-1} unadsorbed BCN (Berton et al., 2011a). The initial proportion of unadsorbed BCN was not affected by the presence of DLPC. Regardless of the presence of DLPC, the proportion of unadsorbed BCN increased significantly during the incubation period, indicating some protein desorption.

Table 2. Physical characteristics of the emulsions stabilized with native, modified proteins or protein/phospholipid mixtures. Values of protein concentration in the aqueous phase of emulsions and of $[d_{3,2}]$ represent the mean and standard deviations of at least triplicate analysis, unless otherwise stated.

Emulsion	[d _{3,2}] (µm)		Protein conc aqueous phase (g I	tentration in te of emulsion (2^{-1})	Proportion of unadsorbed proteins	
	t_0	t = 48h	t_0	t = 48h	t_0	t = 48h
BLG	1.5 ± 0.1 ^b	2.1 ± 0.1^{b}	1.52 ± 0.09^{a}	1.16 ± 0.14	30.4%	23.2%
Partially aggregated BLG	1.4 ^c	1.6 ^c	1.33 ± 0.18	1.18 ± 0.15	26.6%	23.6%
Denaturated BLG	1.6 ^c	2.1 °	1.47 ± 0.06	1.49 ± 0.22	29.4%	29.8%
BLG/DLPC	1.8 °	2.2 °	1.40 ± 0.19	1.42 ± 0.08	30.4%	30.9%
BCN	1.7 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.1 ^b	0.45 ± 0.12^{a}	0.99 ± 0.03	9.0%	19.8%
BCN/DLPC	1.8 °	1.8 °	0.42 ± 0.12	1.15 ± 0.18	9.3%	25.6%

^a Data from Berton et al. (2011a).

^b Data from Berton et al. (2011b).

^c Mean of two determinations.

Oxidative stability of emulsions stabilized with native, denaturated or partially aggregated BLG. The development of lipid oxidation in emulsions stabilized with native, denaturated or partially aggregated BLG as described by different markers is presented in Figure 1. In the three emulsions, oxygen uptake started almost immediately from the beginning of the incubation period and developed until a plateau corresponding to around 134 mmol O_2 kg⁻¹ oil (**Figure 1A**). The oxygen uptake curves were very similar for the native BLG- and heat-denaturated BLG-stabilized emulsions, whereas oxygen uptake seemed to develop slightly slower in the partially aggregated BLG-stabilized emulsion. The lag phases estimated before the beginning of oxygen uptake (L_1) were very short for the three emulsions, between 0.9 to 3.3 h (**Table 3**). The estimated rates of oxygen uptake (μ_1) were slightly lower in the emulsions stabilized with heat-denaturated or partially aggregated BLG as compared with the native BLG-stabilized one (5.3; 4.5 and 6.1 mmol O_2 kg⁻¹ oil h⁻¹, respectively) (Table 3). The calculated time to reach half the maximum oxygen uptake $(t_{1/2})$ can be considered as a global indicator of the oxidative stability of emulsions. From this indicator, the three emulsions can be ranked in the increasing order of oxidative stability as follows: Heat-denaturated BLG ($t_{1/2 (1)} = 13.5 h$) < Native BLG ($t_{1/2 (1)} = 14.4 h$) < Partially aggregated BLG ($t_{1/2(1)} = 16.2$ h).

Similar trends were observed through the measurement of CD formation (**Figure 1B**). In the three emulsions, CD formation started almost from the beginning of the incubation period. CD formation increased until a plateau corresponding to around 80 mmol eq HP kg⁻¹ oil. The kinetics of CD formation occurred very similarly in the native BLG- and denaturated BLG-stabilized emulsions, whereas it seemed slightly slower in the partially aggregated BLG-stabilized emulsion. The lag phases estimated before the beginning of CD formation (L_2) were as well very short for the three emulsions, between 1.4 and 2.9 h (**Table 3**). Considering both the estimated rate of CD formation (μ_2) and the subsequent time to reach half the maximum CD amount ($t_{1/2}$ (2)), the three emulsions could be ranked in the increasing order of oxidative stability as follows: Heat-denaturated BLG < Native BLG < Partially aggregated BLG.

Formation of the volatile compounds propanal and hexanal emphasized the above-mentioned trends (**Figure 1C**, **D**). These two compounds developed very rapidly in the heat-denaturated BLG- and native BLG-stabilized emulsions during the first hours of incubation, reaching around 300 μ mol propanal kg⁻¹ oil and 40 μ mol hexanal kg⁻¹ oil after 10 h of incubation. Over 10 h, the formation of volatile compounds became even more important in the heat-denaturated BLG-stabilized emulsion than in the native BLG-stabilized one. The formation of volatile compounds in the partially aggregated BLG-stabilized emulsion started as well from the beginning of the incubation period, but clearly slower: after 10 h of incubation, only 100 μ mol propanal kg⁻¹ oil and 20 μ mol hexanal kg⁻¹ oil were formed. In the three emulsions, the formation of propanal and hexanal developed until a plateau after which their amount stabilized or even decreased slightly. From the formation of propanal and hexanal, the three emulsions can again be ranked in the increasing order of oxidative stability as follows: Heat-denaturated BLG < Native BLG < Partially aggregated BLG.



Figure 1. Oxygen uptake (A), formation of CD (B) and volatile compounds (C, propanal; D, hexanal) during the incubation of emulsions stabilized with native BLG (\blacktriangle), heat-denaturated BLG (\diamond) or partially aggregated BLG (\bigcirc), at 25 °C, in the dark, with FeSO₄/EDTA (1/1 M/M 200 μ M). In panels A and B, the dotted curves correspond to the adjusted curves drawn with the *L* and μ parameters estimated for each emulsion (**Table 3**). Error bars represent the standard deviations for oxygen uptake and CD measurements.

Oxidative stability of emulsions stabilized with protein/phospholipid mixtures. The development of oxygen uptake in the emulsions stabilized with BLG, BLG/DLPC mixture, BCN or BCN/DLPC mixture is presented in **Figure 2A**. In the BLG/DLPC emulsion, oxygen uptake seemed to start earlier than in BLG-stabilized emulsion. This was confirmed by the estimated kinetic parameters (**Table 3**), which highlighted that the lag phase lasted 1.4 h in the BLG/DLPC-stabilized emulsion instead of 3.3 h in the pure BLG-stabilized emulsion. The rates of oxygen uptake were however similar (6.4 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹ and 6.1 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹). In the BCN-stabilized emulsion, no oxygen was consumed during the first hours of incubation ($L_1 = 15$ h), after which oxygen uptake developed rather slowly (3.3 mmol O₂ kg⁻¹ oil h⁻¹). The use of BCN/DLPC mixture instead of BCN to stabilize emulsions resulted in a faster development of oxygen uptake. The lag phase was markedly shortened ($L_1 = 4.4$ h) but the rate of oxygen uptake was not affected. In both BLG- and BCN-stabilized emulsions, the addition of DLPC increased the oxygen uptake.

Lower differences between the oxidative stability of these four emulsions were observable considering the formation of CD (**Figure 2B**). CD were produced in a very similar manner in BLG- and BLG/DLPC-stabilized emulsions, which exhibited very close L_2 , μ_2 and $t_{1/2}$ (2) values (**Table 3**). Formation of CD seemed to start later in the BCN/DLPC-stabilized emulsion ($L_2 = 7.3$ h) as compared to the pure BCN-stabilized one ($L_2 = 2.5$ h), but developed then clearly faster (2.6 mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹ instead of 1.7 mmol eq HP kg⁻¹ oil h⁻¹). As a consequence, the $t_{1/2}$ (2) values were close in both emulsions (20.5 h and 22.2 h, respectively). According to the formation of CD, the addition of DLPC slightly decreased the oxidative stability of BLG- and BCN-stabilized emulsions.

The amounts of propanal and hexanal produced in the four emulsions were higher when DLPC was present in the emulsion, in agreement with the higher consumption of oxygen.



Figure 2. Oxygen uptake (A), formation of CD (B) and volatile compounds (C, propanal; D, hexanal) during the incubation of emulsions stabilized with BLG (\blacktriangle), BCN (\blacksquare), BLG/DLPC mixture (\triangle) or BCN/DLPC mixture (\square), at 25 °C, in the dark, with FeSO₄/EDTA (1/1 M/M 200 μ M). In panels A and B, the dotted curves correspond to the adjusted modified-Gompertz model drawn with the *L* and μ parameters estimated for each emulsion. Error bars represent the standard deviations for oxygen uptake and CD measurements.

Table 3. Lag periods (L_1 and L_2) and rates of oxygen uptake (μ_1) and of CD formation (μ_2) for the emulsions. Asymptote confidence intervals for L and μ values were calculated with a 95% significance level. Correlation coefficients (\mathbb{R}^2) indicate the percentage of dispersion explained by the adjusted model. $t_{1/2}$ (1) and $t_{1/2}$ (2) are incubation times calculated with the model when half the maximum oxygen uptake or CD formation was reached, respectively.

	Oxygen uptake parameters				CD formation parameters			
	L_1 (h)	$\mu_1 \text{ (mmol} \ \mathrm{O}_2 \mathrm{kg}^{-1} \mathrm{oil} \ \mathrm{h}^{-1} \text{)}$	R² (%)	$t_{1/2 (1)}$ (h)	L_2 (h)	$\mu_2 \text{ (mmol eq}$ HP kg ⁻¹ oil h ⁻¹)	R² (%)	t _{1/2 (2)} (h)
BLG	3.3 ± 0.4	6.1 ± 0.2	98.3	14.4	1.4 ± 1.5	2.4 ± 0.2	94.2	13.8
Partially								
aggregated	1.3 ± 0.8	4.5 ± 0.3	98.4	16.2	2.9 ± 1.1	2.1 ± 0.1	98.9	17.9
BLG								
Heat-								
denaturated	0.9 ± 0.5	5.3 ± 0.3	99.2	13.5	2.4 ± 0.9	2.8 ± 0.2	98.9	13.6
BLG								
BLG/DLPC	1.4 ± 0.4	6.4 ± 0.3	98.6	11.8	1.0 ± 1.0	2.7 ± 0.2	97.0	13.4
BCN	15.0 ± 0.8	3.3 ± 0.1	96.9	35.6	2.5 ± 1.9	1.7 ± 0.2	90.1	22.2
BCN/DLPC	4.4 ± 2.0	3.3 ± 0.3	89.2	24.7	7.3 ± 2.7	2.6 ± 0.4	91.9	20.5

AFM characterization of protein- and protein/DLPC mixture-stabilized interfacial layers. In order to investigate the modifications in the protein layers induced by the addition of DLPC, the reconstituted Langmuir-Blodgett protein or protein/DLPC films were studied by AFM. The surface pressure at which the Langmuir films were transferred onto mica was determined from the surface pressure-area isotherms, so that it corresponded to the surface area covered by proteins in the emulsions. From the average oil droplet size and the concentration of unadsorbed proteins in the aqueous phase of emulsions, we calculated the surface load of BLG and BCN in emulsions (Γ , mg m⁻²) and the surface area covered by both proteins in emulsions (A, nm² per molecule or Å² per molecule).

$$\Gamma = \frac{(m_0 - m_1) \times V_{\text{droplet}} \times \rho}{s_{\text{droplet}} \times m_{\text{oil}}}$$
(1)

where m_0 is the protein mass initially introduced in a given mass of emulsion, m_1 is the mass of unadsorbed proteins is the same amount of emulsion, $V_{droplet}$ is the average droplet volume calculated from the average $[d_{3,2}]$, ρ is the density of stripped rapeseed oil ($\rho = 0.92$, from Zhang et al., 2006), $s_{droplet}$ is the average droplet surface calculated from the average $[d_{3,2}]$ and m_{oil} is the mass of oil in the considered amount of emulsion.

$$A = \frac{1}{\Gamma} \times \frac{M}{N} \tag{2}$$

where Γ is the protein surface load (g nm⁻² or g Å⁻²), M is the protein molecular weight (g mol⁻¹) and N is the Avogadro constant.

Calculated Γ values were 1.8 mg m⁻² and 2.9 mg m⁻² for BLG and BCN, respectively. Corresponding *A* values were 17.4 nm² per molecule and 13.6 nm² per molecule, respectively. Knowing the amount of proteins spread onto the Langmuir through, we determined through the surface pressure-area isotherms that the surface pressure at the air/water interface corresponding to the surface coverage of BLG and BCN in emulsions was 15.8 N m⁻¹ and 21.2 N m⁻¹, respectively. These surface pressure values were consequently applied during the transfer of protein layers onto mica.

Figure 3 presents the investigation of the structure of the BLG, BLG/DLPC, BCN and BCN/DLPC Langmuir-Blodgett films by AFM. For each image, a height profile was drawn from a transversal line across the sample surface. The three-dimensional images reported in Figure 3 have dimensions of $2 \times 2 \,\mu m$, which is in the same range as the surface of the emulsion droplets ($[d_{3,2}]$ between 1.4 and 2.2 µm). The specificities of each film, described in the following paragraph, were checked and confirmed in several areas of the film, with various magnification (images from $50 \times 50 \,\mu\text{m}$ to $1 \times 1 \,\mu\text{m}$). The four films had a rather compact structure, with various topology. BLG formed continuous films containing numerous small particles of around 1 to 2 nm height, and less frequent but larger particles up to 10 nm height (Figure 3A). When DLPC was incorporated inside the BLG film, the larger particles were still found; however, the global ultrastructure of the BLG/DLPC film exhibited a granular texture organized as a network of grains (1-2 nm height) which were wider than the small particles found in the single BLG film, as highlighted by the topography profile (Figure **3A**, right). Thus, incorporation of DLPC led to a less homogeneous texture of the BLG film. Contrary to BLG, BCN formed very compact and continuous films with a few large particles up to 50 nm height (Figure 3B). When DLPC was incorporated inside the BCN layer, the large particles were still observed. However, the BCN/DLPC film distinguished from the single BCN one by the appearance of numerous smaller particles regularly distributed within the compact protein layer. These particles were rather small (1-2 nm height) and well individualized. Their presence disrupt punctually the homogeneity of the BCN film, as highlighted by the appearance of narrow height peaks in the topography profile (Figure 3B, right). Thus, for both protein layers (BLG or BCN), the incorporation of DLPC seems to induce some heterogeneity in the Langmuir-Blodgett film.



Figure 3. Topography AFM images (left) and height profiles (right) of Langmuir-Blodgett films of (A) BLG or BLG/DLPC mixture and (B) BCN or BCN/DLPC mixture. The height profiles correspond to the variation of the sample surface roughness across a transversal line from **a** to **b** or from **c** to **d**.

DISCUSSION

Effect of thermal modifications of interfacial BLG on the oxidative stability of emulsions. Considering all markers of lipid oxidation, especially volatile compounds, the unfolding of the protein obtained *via* a heat treatment decreased slightly the oxidative stability of the emulsion. Heat-denaturation of whey proteins takes place between 60 °C and 80 °C and results mainly from the breaking of low energy interactions (hydrogen bonds, hydrophobic or Van der Waals interactions) (Cayot & Lorient, 1998). It results in a substantial change of the secondary structure of the protein with an early loss of β -sheet (Fang & Dalgleish, 1997). Thus we expected that the interface would have been more homogeneously covered by the denaturated protein as compared to the globular native one and would have exhibited enhanced barrier properties. In our experiment, the partial unfolding of BLG induced by the heat-treatment prior to the emulsification did not improve the oxidative stability of the emulsion as compared to the native BLG-stabilized one. Accordingly, previous results showed that the heat-denaturation of whey proteins or pure BLG performed post emulsification did not improve the oxidative stability of emulsions (Kellerby et al., 2006b) or even slightly increased the rate of oxidation (Djordjevic et al., 2004). This result might be related to the modification of the exposed amino acid residues induced by the protein denaturation (Voutsinas et al., 1983). Heat-denaturated BLG in the aqueous phase of surfactant-stabilized emulsions was found to protect better the oil phase against oxidation as compared with native BLG (Elias et al., 2007). It was attributed to an improved accessibility of radical scavenging amino acid residues, leading to a facilitated access of free radicals to the aqueous phase proteins and their subsequent deactivation. In our case, the concentration of BLG in the aqueous phase of emulsions was low and the main part of the protein in emulsions was located at the interface surrounding the oil droplets. Thus, the free radicals produced by the iron-EDTA complex would have limited chance to be desactivated by interaction with the protein in the aqueous phase before reaching an oil droplet. At this step one may assume that the possible increased access of free radicals to denaturated adsorbed proteins might have favored the oxidative modifications of proteins that have been shown to precede lipid oxidation *stricto sensu* (Salminen et al., 2010; Berton et al., unpublished results).

In contrast to the results obtained with heat-denaturated BLG, the use of partially heataggregated BLG (90% wt native BLG mixed with 10% wt 35-nm BLG aggregates) improved their oxidative stability, especially regarding the formation of volatile compounds. To our knowledge, there are no data about the partial aggregation of proteins and its impact on lipid oxidation in emulsions. The mixture of native BLG with BLG 35-nm aggregates (up to 96%) improved the protein foaming properties as compared to the native protein alone (Rullier et al., 2008). It was suggested that in such a mixed film, native proteins would adsorb rapidly to the interface; aggregates would adsorb more slowly, reinforcing the interfacial protein film already formed. Assuming that the reinforced interfacial protein film would have developed a barrier property, the diffusion of metal ions and volatile compounds would have been limited. Indeed, the volatile compounds produced in the oil phase should cross the interfacial layer, diffuse in the aqueous phase before partitioning between the aqueous and gas phase, to finally be detected in the headspace of the emulsion.

Consequence of phospholipid incorporation in the protein film structure on lipid oxidation in emulsions. The measurement of lipid oxidation in emulsions stabilized with BLG and BCN, used alone or mixed with DLPC, demonstrates the prooxidant effect of the protein/DLPC mixed interface as compared with the interface composed of proteins alone. The phenomenon was the most obvious for BCN. It was amplified as regards to the formation of volatile compounds, which suggests that the presence of DLPC in the protein-stabilized interfacial layers would favor the last stages of lipid oxidation, i.e. the decomposition of primary oxidation compounds into secondary products. This result was not expected as phospholipids have been previously reported to exert an antioxidant activity in O/W emulsions (Fomuso et al., 2002a; Frankel, 2005; Haahr & Jacobsen, 2008). It can be hypothesized that when mixed with interfacial proteins, phospholipids induce modifications of the physical structure of the interfacial layer, which could favor the accessibility of the oil phase substrate to the water soluble prooxidants such as free radicals and metal ions. Reconstitution of the interfacial layers involved in the emulsions through Langmuir-Blodgett films and subsequent AFM characterization of the films evidenced that the incorporation of DLPC within either BLG or BCN layers decreased the homogeneity of the film structure. In the case of BLG, the film texture became more coarse-grained and less continuous. In the case of BCN, we observed the appearance of small particles presumably corresponding to small aggregates emerging from the continuous protein film. The increased heterogeneity in the mixed films determined through AFM suggests the formation of protein and DLPC separated domains. The addition of phospholipids and more generally of low molecular weight emulsifiers in protein-stabilized interfaces results in tremendous modifications of the film structure or/and in the orogenic displacement of proteins (Caro et al., 2009; Fang & Dalgleish, 1993a; He et al., 2008; Mackie et al., 2000; Sanchez et al., 2005; Wilde et al., 2004).

However, our data show that protein displacement was limited as the presence of DLPC did not affect substantially the concentrations and proportions of unadsorbed proteins in emulsions, both for BLG and BCN. Indeed, proteins remained adsorbed at the interface as the orogenic displacement of proteins is less marked with phospholipids than with water-soluble surfactants (Fang & Dalgleish, 1993a). Furthermore, Courthaudon et al. (1991a) showed that until a 16/1 lecithin/BCN molar ratio, the protein surface coverage was not affected by the presence of the phospholipids and that no protein displacement from the interface occurred in O/W emulsions. This proportion is by far higher than the amounts of proteins and DLPC applied in our case, which corresponded to a DLPC/protein molar ratio of around 2/1 (**Table 1**).

Although correlating the results obtained with O/W emulsions and Langmuir-Blodgett films must be carefully considered, it is widely admitted that studying monolayer films at air/water interfaces can provide useful data to understand the emulsion behavior (Maldonado-Valderrama et al., 2010; Morris & Gunning, 2008). In an attempt to reconstitute the interfacial layers as similarly as possible to those involved in O/W emulsions, we took care to characterize the structure of single protein interfaces and protein/DLPC mixed interfaces using Langmuir-Blodgett films prepared at the air/buffer interface at a surface pressure corresponding to this determined at the oil droplet surface in emulsions. According to the AFM results and to the previous studies investigating the effect of low molecular weight surfactant as phospholipids on the structure of protein layers, the incorporation of DLPC within BLG- or BCN-stabilized interfaces induced an increased heterogeneity in the protein films. Assuming that similar phenomena occur at the oil/water interface in O/W emulsions, it can be hypothesized that this increased heterogeneity has favored the accessibility of the oil substrate to the proxidant compounds arising from the aqueous phase, therefore increasing the development of lipid oxidation.

This work provides information about the effect of structural or compositional modifications of proteins on lipid oxidation in O/W emulsions. The approach combines a tri-dimensional study of O/W emulsions, and a bi-dimensional study through the reconstitution of the interfacial layers on Langmuir-Blodgett films and their subsequent characterization by AFM. This study demonstrated first that unfolding BLG by heat-denaturation did not improve, and even slightly decreased the oxidative stability of BLG-stabilized emulsions. On the opposite, the use of partially aggregated BLG seemed to slightly protect BLG-stabilized emulsions against lipid oxidation. Second, the use of DLPC/protein mixed interfaces decreased the

oxidative stability of emulsions as compared with single protein-stabilized interfaces, both for BLG and BCN. Despite the relatively low DLPC/protein molar ratio, the incorporation of DLPC obviously caused an increased heterogeneity in the protein layer, which could explain, at least in part, the increased oxidizability of the emulsions.

ABBREVIATIONS USED

AFM, atomic force microscopy; BCN, β -casein; BLG, β -lactoglobulin; BSA, bovine serum albumin; CD, conjugated dienes; DLPC, dilauroyl phosphatidylcholine; DOPC, dioleoyl phosphatidylcholine; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; FID, flame ionization detector; GC, gas chromatography; HP, hydroperoxides; LMWE, low-molecular-weight-emulsifier; O/W emulsion, oil-in-water emulsion; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SPME, solid phase microextraction.

AKNOWLEDGEMENT

The authors thank B. Rullier who kindly donated the solution of BLG aggregates. The financing of this work and Ph.D. grant for C.B. by INRA and Région Pays de la Loire are gratefully acknowledged.

5. Synthèse de la démarche scientifique et des résultats majeurs

5.1. Formulation et caractérisation physique des émulsions

5.1.1. Mise au point de la formulation des émulsions et développement d'une méthode de dosage des émulsifiants non adsorbés

L'objectif de cette thèse étant de montrer que la structure de l'interface entre l'huile et la phase aqueuse peut être maîtrisée de façon à protéger les lipides en émulsion contre l'oxydation, il nous a fallu dans un premier temps formuler des émulsions répondant aux critères suivants : (i) présenter des couches interfaciales de composition, de structure et de propriétés physico-chimiques variées ; (ii) contenir de fortes proportions d'émulsifiants adsorbés à l'interface huile/eau, et donc de faibles proportions d'émulsifiants en excès dans la phase aqueuse ; (iii) présenter des caractéristiques comparables en termes de distribution de taille des gouttelettes ; (iv) être stables physiquement pendant une durée d'incubation suffisante pour y étudier le développement de l'oxydation.

Pour évaluer la concentration et la proportion d'émulsifiants en phase aqueuse, nous avons développé une méthode permettant de séparer la phase crémée de la phase aqueuse, et de doser les émulsifiants non adsorbés dans cette dernière. La méthode consiste en une séparation des phases crémée et aqueuse par centrifugation d'aliquotes d'émulsions, suivie d'une filtration de la phase aqueuse (successivement sur 0,45 ; 0,20 et 0,10 µm) pour éliminer les petites gouttelettes d'huile résiduelles. Pour le dosage des protéines, la méthode colorimétrique de Markwell (Markwell et al., 1978) s'est révélée applicable à des émulsions stabilisées par les différentes protéines étudiées, à différents stades d'oxydation, contrairement à l'évaluation de la concentration en protéines par spectrophotométrie UV, dont la gamme d'applications s'est avérée beaucoup plus réduite. De surcroît, la présence de tensioactifs tels que le Tween 20 n'interfère pas dans le dosage de Markwell. Pour le dosage des tensioactifs, les méthodes disponibles étaient généralement trop complexes et/ou longues pour être applicables dans une démarche d'optimisation et nos contrôles de routine. Nous avons donc développé une méthode originale de dosage des tensioactifs se présentant sous forme d'esters d'acides gras. Le protocole est basé sur la transestérification des acides gras en milieu acide et en présence de méthanol directement dans la phase aqueuse des émulsions, puis sur l'analyse des esters méthyliques formés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette méthode présente, en outre, l'avantage de permettre un dosage sélectif de tensioactifs en mélange si leurs compositions en acides gras diffèrent, et permet de détecter d'éventuelles traces résiduelles de l'huile émulsionnée. Enfin, la présence de protéines dans la phase aqueuse n'interfère pas dans le dosage des tensioactifs par cette méthode.

Afin de minimiser la quantité d'émulsifiants non adsorbés dans les émulsions, deux stratégies de formulation d'émulsions ont été testées : (i) les émulsions ont été préparées à partir de solutions aqueuses contenant de faibles concentrations en émulsifiants ou (ii) des émulsions préparées à partir de solutions aqueuses plus concentrées en émulsifiant ont été lavées en redispersant la phase crémée collectée après centrifugation dans un tampon exempt d'émulsifiant, cette méthode ayant été décrite précédemment dans la littérature (Faraji et al., 2004). Dans une émulsion préparée avec une solution aqueuse contenant 18 g l⁻¹ de β -lactoglobuline, nous avons observé une augmentation conséquente de la taille des gouttelettes d'huile après l'étape de lavage puis au cours de l'incubation de l'émulsion lavée. De plus, après 48 h d'incubation, nous avons mesuré une concentration en β -lactoglobuline dans la phase aqueuse de l'émulsion lavée nettement plus élevée que dans la phase aqueuse d'une émulsion préparée avec une faible concentration initiale en β -lactoglobuline.

La méthode de lavage des émulsions n'a donc pas été retenue. Les émulsions ont été préparées en utilisant les quantités d'émulsifiants les plus faibles possibles et des conditions d'homogénéisation permettant d'obtenir des gouttelettes d'environ 1,5 à 2 μ m et des émulsions stables physiquement pendant 48 à 72 h d'incubation. Pour cela, une démarche itérative a été mise en place comme présenté dans la Figure 23.



Figure 23. Démarche de formulation raisonnée d'émulsions H/E contenant de faibles quantités d'émulsifiants non adsorbés.

5.1.2. Distribution de taille des gouttelettes d'huile

Les émulsions présentent des distributions de taille de gouttelettes proches, indépendamment de l'émulsifiant utilisé, avec un diamètre moyen en surface $(d_{3,2})$ compris entre 1,4 et 2,2 µm à t = 0 et des distributions granulométriques largement superposées (Figure 24).



Figure 24. Distributions de taille de gouttelettes observées dans les émulsions fraîchement préparées (haut) ou après 48 h d'incubation (bas) stabilisées par un seul émulsifiant à pH 6,7 : BLG (\triangle), SAB (\diamond), BCN (\square), Tween 20 (×), Tween 80 (+) ou Citrem (•), ou à pH 3,0 : BLG (\blacktriangle) ou Tween 20 (•). Les valeurs de d_{3,2} (µm) indiquées dans les tableaux indiquent la moyenne ± l'écart-type de 3 mesures sur 3 émulsions préparées indépendamment, à t = 0 et après 48 h d'incubation (25°C, obscurité, FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 µM).

Les tailles de gouttelettes les plus élevées sont observées dans les émulsions stabilisées par le Citrem à pH 6,7 ou par la BLG à pH 3,0. Par ailleurs, on observe à t = 0 une distribution bimodale dans les émulsions stabilisées par le Citrem à pH 6,7 ou par le Tween 20 à pH 3,0. Des caractéristiques physiques comparables ont été obtenues pour les émulsions stabilisées par des mélanges d'émulsifiants. Toutes les émulsions se sont avérées être raisonnablement stables physiquement au cours de 48 à 72 h d'incubation dans des conditions oxydantes.

5.1.3. Charge de surface des gouttelettes

La charge de surface des gouttelettes d'huile dans les émulsions fraîchement préparées stabilisées par un seul émulsifiant a été évaluée par la détermination du potentiel Zeta (Tableau XI).

Tableau XI. Potentiel Zeta dans les émulsions fraîchement préparées stabilisées par un seul émulsifiant à pH 6,7 ou 3,0.

pН	Potentiel Zeta (mV) à $t = 0$
6,7	$-54,5 \pm 0,4$
6,7	$-29,8 \pm 1,3$
6,7	$-46,5 \pm 1,9$
6,7	$-9,6 \pm 0,8$
6,7	$-6,4 \pm 0,1$
6,7	$-96,9 \pm 3,3$
3,0	$68,1 \pm 1,2$
3,0	-3.8 ± 0.1
	pH 6,7 6,7 6,7 6,7 6,7 6,7 3,0 3,0

Les données indiquées représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 mesures sur une émulsion diluée 1000 fois dans du tampon (pH 6,7 ou 3,0) exempt de NaCl.

A pH 6,7, les gouttelettes d'émulsions stabilisées par des protéines présentent une charge de surface négative qui varie de -54,5 mV pour l'émulsion stabilisée par la BLG à -29,8 mV pour l'émulsion stabilisée par la SAB. Les gouttelettes d'émulsions stabilisées par les tensioactifs non ioniques (Tween 20 et Tween 80) présentent une charge de surface très faible en valeur absolue alors que l'émulsion stabilisée par le Citrem, tensioactif anionique, possède comme attendu une charge de surface fortement négative (-96,9 mV). La préparation d'émulsions à pH 3,0 génère des gouttelettes de charge opposée dans l'émulsion stabilisée par la BLG (+68,1 mV), en accord avec le point isoélectrique de la protéine, alors que la charge des gouttelettes de l'émulsion stabilisée par le Tween 20 est peu modifiée et reste négative.

Ainsi, les différents émulsifiants utilisés, couplés aux deux pHs testés, conduisent à une large gamme de charges de surface des gouttelettes dans les émulsions.

5.1.4. Concentrations et proportions de protéines non adsorbées

La composition des émulsions a été optimisée de façon à réduire autant que possible la concentration de protéines dans la phase aqueuse des émulsions. Les concentrations de protéines non adsorbées dans les émulsions stabilisées par chacune des protéines utilisées et préparées à pH 6,7 sont toujours inférieures à 1,52 g l⁻¹, ce qui correspond à des proportions inférieures à 30% (Tableau XII).

Tableau XII. Concentrations et proportions en protéines dans la phase aqueuse d'émulsions fraîchement préparées (t = 0) et après 48 h d'incubation en conditions oxydantes (25° C, obscurité, FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 µM).

Protéine	pН	Concentration en solution aqueuse (g l ⁻¹)	Concentration en phase aqueuse à $t = 0 (g l^{-1})$	Proportion en phase aqueuse à $t = 0$ (%)	Concentration en phase aqueuse à $t = 48 h (g l^{-1})$	Proportion en phase aqueuse à t = 48 h (%)
BLG	6,7	5,00	$1,52 \pm 0,09$	30,4	$1,16 \pm 0,14$	23,2
BLG	3,0	5,00	$2,10 \pm 0,19$	42,0	$2,\!26\pm0,\!22$	45,2
BLG en excès	6,7	10,00	$6,05 \pm 0,10$	60,5	$5,77 \pm 0,15$	57,7
BLG (+ agrégats) ⁽¹⁾	6,7	5,00	$1,33 \pm 0,18$	26,6	$1,18\pm0,15$	23,6
BLG						
dénaturée	6,7	5,00	$1,47 \pm 0,06$	29,4	$1,49 \pm 0,22$	29,8
thermiquement						
$\frac{BLG}{(+ DLPC)}^{(2)}$	6,7	4,55	$1,\!40\pm0,\!19$	30,4	$1,\!42\pm0,\!08$	30,9
BLG (+ Tween 20 10%) ⁽³⁾	6,7	4,55	$2,07 \pm 0,04$	45,5	-	-
BLG						
(+ Tween 20 50%) ⁽⁴⁾	6,7	2,53	2,37 ± 0,18	93,8	-	-
SAB	6,7	4,00	$1,17 \pm 0,11$	29,3	$0,98 \pm 0,03$	24,5
BCN	6,7	5,00	$0,45 \pm 0,12$	9,0	$0,99 \pm 0,03$	19,8
BCN en excès	6,7	10,00	$3,60 \pm 0,10$	36,0	$3,94 \pm 0,17$	39,4
BCN (+ DLPC) ⁽⁵⁾	6,7	4,52	$0,42 \pm 0,12$	9,3	$1,15 \pm 0,18$	25,6

⁽¹⁾ Emulsion préparée à partir d'une solution aqueuse contenant 4,50 g Γ^1 de BLG native et 0,50 g Γ^1 d'agrégats de BLG (environ 35 nm).

⁽²⁾ Emulsion préparée à partir d'une solution aqueuse contenant 4,55 g l⁻¹ de BLG et d'huile contenant 0,068 g/100 g de DLPC, soit un rapport massique BLG/DLPC dans l'émulsion de 15,7/1.

⁽³⁾ Emulsion préparée à partir d'une solution aqueuse contenant 4,55 g l⁻¹ de BLG et 0,47 g l⁻¹ de Tween 20, soit un rapport massique BLG/Tween 20 dans l'émulsion de 9,7/1.

⁽⁴⁾ Emulsion préparée à partir d'une solution aqueuse contenant 2,53 g l⁻¹ de BLG et 2,36 g l⁻¹ de Tween 20, soit un rapport massique BLG/Tween 20 dans l'émulsion de 1,1/1.

⁽⁵⁾ Emulsion préparée à partir d'une solution aqueuse contenant 4,52 g l⁻¹ de BCN et d'huile contenant 0,061 g/100 g de DLPC, soit un rapport massique BCN/DLPC dans l'émulsion de 17,4/1.

Les données indiquées représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 mesures sur au moins 2 émulsions préparées indépendamment, excepté pour les émulsions stabilisées par les mélanges BLG/Tween 20 dans le cas desquelles une seule émulsion a été préparée.

Les proportions de BLG et SAB non adsorbées ne varient pas significativement au cours de l'incubation des émulsions en conditions oxydantes (p > 0,05). En revanche, la proportion de BCN non adsorbée augmente significativement au cours de la période d'incubation (p < 0,05), atteignant près de 20% au bout de 48 h, ce qui traduit une désorption partielle de la protéine. Cette proportion reste néanmoins faible par rapport à celles mesurées pour les deux autres
protéines étudiées. Dans l'émulsion stabilisée par la BLG, préparée à pH 3,0, et qui présente la taille de gouttelettes la plus importante (Figure 23), la concentration et donc la proportion de BLG non adsorbée sont plus importantes que dans l'émulsion à pH 6,7 (2,10 g l⁻¹, soit 42% à t = 0), aussi bien dans l'émulsion fraîche qu'après 48 h d'incubation en conditions oxydantes. Lorsque des protéines en excès (BLG ou BCN) sont ajoutées dans la phase aqueuse des émulsions *post* émulsification, la concentration et la proportion des protéines non adsorbées sont logiquement plus élevées (6,05 g l⁻¹ soit 60,5% pour la BLG, et 3,60 g l⁻¹ soit 36% pour la BCN, à t = 0) et sont peu modifiées au cours de la période d'incubation.

Dans le cas des émulsions formulées avec un mélange protéine (BLG ou BCN)/dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC), la présence de DLPC ne modifie pas la proportion initiale de protéine non adsorbée en phase aqueuse, pour les deux protéines étudiées. Après 48 h d'incubation en conditions oxydantes, cette proportion est légèrement plus élevée dans les émulsions avec DLPC que dans les émulsions stabilisées par la protéine seule. En revanche, dans les émulsions formulées avec des mélanges BLG/Tween 20, la présence de Tween 20 provoque une nette augmentation de la proportion de BLG non adsorbée à t = 0. Par exemple, pour le mélange BLG/Tween 20 (1,1/1 ; p/p), la proportion de BLG non adsorbée en phase aqueuse de l'émulsion dépasse 90%. Cette compétition pour l'adsorption entre protéines et tensioactifs, largement décrite dans la littérature (Courthaudon et al., 1991b; Courthaudon et al., 1991c; Dickinson, 1991; Dickinson, 2011; Dickinson & Tanai, 1992; van Aken, 2003), constitue un obstacle à la formulation d'émulsions stabilisées par des interfaces de composition mixte protéines/tensioactifs et contenant peu d'émulsifiants non adsorbées.

5.1.5. Concentrations et proportions de tensioactifs non adsorbés

Les émulsions stabilisées par un seul tensioactif contiennent de faibles proportions de tensioactifs non adsorbés en phase aqueuse à t = 0 (Tableau XIII).

Tableau XIII. Concentrations et proportions en tensioactifs dans la phase aqueuse d'émulsions fraîchement préparées (t = 0) et après 48 h d'incubation en conditions oxydantes (25° C, obscurité, FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 μ M).

Tensioactif	рН	Concentration en solution aqueuse (g l ⁻¹)	Concentration en phase aqueuse à $t = 0 (g l^{-1})$	Proportion en phase aqueuse à t = 0 (%)	Concentration en phase aqueuse à $t = 48 h (g l^{-1})$	Proportion en phase aqueuse à t = 48 h (%)
Tween 20	6,7	5,00	$0,\!47\pm0,\!09$	9,5	$0,\!68 \pm 0,\!14$	13,6
Tween 20	3,0	5,00	$0,\!56 \pm 0,\!10$	11,2	$0,\!40\pm0,\!07$	8,0
Tween 20 en excès	6,7	10,00	$3,37 \pm 0,17$	33,7	$2{,}74\pm0{,}11$	27,4
Tween 80	6,7	5,00	$1,\!68 \pm 0,\!14$	33,6	$1,\!67 \pm 0,\!10$	33,4
Citrem	6,7	6,00 ⁽¹⁾	$0,012 \pm 0,004$	0,2	$0,034 \pm 0,002$	0,6
Tween 20/	67	2,50	$0,\!39 \pm 0,\!03$	15,6	$0,30 \pm 0,03$	12,0
Tween 80	0,7	2,50	$0,\!20 \pm 0,\!04$	8,0	$0{,}84 \pm 0{,}08$	33,6
Tween 20/	6,7	4,60	$0,\!48 \pm 0,\!03$	10,5	$0,\!42 \pm 0,\!03$	9,1
MLG		0,39	$0,010 \pm 0,002$	2,5	$0,025 \pm 0,002$	6,3
Tween 20/	6,7	4,60	-	-	-	-
Span 20		0,49	-	-	-	-

⁽¹⁾ Le Citrem a été incorporé dans l'huile, dans une concentration équivalente à la concentration en solution aqueuse indiquée.

Les données indiquées représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 mesures sur au moins 2 émulsions préparées indépendamment.

Dans le cas de l'émulsion stabilisée par le Citrem, ce dernier est présent seulement à l'état de traces dans la phase aqueuse (0,20% de la quantité totale présente dans l'émulsion), ce qui s'explique par sa faible solubilité en milieu aqueux et le fait que cet émulsifiant a été incorporé dans l'huile avant l'émulsification. La proportion de Tween 20 en phase aqueuse d'émulsions préparées à partir de solutions aqueuses contenant 5 g Γ^1 de Tween 20 est inférieure à 12% (0,47 g Γ^1 dans l'émulsion à pH 6,7 et 0,56 g Γ^1 dans l'émulsion à pH 3,0). Après 48 h d'incubation en présence de l'initiateur FeSO₄/EDTA, les concentrations et proportions de Tween 20 et de Citrem non adsorbés dans les émulsions à pH 6,7 augmentent significativement (p < 0,05), restant malgré tout relativement faibles (13,6% et 0,6%, respectivement). La concentration et la proportion en Tween 20 non adsorbé dans l'émulsion à pH 3,0 ne sont pas significativement modifiées au cours de l'incubation (p > 0,05). La concentration et la proportion en Tween 80 non adsorbé sont plus importantes (1,68 g Γ^1 , soit 33,6% en phase aqueuse) mais ne sont pas significativement modifiées au cours de l'incubation (p > 0,05).

L'émulsion stabilisée par un mélange Tween 20/Tween 80 (1/1; p/p) contient de faibles proportions de Tween 20 (environ 15%) et de Tween 80 (environ 8%) non adsorbés. Ainsi, la

proportion de Tween 80 non adsorbé est plus faible que celle de Tween 20 non adsorbé, ce qui est cohérent avec la balance hydrophile-lipophile (HLB) plus faible du Tween 80 et donc sa plus faible hydrophilicité. Les concentrations en Tween 20 et en Tween 80 dans la phase aqueuse sont de 0,39 et 0,20 g l⁻¹, soit 0,32 et 0,15 mM, respectivement, et donc supérieures à la concentration micellaire critique (CMC) de chaque tensioactif, ce qui rend vraisemblable la présence de micelles dans la phase aqueuse des émulsions. Des diamètres hydrodynamiques d'environ 10 à 13 nm ont été mis en évidence pour des micelles de Tween 20 et de Tween 80 en solution aqueuse par diffusion dynamique de la lumière. Néanmoins, l'analyse des phases aqueuses d'émulsions par cette même technique n'a pas permis de mettre en évidence de tels objets, mais a, en revanche, révélé la présence de très petites gouttelettes d'huile d'environ 180 nm. Cette présence de très petites gouttelettes lipidiques résiduelles a, par ailleurs, été confirmée par la détection d'esters méthyliques correspondant aux acides gras de l'huile de colza lors du dosage des tensioactifs non adsorbés par CPG après l'étape de transestérification. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence apparente de micelles de tensioactifs : (i) la phase aqueuse ne contient effectivement pas de micelles de tensioactifs exemptes d'huile ; ou (ii) la détection de micelles de tensioactifs d'environ 10 à 13 nm a été masquée par la présence des très petites gouttelettes d'huile. Dans ce second cas, la phase aqueuse de l'émulsion constituerait en réalité une émulsion de taille sub-micronique très diluée, avec un équilibre entre des tensioactifs adsorbés à la surface des très petites gouttelettes d'huile, des micelles de tensioactifs et des monomères de tensioactifs. Au cours de l'incubation de l'émulsion stabilisée par le mélange Tween 20/Tween 80, la proportion de Tween 20 non adsorbé n'est pas significativement modifiée (p > 0.05); en revanche, la proportion de Tween 80 non adsorbé augmente significativement (p < 0.05).

Dans le cas des émulsions stabilisées par un mélange Tween 20/co-tensioactif de faible HLB (Tween 20/monolaurate de glycérol (MLG) 11,9/1; p/p ou Tween 20/Span 20 9,4/1 ; p/p), les deux tensioactifs du mélange présentent une partie hydrophobe majoritairement constituée d'acide laurique (C12:0). L'émulsion stabilisée par le mélange Tween 20/MLG contient à la fois une faible proportion de Tween 20 non adsorbé (environ 11%) et de MLG non adsorbé (environ 2,5%) à t = 0. Après 48 h d'incubation, la proportion de Tween 20 non adsorbé n'est pas significativement modifiée (p > 0,05) alors que celle de MLG augmente significativement (p < 0,05), atteignant une valeur de 6%. Pour l'émulsion stabilisée par le mélange Tween 20/Span 20, les compositions en acides gras des deux tensioactifs sont pratiquement identiques, ce qui a empêché de distinguer la contribution spécifique de chaque tensioactif du mélange aux pics détectés en CPG. Les aires des pics, et notamment l'aire du pic de C12:0,

étaient cependant du même ordre de grandeur que les aires obtenues dans le cas du mélange Tween 20/MLG, ce qui suppose que de faibles proportions de Tween 20 et de Span 20 sont présentes dans la phase aqueuse de l'émulsion correspondante. Le Span 20 étant nettement plus hydrophobe que le Tween 20 et se rapprochant du MLG en termes de HLB et de structure moléculaire, il paraît plausible que, comme pour le MLG, la proportion de Span 20 non adsorbé dans la phase aqueuse soit très faible.

Dans tous les cas où la quantification des tensioactifs en phase aqueuse d'émulsions a pu être réalisée, excepté lorsqu'une incorporation de tensioactif en excès a été réalisée *post* émulsification, il apparaît que les concentrations et proportions en tensioactifs non adsorbés sont faibles, voire très faibles, ce qui répond bien aux critères préalablement déterminés.

5.2. Oxydation des lipides dans les émulsions stabilisées par des émulsifiants utilisés seuls

5.2.1. Comparaison de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines ou des tensioactifs en présence de fer chélaté

L'oxydation des lipides dans les émulsions a été mesurée par différents marqueurs permettant d'évaluer les différents stades de la réaction : la consommation d'oxygène dans l'espace de tête des émulsions, la formation des diènes conjugués (DC), produits primaires d'oxydation, et la formation de composés volatils, produits secondaires d'oxydation. Dix-huit composés volatils ont été identifiés et quantifiés dans l'espace de tête des émulsions ; néanmoins, dans cette partie, nous présenterons uniquement la formation de propanal, provenant de l'oxydation des AGPI n-3 et d'hexanal, provenant de l'oxydation des AGPI n-6 (Genot et al., 2003). Afin de comparer l'oxydation des lipides dans les différentes émulsions sur des paramètres quantitatifs, les courbes de consommation d'oxygène et de formation des DC ont été ajustées avec un modèle mathématique (modèle de Gompertz) permettant d'estimer les temps de latence L_1 et L_2 ainsi que la vitesse de consommation d'oxygène (μ_1) et de formation des DC (μ_2), respectivement.

Dans le cas des émulsions formulées à pH 6,7 sans excès d'émulsifiant (Figure 25, Tableau XIV), la consommation d'oxygène démarre rapidement dès le début de l'incubation dans l'émulsion stabilisée par la BLG ($L_1 = 3,3$ h) et augmente à une vitesse proche de 6 mmol O₂ kg⁻¹ huile h⁻¹ jusqu'à un plateau à environ 134 mmol O₂ kg⁻¹ huile. Dans les autres émulsions,

une phase de latence plus longue est observée (entre 14 et 36 h), en particulier lorsque des tensioactifs sont utilisés. Dans l'émulsion stabilisée par le Citrem, aucune consommation d'oxygène notable n'est relevée au cours de la période d'incubation considérée (72 h). Ces données mettent en évidence que la consommation d'oxygène débute plus tôt et se développe plus rapidement dans les émulsions stabilisées par des protéines que dans les émulsions stabilisées par des protéines que dans les émulsions stabilisées par des protéines que dans les émulsions stabilisées par des tensioactifs.

Un ordre de stabilité oxydative proche est obtenu d'après la formation des DC et des composés volatils (Figure 25, Tableau XIV).

Ainsi, d'après les courbes représentant l'évolution des différents marqueurs étudiés et les valeurs de *L* et de μ estimées, l'ordre de stabilité oxydative des différentes émulsions est : BLG < SAB \approx BCN < Tween 20 \approx Tween 80 < Citrem.



Figure 25. Consommation d'oxygène (a), formation des DC (b) et des composés volatils (c : propanal ; d : hexanal) au cours de l'incubation d'émulsion stabilisées par la BLG (\triangle), la SAB (\diamond), la BCN (\Box), le Tween 20 (\circ), le Tween 80 (\times) ou le Citrem (+) à pH 6,7, à 25°C à l'obscurité, en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 μ M). Dans les graphiques (a) et (b), les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12 pour la consommation d'oxygène ; n = 3 à 6 pour la formation des DC).

	Paramètres estimés pour la consommation d'oxygène				Paramètres estimés pour la formation des DC				
Emulsion	<i>L</i> ₁ (h)	$\mu_1 \text{ (mmol} \ \mathrm{O}_2 \mathrm{kg}^{-1}$ huile h^{-1})	R ² (%)	t _{1/2 (1)} (h)	<i>L</i> ₂ (h)	$\mu_2 \text{ (mmol)} $ eq HP kg ⁻¹ huile h ⁻¹	R² (%)	t _{1/2 (2)} (h)	μ_1/μ_2
BLG pH 6,7	$3,3\pm0,4$	$6,1\pm0,2$	98,3	14,4	$1,4 \pm 1,5$	$2,4\pm0,2$	94,2	13,8	2,5
SAB pH 6,7	$14,0\pm0,8$	$4,8\pm0,3$	97,1	27,9	$9,4 \pm 2,4$	$2,0\pm0,3$	93,4	27,3	2,4
BCN pH 6,7	$15,0\pm0,8$	$3,3\pm0,1$	96,9	35,6	$2,5 \pm 1,9$	$1,7\pm0,2$	90,1	22,2	1,9
Tween 20 pH 6,7	36,3 ± 1,8	$3,6 \pm 0,4$	92,0	55,0	$16,1 \pm 2,7$	$1,3\pm0,1$	93,0	46,7	2,8
Tween 80 pH 6,7	28,6 ± 1,3	$2,5\pm0,2$	95,7	55,5	$28,2 \pm 1,3$	$1,4\pm0,1$	97,9	51,8	1,8
BLG pH 3,0	13,4 ± 1,4	3,2 ± 0,2	96,2	34,8	4,7 ± 2,1	$1,2 \pm 0,1$	94,6	27,4	2,7
Tween 20 pH 3,0	$68,9\pm5,2$	$0,6\pm0,2$	80,1	172,9	$49,5 \pm 3,3$	$0,6 \pm 0,1$	86,8	98,1	1,0
BLG pH 6,7 (BLG en excès)	9,9 ± 1,3	3,9 ± 0,3	95,7	27,3	nd	nd	nd	nd	-
BCN pH 6,7 (BCN en excès)	$44,4 \pm 1,2$	$3,9\pm0,4$	94,4	61,8	nd	nd	nd	nd	-
Tween 20 pH 6,7 (Tween 20 en excès)	43,2 ± 1,0	$1,9\pm0,1$	97,0	77,9	nd	nd	nd	nd	-

Tableau XIV. Temps de latence (L_1 et L_2) et vitesses de consommation d'oxygène (μ_1) et de formation des DC (μ_2) estimés dans les émulsions.

Les données correspondent aux paramètres estimés \pm l'intervalle de confiance asymptotique à 95%. Les coefficients de corrélation (R²) indiquent le pourcentage de dispersion expliqué par le modèle ajusté.

Les valeurs $t_{1/2}$ (1) et $t_{1/2}$ (2) correspondent aux temps d'incubation auxquels la moitié de la consommation d'oxygène maximale ou de la valeur maximale de DC sont atteintes, respectivement. nd: non déterminé

Ces résultats montrent que lorsque les émulsions contiennent de faibles quantités d'émulsifiants non adsorbés, l'oxydation des lipides se développe plus rapidement dans les émulsions stabilisées par des protéines que dans les émulsions stabilisées par des tensioactifs, dans les conditions d'incubation appliquées ici (25°C, obscurité, FeSO₄/EDTA ; 1/1 ; M/M ; 200 μ M). Pour vérifier si ce résultat est lié à la charge de surface négative des gouttelettes d'huile stabilisées par des protéines à pH 6,7 (-28,9 à -54,5 mV), qui pourrait favoriser l'établissement d'interactions entre la surface des gouttelettes et les ions métalliques chargés positivement (Waraho et al., 2011b), nous avons suivi l'oxydation lipidique dans des émulsions stabilisées par la BLG ou le Tween 20 à pH 3,0. Dans ces conditions, les gouttelettes stabilisées par la BLG sont fortement chargées positivement (+68,1 mV) alors que les gouttelettes stabilisées par le Tween 20 demeurent peu chargées quel que soit le pH (-

9,6 mV à pH 6,7 ; -3,8 mV à pH 3,0). D'après tous les marqueurs de l'oxydation des lipides considérés et les paramètres cinétiques estimés (Figure 26, Tableau XIV), le développement de l'oxydation des lipides est très retardé dans les émulsions préparées à pH 3,0 par rapport aux émulsions préparées à pH 6,7, ce retard étant particulièrement marqué avec le Tween 20.



Figure 26. Consommation d'oxygène (a), formation des DC (b) et des composés volatils (c : propanal ; d : hexanal) au cours de l'incubation d'émulsion stabilisées par la BLG à pH 6,7 (\triangle), la BLG à pH 3,0 (\blacktriangle), le Tween 20 à pH 6,7 (\bigcirc) ou le Tween 20 à pH 3,0 (\blacklozenge), à 25°C à l'obscurité, en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 µM). Dans les graphiques (a) et (b), les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12 pour la consommation d'oxygène ; n = 3 à 6 pour la formation des DC).

Dans le cas des émulsions stabilisées par la BLG, un effet lié à la charge des gouttelettes ne peut être exclu *a priori* ; cependant, comme un effet d'amplitude encore plus important est observé avec le Tween 20, cet effet de la charge de surface nous semble difficilement expliquer les variations observées. Il nous semble plus probable qu'il faille faire intervenir soit l'effet intrinsèque du pH, soit celui des tampons utilisés (10 mM de PIPES dans le tampon à pH 6,7 ; 10 mM d'acide phosphorique dans le tampon à pH 3,0) sur l'oxydation des lipides. L'effet du pH sur l'oxydation des lipides en émulsion est controversé dans la

littérature. Si les auteurs s'accordent sur le fait que la solubilité du fer moins élevée à pH neutre qu'à pH acide, certains associent à cette baisse de solubilité des propriétés prooxydantes plus faibles (Haahr & Jacobsen, 2008; Mei et al., 1998b; Villière & Genot, 2006) alors que d'autres suggèrent une possible précipitation du fer à la surface des gouttelettes lorsque sa solubilité diminue, favorisant son activité catalytique (Mancuso et al., 1999b). En ce qui concerne l'effet de la charge de surface des gouttelettes sur l'oxydation, il est important de noter que quel que soit le pH considéré (6,7 ou 3,0) et donc la charge de surface des gouttelettes stabilisées par la BLG, l'oxydation des lipides y est plus rapide que dans les émulsions stabilisées par le Tween 20. La charge de surface n'est donc probablement pas un paramètre déterminant dans l'aptitude des couches interfaciales à protéger les lipides émulsionnés contre l'oxydation. Cette conclusion est, par ailleurs, renforcée par la très bonne stabilité oxydative de l'émulsion stabilisée par le Citrem, qui présente pourtant la charge de

surface la plus négative parmi toutes les émulsions étudiées.

Nos résultats tendent donc à montrer que dans des émulsions H/E, les interfaces stabilisées par des tensioactifs sont plus efficaces que les interfaces stabilisées par des protéines pour protéger les lipides contre l'oxydation. Cette constatation contredit en première analyse les résultats de la littérature (Fomuso et al., 2002a; Haahr & Jacobsen, 2008; Kiokias et al., 2006; Osborn & Akoh, 2004), qui montrent une oxydation des lipides plus rapide dans les émulsions stabilisées par des tensioactifs que dans les émulsions stabilisées par des protéines. Nous avons estimé la concentration et la proportion d'émulsifiants non adsorbés en phase aqueuse des émulsions dans ces études à partir des paramètres de formulation des émulsions et des diamètres moyens des gouttelettes lipidiques mentionnés. Il apparaît que ces travaux ont été menés en présence de larges excès d'émulsifiants non adsorbés, nous avons suivi la consommation d'oxygène (Figure 27) et la formation des composés volatils dans l'espace de tête d'émulsions stabilisées par la BLG, la BCN ou le Tween 20 à pH 6,7, dans lesquelles des émulsifiants en excès ont été incorporés *post* émulsification.



Figure 27. Consommation d'oxygène au cours de l'incubation d'émulsions stabilisées par la BLG à pH 6,7 (a) sans (\triangle) ou avec (\blacktriangle) de la BLG en excès dans la phase aqueuse ; la BCN à pH 6,7 (b) sans (\Box) ou avec (\blacksquare) de la BCN en excès dans la phase aqueuse ; ou le Tween 20 à pH 6,7 (c) sans (\bigcirc) ou avec (\bullet) du Tween 20 en excès dans la phase aqueuse, à 25°C à l'obscurité, en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 μ M). Les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12).

Dans ces trois émulsions, la consommation d'oxygène se développe moins rapidement en présence d'émulsifiant en excès. Ce retard est particulièrement marqué dans le cas de l'émulsion stabilisée par la BCN, pour laquelle une forte augmentation du temps de latence est observée lorsque la phase aqueuse de l'émulsion contient de la BCN en excès ($L_1 = 44,4$ h au lieu de 15 h) (Tableau XIV). Cet effet antioxydant des émulsifiants, et notamment des protéines, présents dans la phase aqueuse des émulsions a été largement décrit dans la littérature et a généralement été attribué à des propriétés de chélation de métaux et de piégeage des radicaux libres (Clausen et al., 2009; Elias et al., 2005; Faraji et al., 2004; Genot et al., 2003; Sugiarto et al., 2010; Sun & Gunasekaran, 2009). Dans les conditions appliquées ici, les quantités d'émulsifiants ajoutés dans la phase aqueuse des émulsions sont toutefois encore limitées par rapport aux concentrations et proportions d'émulsifiants non adsorbés rencontrées dans la littérature. Ceci explique probablement pourquoi on n'atteint pas une

inversion de l'ordre de stabilité oxydative entre les émulsions stabilisées par les protéines et l'émulsion stabilisée par le Tween 20. Dans les travaux précédents de la littérature, la contribution des émulsifiants non adsorbés à la protection de la phase lipidique contre l'oxydation est donc probablement très supérieure à celle des émulsifiants localisés à l'interface. Au contraire, nos émulsions ont été formulées pour minimiser la proportion d'émulsifiants non adsorbés et donc leur implication dans le développement de l'oxydation des lipides.

De ces premiers travaux, il ressort clairement que dans les conditions d'incubation testées $(25^{\circ}C, FeSO_4/EDTA 1/1; M/M; 200 \mu M)$, les gouttelettes lipidiques stabilisées par des protéines sont moins stables à l'oxydation que les gouttelettes lipidiques stabilisées par des tensioactifs. Lorsque l'excès d'émulsifiants dans la phase aqueuse est limité, ceci se traduit par une oxydabilité plus faible des émulsions stabilisées par des protéines par rapport aux émulsions stabilisées par des tensioactifs. De surcroît, l'effet protecteur contre l'oxydation des émulsifiants non adsorbés, notamment des protéines, a été clairement confirmé.

5.2.2. Généralisation de l'effet de la nature de l'émulsifiant sur l'ordre de stabilité oxydative des émulsions

La meilleure stabilité oxydative des émulsions stabilisées par des tensioactifs par rapport aux émulsions stabilisées par des protéines a été mise en évidence dans une condition d'incubation particulière, à savoir à 25°C, à l'obscurité, en présence d'un initiateur d'oxydation constitué d'un complexe équimolaire de fer et d'EDTA (FeSO₄/EDTA ; 1/1 M/M ; 200 μ M). Il nous a donc semblé important de valider cette tendance dans d'autres conditions d'incubation des émulsions.

Dans les travaux de la littérature s'intéressant à l'oxydation des lipides en émulsion, l'incubation des systèmes en présence d'un initiateur chimique ou à une température d'incubation plus élevée que les températures classiques de stockage des huiles est fréquente. Chacune de ces études a généralement été menée dans une condition d'incubation donnée et différente des autres. Par ailleurs, il n'existait pas, à notre connaissance, d'étude montrant l'influence du mode d'initiation de l'oxydation des émulsions sur leur ordre de stabilité oxydative.

Afin de vérifier si l'ordre de stabilité oxydative précédemment démontré en présence de l'initiateur FeSO₄/EDTA était valide quelles que soient les conditions d'incubation des

émulsions, nous avons testé l'effet de différents initiateurs chimiques couramment utilisés dans la littérature, ou d'une température d'incubation plus élevée, sur l'oxydation de quelques émulsions de formulations simples. L'oxydation des lipides a été évaluée dans des émulsions stabilisées par la BLG, la SAB, la BCN ou le Tween 20, formulées à pH 6,7 sans excès d'émulsifiant, incubées dans chacune des conditions suivantes :

- 25°C, metmyoglobine (MetMb) 1 µM
- 25°C, 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH) 1 mM
- 25°C, FeCl₃/ascorbate de sodium (Na-asc) 1/1 ; M/M ; 50 μ M
- 33°C

Ces conditions ont été choisies au terme d'un travail d'optimisation visant à déterminer quelles concentrations en initiateurs ou quelle température d'incubation permettaient d'avoir des développements de l'oxydation des lipides d'ordres de grandeur comparables dans l'émulsion stabilisée par le Tween 20.

L'oxydation des lipides dans les émulsions incubées dans ces différentes conditions a été mesurée par la consommation d'oxygène et la formation de composés volatils dans l'espace de tête des émulsions. Comme précédemment, les données de consommation d'oxygène ont été ajustées avec le modèle de Gompertz afin d'estimer les paramètres cinétiques L (phase de latence) et μ (vitesse de consommation d'oxygène pendant la phase exponentielle).

Quelles que soient les conditions d'incubation, la consommation d'oxygène est toujours la plus lente dans l'émulsion stabilisée par le Tween 20, et toujours la plus rapide dans l'émulsion stabilisée par la BLG (Figure 25a, Figure 28). Les émulsions stabilisées par la BCN ou la SAB présentent des comportements intermédiaires et plus variables d'une condition d'incubation à l'autre.



Figure 28. Consommation d'oxygène au cours de l'incubation d'émulsion stabilisées par la BLG (\triangle), la SAB (\diamond), la BCN (\Box) ou le Tween 20 (\bullet), à pH 6,7 à (A) 33°C sans catalyseur ou à 25°C avec (B) 1 µM de MetMb, (C) 1 mM d'AAPH ou (D) 50 µM de FeCl₃/Na-asc 1/1 ; M/M. Les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12).

Le suivi de la formation de 8 composés volatils d'oxydation (pentane, propanal, 2-butenal, 2pentenal, hexanal, 2,4-hexadiénal, 2-heptenal et 2-octenal) corrobore ces observations, même si les coefficients de corrélation entre la consommation d'oxygène et la formation des différents composés volatils varient entre 0,51 et 0,87 (Table 2, p. 178). Les composés volatils les plus fortement corrélés à la consommation d'oxygène sont les aldéhydes monoinsaturés provenant de l'oxydation des AGPI n-3 (2-butenal, 2-pentenal) et n-6 (2-heptenal), avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,8. Le propanal et l'hexanal sont légèrement moins bien corrélés à la consommation d'oxygène (R² de 0,71 et 0,75, respectivement). Enfin, une corrélation à la consommation d'oxygène plus faible a été mise en évidence pour le pentane, le 2,4-hexadiénal et le 2-octenal, avec des coefficients de corrélation inférieurs à 0,7. Pour ces derniers, ces faibles corrélations sont probablement à associer aux faibles quantités détectées et à la variabilité plus importante des mesures. Les caractéristiques cinétiques de la consommation d'oxygène pour chaque émulsion, dans chaque condition d'incubation incluant les résultats obtenus précédemment avec le initiateur FeSO₄/EDTA, ont été représentées graphiquement dans un repère faisant apparaître les vitesses de consommation d'oxygène estimées (μ) en fonction des temps de latence estimés (L) (Figure 28). Ceci permet de mettre en évidence des comportements spécifiques de certaines émulsions (Figure 29A) ou de certaines conditions d'incubation (Figure 29B). L'oxydabilité importante des émulsions stabilisée par la BLG se traduit par des temps de latence courts (entre 1 et 5 h) et des vitesses de consommation d'oxygène élevées (entre 4 et 8 mmol O_2 kg⁻¹ huile h⁻¹). La variabilité de la stabilité oxydative des émulsions stabilisées par la BCN ou la SAB est bien illustrée ici, avec des valeurs de L et de μ très dispersées : par exemple, dans l'émulsion stabilisée par la SAB, les valeurs de L sont comprises entre 5 et 45 h, et les valeurs de μ entre 2 et 6 mmol O₂ kg⁻¹ huile h⁻¹. L'émulsion stabilisée par le Tween 20 présente généralement à la fois des temps de latence longs (entre 30 et 46 h) et des vitesses de consommation d'oxygène faibles (entre 2 et 4 mmol O2 kg-1 huile h-1), sauf lorsque l'incubation est réalisée en présence de MetMb (L = 5,6 h et $\mu = 1,7$ mmol O₂ kg⁻¹ huile h⁻¹). L'incubation des émulsions à 33°C sans catalyseur chimique conduit à deux comportements oxydatifs extrêmes et opposés : soit une oxydation très rapide, avec des temps de latence courts et les valeurs de μ les plus élevées (8,0 ou 9,2 mmol O₂ kg⁻¹ huile h⁻¹), pour les émulsions stabilisées par la BLG ou la BCN, respectivement ; soit une oxydation très lente, avec les temps de latence les plus longs (44,4 ou 45,9 h) et des valeurs de μ faibles, pour les émulsions stabilisées par la SAB ou le Tween 20, respectivement. L'utilisation de MetMb en tant qu'initiateur d'oxydation se caractérise par des temps de latence courts (entre 1 et 9 h), quel que soit l'émulsifiant, et des vitesses de consommation d'oxygène pouvant être très faibles (1,7 mmol O_2 kg⁻¹ huile h⁻¹ pour l'émulsion stabilisée par le Tween 20). L'incubation des émulsions avec l'AAPH ou le complexe FeSO4/EDTA conduit à des paramètres cinétiques intermédiaires et variables en fonction de l'émulsifiant utilisé. C'est en présence du mélange FeCl₃/Na-asc que la différence d'oxydabilité entre les émulsions stabilisées par les protéines ou par le Tween 20 est la plus remarquable : dans cette condition d'incubation, les premières présentent des temps de latence inférieurs à 6 h et des vitesses de consommation d'oxygène comprises entre 5 et 7 mmol O_2 kg⁻¹ huile h⁻¹; la seconde présente un temps de latence de 30,4 h et une vitesse de consommation d'oxygène de 2,2 mmol O_2 kg⁻¹ huile h⁻¹. Ces particularités propres à chaque condition d'incubation s'expliquent, probablement au moins en partie, par les différents mécanismes d'initiation de l'oxydation des lipides impliqués.



Figure 29. Représentation des vitesses de consommation d'oxygène estimées (μ) en fonction des temps de latence estimés (L) pour des émulsions stabilisées par la BLG (Δ), la SAB (\diamond), la BCN (\Box) ou le Tween 20 (\bullet) incubées dans différentes conditions d'incubation. Coloration en fonction de l'émulsifiant (A) ou de la condition d'incubation (B). Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance asymptotique à 95%.

Ainsi, cette étude a permis de confirmer la meilleure stabilité oxydative d'émulsions stabilisées par un tensioactif, ici le Tween 20, par rapport à des émulsions stabilisées par des protéines, lorsque les quantités d'émulsifiants dans la phase aqueuse des émulsions sont limitées, quelles que soient les conditions d'incubation. Ce travail a aussi mis en évidence que, pour certains émulsifiants comme la SAB, la condition d'incubation choisie peut modifier de façon conséquente la cinétique d'oxydation de l'émulsion.

Deux hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer la meilleure protection contre l'oxydation offerte par les interfaces stabilisées par les tensioactifs par rapport aux interfaces stabilisées par les protéines. Premièrement, les interfaces stabilisées par les tensioactifs seraient *structuralement plus compactes et homogènes* que les interfaces stabilisées par les protéines, constituant ainsi une barrière physique à la diffusion des composés pro-oxydants hydrosolubles vers le substrat lipidique. Cette hypothèse est en accord avec les données de la littérature relatives aux propriétés physiques des interfaces air/eau et huile/eau stabilisées par ces deux types d'émulsifiants (cf. p. 44-45). Cependant, elle n'explique pas certaines observations plus ponctuelles telles que le comportement très variable de l'émulsion stabilisée par la SAB en fonction des conditions d'initiation de l'oxydation. Il est donc possible que la *composition moléculaire* de l'interface et ses *propriétés chimiques* soient également impliquées. En particulier, les protéines possèdent des propriétés chimiques variables en fonction de leur composition en acides aminés. Celle-ci influence notamment leurs propriétés de chélation de métaux et de réactivité avec les radicaux libres.

5.3. Modifications et oxydation des protéines dans les émulsions

Certains acides aminés peuvent réagir avec les composés pro-oxydants de la phase aqueuse et certains composés secondaires d'oxydation des lipides. Pour tenter de mieux caractériser les phénomènes oxydatifs se déroulant dans les émulsions stabilisées par les protéines, nous avons étudié les modifications subies par les protéines lors de l'incubation des émulsions. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux modifications subies spécifiquement par les protéines adsorbées à la surface des gouttelettes d'huile, ou non adsorbées dans la phase aqueuse. Nous avons également tenté de mettre en évidence l'aspect cinétique des mécanismes impliqués, et notamment l'enchaînement des réactions liées à l'oxydation des lipides et aux modifications des protéines.

Tout d'abord, les modifications subies par les protéines ont été évaluées globalement *in situ* par fluorescence frontale dans des émulsions incubées dans les différentes conditions oxydantes testées précédemment. Une diminution de la fluorescence du tryptophane (Trp) est observée au cours de l'incubation des émulsions (Figure 30). Les courbes obtenues ont été confrontées aux courbes de consommation d'oxygène précédemment établies, considérées comme un marqueur global de l'oxydation des lipides dans les émulsions.



Figure 30. Evolution de la fluorescence des protéines ($\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 334 \text{ nm}$) (symboles pleins) et de la consommation d'oxygène (symboles vides) dans des émulsions stabilisées par la BLG, la BCN ou la SAB, à pH 6,7, sans excès de protéines en phase aqueuse, incubées à 25°C en présence de FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 μ M (\diamond, \bullet), de FeCl₃/Na-asc 1/1 ; M/M ; 50 μ M ($\times, +$), de MetMb 1 μ M ($\blacktriangle, \triangle$) ou d'AAPH 1 mM (\blacksquare, \square), ou à 33°C (\bigcirc, \bullet). Les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 3 à 12). Les tableaux indiqués sur la droite présentent les temps de latence estimés pour la diminution de fluorescence des protéines (L_F) et pour la consommation d'oxygène (L_{O2}) ± l'intervalle de confiance asymptotique à 95%.

Les temps de latence estimés pour la diminution de fluorescence du Trp sont systématiquement plus courts que les temps de latence estimés pour la consommation d'oxygène. Ainsi, il est probable que certaines modifications des protéines précèdent le démarrage de l'oxydation lipidique dans les émulsions.

Afin d'étudier plus précisément comment la localisation des protéines au sein de l'émulsion (à l'interface huile/eau ou dans la phase aqueuse) affecte leur propension à subir des modifications, les phases crémée et aqueuse d'émulsions incubées à 25°C en présence de fer/EDTA ont été collectées séparément et caractérisées par différentes méthodes. En premier lieu, des mesures de fluorescence frontale ont été réalisées sur ces phases aqueuse et crémée. Les résultats montrent que la diminution de fluorescence du Trp est nettement plus drastique pour les protéines adsorbées à l'interface huile/eau que pour les protéines non adsorbées dans la phase aqueuse (Figure 31).



Figure 31. Spectres de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$) des phases crémée ou aqueuse d'émulsions stabilisées par la BLG, la BCN ou la SAB, à pH 6,7, sans excès de protéines dans la phase aqueuse, fraîchement préparées (t = 0) ou après 24 h ou 48 h d'incubation à 25°C en présence de FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 μ M.

Afin d'évaluer plus précisément la nature des modifications subies par les protéines, les protéines ont été extraites des émulsions « totales » ainsi que des phases crémée et aqueuse d'émulsions à différents temps d'incubation (25° C, FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 µM) et plusieurs analyses ont été réalisées : solubilité des protéines extraites, dosage des groupements carbonyles et électrophorèses en milieu non réducteur ou réducteur. Ces résultats ont tout d'abord mis en évidence que les modifications globales pressenties d'après les expériences de fluorescence frontale sont associées à une forte baisse de la solubilité des protéines au cours de l'oxydation des émulsions (Figure 32). Dans les phases crémées d'émulsions stabilisées

par la BLG ou la SAB, la solubilité des protéines diminue très fortement au cours de l'incubation, atteignant au bout de 48 h une valeur égale à moins de 10% de la solubilité à t = 0. Dans la phase crémée d'émulsion stabilisée par la BCN, la solubilité des protéines est peu modifiée durant les premières 24 h d'incubation, mais est diminuée de moitié après 48 h. A l'inverse, dans les trois émulsions étudiées, la solubilité des protéines non adsorbées en phase aqueuse ne diminue pas au cours de la période d'incubation.



Figure 32. Diminution de la solubilité des protéines dans les émulsions, les phases aqueuses ou les phases crémées d'émulsions stabilisées par la BLG (A), la BCN (B) ou la SAB (C), à pH 6,7, sans excès de protéines dans la phase aqueuse, fraîchement préparées (blanc) ou après 24 h (pointillés) ou 48 h (gris) d'incubation à 25°C en présence de FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 μ M. Les résultats sont exprimés en pourcentages de protéines solubles par rapport à la valeur obtenue à t = 0. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6).

Afin d'étudier la nature des modifications potentiellement impliquées dans la baisse de solubilité des protéines adsorbées au cours de l'incubation, les protéines extraites des différentes fractions à t = 0, 24 h ou 48 h d'incubation ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). Les analyses ont été réalisées en milieu réducteur et non réducteur pour mettre en évidence une éventuelle

agrégation par ponts disulfures. Les profils obtenus pour les protéines extraites des phases aqueuses d'émulsions sont identiques à ceux des protéines natives, quel que soit le temps d'incubation, ce qui confirme l'absence de modifications importantes des protéines non adsorbées. Dans les émulsions stabilisées par la BLG ou la SAB ainsi que dans leurs phases aqueuses, l'intensité de la bande correspondant au monomère diminue fortement au cours de l'incubation (Figure 33). En milieu non réducteur, dans les phases crémées d'émulsions avec BLG ou SAB, cette bande disparaît même à t = 24 h et t = 48 h d'incubation. En revanche, lorsque l'électrophorèse est réalisée en milieu réducteur, une bande de faible intensité est recouvrée. Ceci peut signifier que la perte de solubilité de la BLG et de la BSA adsorbées est en partie liée à une agrégation des protéines par la formation de ponts disulfures. Dans le cas de l'émulsion stabilisée par la BCN et de sa phase crémée, la l'intensité de la bande correspondant au monomère diminue moins au cours de l'incubation et n'est pas modifiée par la présence de l'agent réducteur. Ce résultat est cohérent puisque la BCN ne possède pas de résidu cystéyle dans sa séquence polypeptidique, et ne peut donc pas former de ponts disulfures.



Figure 33. Bandes obtenues par SDS-PAGE, correspondant aux monomères de BLG, BCN ou SAB extraites d'émulsions, de phases aqueuses ou de phases crémées d'émulsions, à t = 0 ou après 24 h ou 48 h d'incubation à 25°C en présence de FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 μ M.

Enfin, afin de caractériser les dégradations oxydatives subies par les protéines, la formation de protéines carbonylées a été analysée dans les trois émulsions ainsi que dans leurs phases aqueuses et crémées, à t = 0, 24 h ou 48 h d'incubation (25°C, FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 μ M) (Figure 34). Pour les trois protéines, la formation de carbonyles est nettement plus importante dans les phases crémées que dans les phases aqueuses d'émulsions. Ceci indique donc une oxydation plus importante des protéines adsorbées par rapport à celles non adsorbées.



Figure 34. Formation de protéines carbonylées dans les émulsions, les phases aqueuses ou les phases crémées d'émulsions stabilisées par la BLG (A), la BCN (B) ou la SAB (C), à pH 6,7, sans excès de protéines dans la phase aqueuse, fraîchement préparées (blanc) ou après 24 h (pointillés) ou 48 h (gris) d'incubation à 25°C en présence de FeSO₄/EDTA 1/1 ; M/M ; 200 μ M. Les résultats sont exprimés en μ moles de carbonyles par g de protéines solubles. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6).

D'après les résultats relatifs aux modifications et à l'oxydation des protéines au cours de l'incubation des émulsions, il ressort deux principaux points : (i) la diminution de fluorescence du Trp débute avant la consommation d'oxygène dans les émulsions, ce qui semble indiquer que des modifications des protéines se produisent avant le démarrage de l'oxydation des lipides ; (ii) les protéines adsorbées à l'interface huile/eau subissent des modifications (agrégation, carbonylation) beaucoup plus importantes que les protéines non adsorbées.

L'interface est considérée comme le siège de l'initiation de l'oxydation des lipides en émulsion. Comme démontré dans les paragraphes précédents, les protéines à l'interface ne semblent pas présenter d'effet protecteur contre l'oxydation des lipides lié à leurs propriétés chimiques. Il est possible que les protéines localisées à l'interface favorisent plutôt

l'oxydation des lipides en émulsion en constituant un site privilégié du démarrage de l'oxydation.

5.4. Oxydation des lipides dans les émulsions stabilisées par des émulsifiants modifiés ou en mélange et caractérisation physique des interfaces impliquées

Le suivi de l'oxydation des lipides dans des émulsions de formulations simples, c'est-à-dire stabilisées par un seul émulsifiant utilisé en quantité limitée, a mis en évidence que le développement de l'oxydation dans ces systèmes est fortement associé au type d'émulsifiant. Le mode de préparation de ces émulsions a permis de s'assurer que les molécules d'émulsifiants étaient majoritairement localisées à l'interface huile/eau, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle les caractéristiques de la couche interfaciale peuvent moduler le développement de l'oxydation lipidique.

Cependant, les expériences précédentes ne permettaient pas de séparer les effets liés à la *composition* de l'interface (protéines ou tensioactifs) des effets liés à sa *structure*. Afin d'étudier plus finement quelles *propriétés physiques et structurales de la couche interfaciale* peuvent être impliquées, nous avons formulé des émulsions stabilisées par des couches interfaciales mixtes (tensioactifs/co-tensioactifs ; protéines/co-émulsifiants) ou modifiées en termes de conformation (protéines dénaturées thermiquement ou partiellement agrégées), et nous avons suivi l'oxydation des lipides dans ces systèmes. Ceci a permis de modifier notablement la structure des interfaces en appliquant des modifications modérées, voire nulles, de leur composition. Enfin, nous avons reconstruit certaines des interfaces impliquées sur des modèles de couches de Langmuir à l'interface air/eau afin d'étudier leur homogénéité en termes de répartition des émulsifiants dans les films ou d'ultrastructure.

5.4.1. Emulsions stabilisées par des mélanges de tensioactifs

Les résultats précédents ont montré que les couches interfaciales stabilisées par des tensioactifs anionique (Citrem) ou non ioniques (Tween 20, Tween 80) confèrent une relativement bonne stabilité oxydative aux émulsions. Ces molécules forment des films interfaciaux fins, compacts et homogènes (Dickinson, 1992; Bos & van Vliet, 2001; McClements, 2005). Des travaux antérieurs ont mis en évidence que la stabilité oxydative d'émulsions stabilisées par un tensioactif non ionique augmentait avec la taille de la tête

polaire du tensioactif (Silvestre et al., 2000), mais dépendait très peu de la longueur de sa chaîne hydrophobe (Chaiyasit et al., 2000). Nous avons, pour notre part, étudié l'influence de l'hétérogénéité de l'interface générée par une modulation des têtes polaires des tensioactifs sur l'oxydation des lipides en émulsion. Pour cela, nous avons formulé des émulsions stabilisées par le Tween 20 seul ou en mélange avec des co-tensioactifs présentant une chaîne hydrophobe identique (principalement de l'acide laurique, C12:0) mais des têtes polaires de taille nettement plus réduite : le Span 20 (monolaurate de sorbitane), qui ne contient pas de chaînes polyoxyéthyléniques (POE), et le monolaurate de glycérol (MLG), qui ne contient ni chaînes POE, ni groupe sorbitane (Figure 35). Ces co-tensioactifs ont été mélangés avec le Tween 20 dans un rapport molaire de 30% pour stabiliser les émulsions. L'utilisation de ces mélanges de tensioactifs n'a modifié ni la taille des gouttelettes lipidiques, ni la proportion de Tween 20 non adsorbé par rapport à l'émulsion stabilisée par le Tween 20 seul (Tableau XIII). Les émulsions ont été préparées à pH 6,7 et incubées à 25° C en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 μ M).



Figure 35. Structures moléculaires du Tween 20 (gauche), du Span 20 (milieu) et du monolaurate de glycérol (droite). Dans la molécule de Tween 20, w + x + y + z = 20.

L'oxydation des lipides dans les trois émulsions a été évaluée par la mesure de la consommation d'oxygène et de la formation des diènes conjugués (DC), du propanal et de l'hexanal. Comme précédemment, les courbes de consommation d'oxygène et de formation des DC ont été ajustées avec l'équation de Gompertz pour estimer les temps de latence (L_1 , L_2) et les vitesses de consommation d'oxygène (μ_1) et de formation des DC (μ_2) pendant la phase exponentielle.

Dans les trois émulsions, la consommation d'oxygène et la formation des DC démarrent après un temps de latence (Figure 36). Les valeurs de μ_1 et μ_2 obtenues sont proches quelle que soit la formulation de l'émulsion ; en revanche, les temps de latence L_1 et L_2 sont plus courts dans les émulsions stabilisées par les mélanges Tween 20/Span 20 et Tween 20/MLG que dans l'émulsion stabilisée par le Tween 20 seul. Ceci indique un développement de l'oxydation des lipides plus précoce lorsqu'un co-tensioactif est incorporé dans la couche interfaciale.



Figure 36. Consommation d'oxygène (a), formation des DC (b) et des composés volatils (c : propanal ; d : hexanal) au cours de l'incubation d'émulsions stabilisées par le Tween 20 seul (\blacklozenge), le mélange Tween 20/Span 20 (70,7/29,3 ; M/M) (\Box) ou le mélange Tween 20/MLG (70,7/29,3 ; M/M) (\triangle) à pH 6,7, à 25°C à l'obscurité, en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 μ M). Dans les graphiques (a) et (b), les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12 pour la consommation d'oxygène ; n = 3 à 6 pour la formation des DC). Dans les graphiques (c) et (d), les barres d'erreur correspondent aux deux valeurs mesurées dans deux émulsions préparées indépendamment. Les tableaux présentés au-dessus des graphiques (a) et (b) indiquent les paramètres cinétiques estimés pour la consommation d'oxygène (L_1 , μ_1) et pour la formation des DC (L_2 , μ_2) \pm l'intervalle de confiance asymptotique à 95%.

Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le temps de latence plus court lorsque le Tween 20 est utilisé en mélange avec un co-tensioactif. Premièrement, contrairement aux deux co-tensioactifs testés, le Tween 20 possède une tête polaire comprenant des chaînes POE qui sont oxydables (Kerwin, 2008). Ces chaînes POE pourraient donc constituer un premier substrat d'oxydation par les composés pro-oxydants provenant de la phase aqueuse (ions métalliques, espèces réactives de l'oxygène). La quantité plus importante de chaînes POE dans l'émulsion stabilisée par le Tween 20 seul que dans les émulsions stabilisées par les mélanges Tween 20/co-tensioactif pourrait donc expliquer le temps de latence plus important observé. Cependant, un tel effet antioxydant est peu vraisemblable car les composés radicalaires formés lors de l'oxydation des chaînes POE ne sont pas stables et auraient plutôt un effet pro-oxydant en favorisant la réaction radicalaire en chaîne.

La deuxième hypothèse pouvant expliquer l'oxydabilité accrue des émulsions stabilisées par les mélanges Tween 20/co-tensioactifs est l'hétérogénéité de structure de la couche interfaciale générée par une répartition inégale des tensioactifs et de leurs têtes polaires, qui pourrait rendre la phase lipidique stériquement plus accessible aux pro-oxydants provenant de la phase aqueuse. Pour tester cette hypothèse, des interfaces stabilisées par le Tween 20, le Span 20, le MLG ou des mélanges Tween 20/co-tensioactifs dans différentes proportions ont été reconstituées sur des films de Langmuir à l'interface air/tampon. L'étude des isothermes de compression de ces films a permis d'analyser les interactions entre tensioactifs et d'en déduire leurs répartitions respectives au sein des interfaces mixtes (Figure 37A, C). Pour cela, l'aire moléculaire occupée par les tensioactifs à une pression de surface donnée a été reportée en fonction de la proportion molaire de co-tensioactif dans le film mixte (Figure 37B, D). Les courbes obtenues montrent une déviation au dessus de la droite joignant les aires moléculaires occupées par le Tween 20 pur et le co-tensioactif pur. Cette déviation positive indique l'établissement d'interactions répulsives entre les deux molécules en présence (Gaines, 1966). D'après des études similaires menées à des interfaces huile végétale/eau (Pilpel & Rabbani, 1988), ces interactions répulsives sont susceptibles de se produire également à l'interface huile/eau dans les émulsions. Si tel est le cas, les co-tensioactifs ne seraient pas répartis régulièrement au sein du film de Tween 20, générant des zones interfaciales d'épaisseur plus mince constituées de Span 20 ou de MLG, où les contacts entre la phase lipidique et les composés pro-oxydants de la phase aqueuse seraient favorisés.



Figure 37. A, C : isothermes de compression de films de Tween 20 (\diamond), de co-tensioactifs (\blacklozenge) (A, MLG ou C, Span 20) ou de mélanges Tween 20/co-tensioactifs (16,4% (\Box), 29,3% (\triangle), 61,5% (\times), 78,8% (\ast), 89,7% (\bigcirc) or 97,1% (+), les pourcentages indiquant la proportion molaire de co-tensioactif dans le mélange). B, D : Aire moyenne (n = 1 à 4) couverte par molécule à 16 mN m⁻¹ en fonction du pourcentage molaire de co-tensioactif (B, MLG ou D, Span 20) dans le film. Les courbes en pointillés représentent le modèle polynomial ajusté aux données expérimentales (R² = 0,93 pour les mélanges Tween 20/MLG ou 0,95 pour les mélanges Tween 20/Span 20). Les courbes indiquées en trait plein joignent linéairement les valeurs d'aires moléculaires moyennes obtenues pour le Tween 20 pur et le co-tensioactif pur, représentant le comportement théorique d'un mélange idéal.

Ce travail constitue donc un premier exemple de couplage entre des approches tridimensionnelle et bidimensionnelle, permettant de proposer un lien entre la stabilité oxydative des émulsions et l'hétérogénéité structurale des interfaces impliquées.

5.4.2. Emulsions stabilisées par des protéines en mélange avec des phospholipides ou de conformation modifiée

Face aux faibles propriétés de barrière contre l'oxydation des couches interfaciales stabilisées par des protéines, nous avons tenté de modifier les couches interfaciales à base de protéines en adoptant deux principales stratégies : (i) l'utilisation de ces protéines dans des couches mixtes, en mélange avec un phospholipide, la dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC) ; (ii) la modification de la conformation de la BLG, globulaire et rigide à l'état natif, par dénaturation thermique ou agrégation partielle. Dans le premier cas, l'hypothèse était que les molécules de DLPC s'adsorbent au niveau des espaces laissés libres par les protéines à l'interface ; dans le second cas, il s'agissait soit d'assurer une meilleure couverture de l'interface avec la protéine dénaturée, soit d'obtenir grâce aux agrégats une interface plus épaisse qui limiterait la diffusion des réactants. L'incorporation de DLPC dans l'émulsion ou la modification de conformation de la BLG n'ont modifié ni la taille des gouttelettes lipidiques, ni la proportion de protéines non adsorbées, par rapport aux émulsions stabilisées par les protéines seules (Tableau XII).

Interfaces mixtes protéines/DLPC :

Les émulsions ont été formulées avec des mélanges protéines/DLPC dans des rapports molaires proches de 1/2. L'oxydation des lipides dans ces émulsions incubées à 25°C en présence de fer/EDTA a été évaluée par la mesure des mêmes marqueurs que précédemment, et comparée aux données obtenues pour les émulsions stabilisées par la BLG seule ou la BCN seule (Figure 38). L'incorporation de DLPC dans la couche interfaciale stabilisée par la BLG modifie peu les courbes de consommation d'oxygène et de formation des DC dans les émulsions correspondantes. En revanche, la consommation d'oxygène se développe plus rapidement dans l'émulsion stabilisée par le mélange BCN/DLPC que dans l'émulsion stabilisée par la BCN seule. La formation de propanal et d'hexanal dans l'espace de tête des émulsions est plus rapide et plus importante en présence de DLPC dans le film interfacial, quelle que soit la protéine utilisée.



Figure 38. Consommation d'oxygène (a), formation des DC (b) et des composés volatils (c : propanal ; d : hexanal) au cours de l'incubation d'émulsions stabilisées par la BLG (\blacktriangle), la BCN (\blacksquare), un mélange BLG/DLPC (1/1,9 ; M/M) (\triangle) ou un mélange BCN/DLPC (1/2,2 ; M/M) (\Box) à pH 6,7, à 25°C à l'obscurité, en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 μ M). Dans les graphiques (a) et (b), les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12 pour la consommation d'oxygène ; n = 3 à 6 pour la formation des DC).

Ces résultats semblent donc indiquer que l'incorporation de DLPC dans des films protéiques interfaciaux favorise l'oxydation de la phase lipidique dispersée, particulièrement dans l'émulsion stabilisée par la BCN. Cette diminution des propriétés de barrière contre l'oxydation de la couche protéique interfaciale pourrait être due à une augmentation de l'hétérogénéité de structure de l'interface induite par la présence du phospholipide. Pour tester cette hypothèse, les interfaces stabilisées par des protéines seules ou en mélange avec de la DLPC, dans les mêmes proportions, ont été reconstituées sur un support solide *via* des films de Langmuir-Blodgett. Ceux-ci ont été analysés par microscopie à force atomique (AFM) afin d'obtenir des informations sur l'ultrastructure, l'épaisseur et l'homogénéité des films protéiques (Figure 39).



Figure 39. Gauche : images obtenues par microscopie à force atomique (AFM) (gauche), représentant la topographie des films de Langmuir-Blodgett préparés à partir de BLG seule ou en mélange avec de la DLPC (A) ou de BCN seule ou en mélange avec de la DLPC (B). Droite : profils de hauteur représentant la variation de rugosité de surface de l'échantillon suivant une ligne transversale de **a** à **b** ou de **c** à **d**. Les caractéristiques structurales des films ont été vérifiées et confirmées en plusieurs localisations de chaque film, observées à différents agrandissements.

Les quatre films étudiés (BLG ; BLG/DLPC 15,7/1 p/p ; BCN ; BCN/DLPC 17,4/1 p/p) présentent une structure assez compacte, avec une homogénéité variable. Le film de BLG contient de nombreuses petites particules d'une hauteur d'environ 1 à 2 nm, ainsi que quelques particules plus grosses, atteignant une hauteur de 10 nm. Lorsque de la DLPC est incorporée dans le film de BLG, ces grosses particules restent présentes ; en revanche, le film

présente une ultrastructure globale plus hétérogène, avec un réseau de grains de 1 à 2 nm de hauteur, plus larges que dans le film de BLG seule. La BCN forme des films très compacts et continus desquels émergent ponctuellement de grosses particules d'une hauteur atteignant 50 nm. En présence de DLPC dans le film de BCN, on retrouve non seulement ces grosses particules, mais aussi de nombreuses petites particules de 1 à 2 nm de hauteur, régulièrement réparties dans le film, qui augmentent la rugosité et l'hétérogénéité de la surface.

Ainsi, pour les couches interfaciales stabilisées par la BLG ou la BCN, l'incorporation de DLPC, même dans une quantité faible, augmente l'hétérogénéité des films de Langmuir-Blodgett correspondants. Si un phénomène comparable peut être extrapolé à l'interface huile/eau, cette hétérogénéité accrue de la couche interfaciale pourrait contribuer à expliquer l'oxydation des lipides plus rapide dans les émulsions. A l'heure actuelle, l'étude des monocouches d'émulsifiants à des interfaces planes air/eau est considérée comme un outil utile et pertinent pour comprendre les propriétés des émulsions (Maldonado-Valderrama et al., 2010; McClements, 2005; Morris & Gunning, 2008), même si la représentativité de ces films par rapport à des interfaces huile/eau en émulsion est probablement limitée par les différences de l'environnement chimique des émulsifiants.

Interfaces stabilisées par la BLG modifiée :

Deux méthodes ont été appliquées pour modifier la conformation de la BLG *pre* émulsification : une dénaturation thermique de la protéine en solution en absence de NaCl, qui résulte en une perte de la structure secondaire et tertiaire de la protéine (Cairoli et al., 1994; Raikos, 2010), et l'utilisation d'un mélange de BLG native et d'agrégats de BLG préalablement préparés et caractérisés (diamètre hydrodynamique ≈ 35 nm), dans un rapport massique 9/1. Les courbes de consommation d'oxygène et les paramètres cinétiques associés (μ_1, L_1) sont très proches pour les trois émulsions (Figure 40). Par contre, la formation des diènes conjugués semble légèrement plus lente dans l'émulsion stabilisée par la BLG partiellement agrégée que dans les émulsions stabilisées par la BLG native ou dénaturée thermiquement. Les courbes de formation du propanal et de l'hexanal semblent confirmer cette tendance, même si la différence est moins marquée vis à vis de la formation d'autres composés comme le 2-pentenal et le 2-heptenal.



Figure 40. Consommation d'oxygène (a), formation des DC (b) et des composés volatils (c : propanal ; d : hexanal ; e : 2-pentenal, f : 2-heptenal) au cours de l'incubation d'émulsions stabilisées par la BLG native (\blacktriangle), dénaturée thermiquement (\diamond) ou partiellement agrégée (\bigcirc) à pH 6,7, à 25°C à l'obscurité, en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 µM). Dans les graphiques (a) et (b), les courbes en pointillés correspondent au modèle de Gompertz avec les paramètres *L* et μ estimés pour chaque émulsion ; les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 pour la consommation d'oxygène ; n = 3 pour la formation des DC). Les tableaux présentés au-dessus des graphiques (a) et (b) indiquent les paramètres cinétiques estimés pour la consommation d'oxygène (L_1 , μ_1) et pour la formation des DC (L_2 , μ_2) ± l'intervalle de confiance asymptotique à 95%.

Dans des travaux antérieurs (Djordjevic et al., 2004; Kellerby et al., 2006b), la dénaturation thermique de protéines sériques réalisée *post* émulsification n'avait pas permis de ralentir le développement de l'oxydation des lipides en émulsion. On peut néanmoins suspecter que le traitement thermique de l'émulsion ait pu favoriser l'oxydation des lipides et ainsi

contrebalancer un éventuel effet protecteur de la couche de protéines dénaturées. Les résultats obtenus dans notre cas ouvrent des perspectives intéressantes, même s'ils restent à confirmer.

Conclusion générale et perspectives

L'oxydation des lipides conduit à la dégradation des qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments. De ce fait, de nombreux travaux se sont intéressés à l'effet des paramètres de formulation, et notamment du type d'émulsifiant, sur l'oxydation des lipides dans des modèles de matrices alimentaires de type émulsions huile dans eau. Ces travaux ont généralement conduit à l'hypothèse selon laquelle l'interface entre l'huile et l'eau a un rôle déterminant sur l'oxydation. Cependant, la contribution spécifique des émulsifiants localisés à l'interface huile/eau au développement de l'oxydation n'avait été ni clairement démontrée, ni reliée directement aux caractéristiques physiques et structurales de ces interfaces.

L'objectif de cette thèse était donc de montrer que la structure de l'interface entre l'huile et la phase aqueuse peut être maîtrisée de façon à protéger les lipides en émulsion contre l'oxydation.

L'homogénéité de structure de l'interface est un facteur clé dans la stabilité oxydative des émulsions stabilisées par des monocouches d'émulsifiants.

D'après ce travail, plusieurs arguments vont dans le sens de cette hypothèse. En premier lieu, la construction d'émulsions stabilisées par des interfaces mixtes constituées de mélanges protéine (β -lactoglobuline ou β -caséine)/phospholipide ou de mélanges Tween 20/co-tensioactif (Span 20 ou monolauroyl glycérol) a généralement conduit à un développement plus rapide de l'oxydation des lipides dans les émulsions, par rapport aux interfaces stabilisées par un seul émulsifiant. Or, les couches mixtes protéine/phospholipide, reconstruites sur support solide et étudiées par microscopie à force atomique (AFM) ont présenté une topologie plus hétérogène que les couches de protéines. De même, la caractérisation des couches mixtes Tween 20/co-tensioactifs, qui conduit probablement à la formation de zones de compositions distinctes, à une hétérogénéité de l'interface et ainsi à une moindre protection des lipides contre l'oxydation. Enfin, l'oxydabilité accrue des émulsions stabilisées par des protéines seules ou en mélanges serait, au moins en partie, liée à une hétérogénéité structurale plus importante dans les films protéiques que dans les films constitués de monocouches de tensioactifs.

L'oxydation des lipides est favorisée dans les gouttelettes stabilisées par des protéines par rapport à des gouttelettes stabilisées par des tensioactifs.

Nous avons montré que, dans les émulsions de formulations les plus simples, celles qui sont stabilisées par des protéines (albumine de sérum bovin, β -lactoglobuline ou β -caséine) s'oxydent plus rapidement que celles qui sont stabilisées par des tensioactifs (Tween 20, Tween 80 ou Citrem). Cet effet, qui semble *a priori* contredire les données de la littérature, a été observé (i) aux deux pHs testés, ce qui exclut une implication prédominante de la charge de surface des gouttelettes stabilisées par les protéines, et (ii) quelles que soient les conditions d'incubation appliquées (température, utilisation de différents initiateurs chimiques).

Cette apparente contradiction résulte en premier lieu du fait que nos systèmes ont été conçus de façon à amplifier la contribution des émulsifiants adsorbés à l'interface par rapport à celle de la fraction non adsorbée, ce qui n'était pas le cas des travaux antérieurs. L'observation d'un ralentissement de l'oxydation des lipides dans des émulsions auxquelles des émulsifiants en excès ont été ajoutés *post* émulsification, en accord avec les données de la littérature, confirme par ailleurs cette interprétation. Les modifications conformationnelles de la β -lactoglobuline, protéine globulaire rigide à l'état natif, par traitement thermique (états dénaturé ou agrégé), appliquées dans le but de tenter d'améliorer l'effet barrière des interfaces stabilisées par une protéine seule, n'ont pas conduit à une modulation nette des cinétiques d'oxydation des émulsions correspondantes. Un très léger effet protecteur contre l'oxydation de la β -lactoglobuline partiellement agrégée est pressenti. Il devra être confirmé, ce qui permettrait de mettre en évidence l'effet potentiel d'une augmentation de l'épaisseur de la couche interfaciale.

Les protéines de l'interface sont impliquées dans les mécanismes réactionnels de l'oxydation.

Parallèlement à l'oxydation des lipides, nous avons mis en évidence un phénomène spécifique à l'interface : les protéines qui y sont adsorbées subissent des modifications chimiques beaucoup plus importantes que les protéines non adsorbées dans la phase aqueuse des émulsions. Certaines modifications des protéines semblent par ailleurs précéder le démarrage de l'oxydation des lipides dans les émulsions. Une propagation de réactions radicalaires des protéines de l'interface vers la phase lipidique dispersée semble possible, et pourrait également contribuer à expliquer la médiocre protection offerte par les films protéiques contre l'oxydation des lipides. Cette hypothèse de l'implication chimique des protéines dans le déroulement de l'oxydation des lipides est, de plus, appuyée par les comportements oxydatifs variables observés dans les émulsions stabilisées par la SAB et la β -caséine, incubées en présence de différents initiateurs chimiques. Au-delà du rôle probable de la structure de l'interface sur l'oxydation des lipides, nous pensons donc que les phénomènes oxydatifs dépendent également des inter-relations protéines/initiateurs. Ces inter-relations doivent être prises en compte pour tenter de maîtriser l'oxydation dans les milieux complexes.

Une démarche de formulation raisonnée d'émulsions modèles de structure maîtrisée.

Les résultats résumés ci-dessus ont pu être obtenus et exploités grâce à une maîtrise approfondie de nos systèmes d'étude. La démarche de formulation raisonnée adoptée a permis de construire des émulsions et des interfaces présentant des caractéristiques maîtrisées. Des protéines laitières et des tensioactifs de grade alimentaire ont été sélectionnés pour leurs aptitudes à former seuls ou en mélange des couches interfaciales différant par leur composition, leur épaisseur, leur charge et leur homogénéité. Une méthodologie originale de quantification des émulsifiants non adsorbés (protéines et tensioactifs) a été mise en place afin de contrôler la répartition des émulsifiants entre la phase aqueuse de l'émulsion et l'interface huile/eau au fur et à mesure de la mise au point, de la fabrication et du vieillissement des émulsions. En particulier, un nouveau protocole de quantification des tensioactifs par transestérification directe dans la phase aqueuse des émulsions a été développé. Ce protocole, mis au point pour caractériser les émulsions stabilisées par des tensioactifs, est utilisable en présence de protéines. Au terme de cette démarche de formulation raisonnée, des émulsions stabilisées par différents émulsifiants utilisés seuls ou en mélanges, à l'état natif ou modifié, présentant des gouttelettes d'un diamètre en surface moyen d'environ 1,5 à 2 µm et contenant généralement moins de 30% d'émulsifiants non adsorbés et stables physiquement pendant au moins 48 h à 25°C ou 33°C sous agitation lente, ont été obtenues.

Une analyse quantitative des cinétiques d'oxydation.

Au cours de l'incubation des émulsions, les données de consommation d'oxygène, de formation des diènes conjugués et, le cas échéant, de diminution de fluorescence des protéines, ont été ajustées avec un modèle mathématique permettant d'estimer deux paramètres cinétiques : le temps de latence et la vitesse de la réaction pendant la phase

exponentielle. Ceci a permis de comparer en termes cinétiques les différentes phases du développement de l'oxydation des lipides et des modifications des protéines, entre les différentes émulsions.

L'ensemble de ce travail démontre que la composition et la structure de l'interface interviennent directement dans le développement de l'oxydation des lipides émulsionnés. Plusieurs voies de recherche peuvent être proposées pour (i) approfondir la compréhension du lien entre la structure des interfaces et l'oxydation et des mécanismes interfaciaux impliqués, et (ii) développer des formulations offrant une meilleure protection des lipides contre l'oxydation.

Dans ce travail, les films d'émulsifiants ont été reconstitués à des interfaces air/eau en vue de leur caractérisation physique. Cette reconstitution est largement utilisée et considérée comme un modèle permettant raisonnablement d'extrapoler les résultats obtenus aux interfaces huile/eau en émulsion. Il serait néanmoins intéressant de caractériser les couches d'émulsifiants reconstituées sur des interfaces huile/eau. Cela permettrait de caractériser l'ultrastructure de films plus représentatifs de ceux présents *in situ* dans les émulsions. L'utilisation d'un appareillage d'AFM en milieu liquide, par exemple, permettrait de répondre à cet objectif. Il serait également pertinent d'étudier la perméabilité aux gaz ou aux petits solutés de ces couches d'émulsifiants et de caractériser la structure de films de protéines oxydées.

Ce travail a également permis de mettre en évidence que les protéines stabilisant les gouttelettes lipidiques en émulsion subissent des dégradations conséquentes liées à l'oxydation des lipides. Une caractérisation plus précise des modifications chimiques impliquées, par exemple par spectrométrie de masse, pourrait être envisagée. Concernant les protéines non adsorbées, nous avons montré que leur présence en phase aqueuse des émulsions diminue l'oxydation des lipides ; nous proposons d'incorporer des concentrations croissantes d'émulsifiants en excès dans la phase aqueuse d'émulsions formulées avec les quantités minimales d'émulsifiants, et ainsi de déterminer la fraction d'émulsifiants non adsorbés à partir de laquelle l'ordre de stabilité oxydative entre protéines et tensioactifs s'inverse.

Enfin, la protection physico-chimique apportée par les émulsifiants formant une monocouche à l'interface pourrait être encore améliorée (i) en construisant des multicouches épaisses
d'émulsifiants et de polysaccharides et (ii) en y intégrant d'autres constituants tels que des antioxydants lipophilisés pour constituer une barrière chimique interfaciale.

Références bibliographiques

AOAC INTERNATIONAL, Official Methods of Analysis 16th Ed. sec. 33.2.11, Method 991.20. Gaithersburg, MD (1995)

Andersen, C. M., Vishart, M., & Holm, V. K. (2005). Application of fluorescence spectroscopy in the evaluation of light-induced oxidation in cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9985-9992.

Anwar, F., Hussain, A. I., Iqbal, S., & Bhanger, M. I. (2007). Enhancement of the oxidative stability of some vegetable oils by blending with Moringa oleifera oil. *Food Chemistry*, *103*(4), 1181-1191.

Arima, S., Ueno, S., Ogawa, A., & Sato, K. (2009). Scanning Microbeam Small-Angle X-ray Diffraction Study of Interfacial Heterogeneous Crystallization of Fat Crystals in Oil-in-Water Emulsion Droplets. *Langmuir*, 25(17), 9777-9784.

Astorg, P., Guesnet, P., Alessandri, J. M., Galan, P., & Lavialle, M. (2006). Omega-3 polyunsatured fatty acids and health: a mini-review of current knowledge. *Sciences Des Aliments*, 26(1), 8-28.

Atkinson, P. J., Dickinson, E., Horne, D. S., & Richardson, R. M. (1995). Neutron reflectivity of adsorbed beta-casein and beta-lactoglobulin at the air/water interface. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, *91*(17), 2847-2854.

Aveyard, R., Binks, B. P., & Clint, J. H. (2003). Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, *100*, 503-546.

Azuma, G., Kimura, N., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2009). Effect of Droplet Size on the Oxidative Stability of Soybean Oil TAG and Fish Oil TAG in Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Oleo Science*, *58*(6), 329-338.

Baron, C. P., & Andersen, H. J. (2002). Myoglobin-Induced Lipid Oxidation. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3887-3897.

Barros, C. N., Areas, E. P. G., Figueiredo, E. N., & Areas, J. A. G. (2006). Low-resolution H-1 spinspin relaxation of n-decane/water emulsions stabilized by beta-casein. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 48(2), 119-127.

Bartee, S. D., Kim, H. J., & Min, D. B. (2007). Effects of antioxidants on the oxidative stability of oils containing arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 84(4), 363-368.

Belhaj, N., Arab-Tehrany, E., & Linder, M. (2010). Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochemistry*, 45(2), 187-195.

Belhomme, C. (2007). Thèse de doctorat. Propriétés interfaciales et émulsifiantes de la phosvitine du jaune d'œuf : Impacts de la charge et de l'agrégation. *Faculté des Sciences et Techniques*: Université de Nantes.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). Lipids. In: H. D. Belitz, W. Grosch, & P. Schieberle, *Food chemistry 3rd revised edition* (pp. 157-244). Berlin: Springer-Verlag.

Bernasconi, L., & Baerends, E. J. (2009). Generation of Ferryl Species through Dioxygen Activation in Iron/EDTA Systems: A Computational Study. *Inorganic Chemistry*, 48(2), 527-540.

Berton, C., Genot, C., & Ropers, M.-H. (2011a). Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354(2), 739-748.

Berton, C., Ropers, M.-H., Viau, M., & Genot, C. (2011b). Contribution of the Interfacial Layer to the Protection of Emulsified Lipids against Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 5052-5061.

Berton, C., Ropers, M.-H., Bertrand, D., Viau, M., & Genot, C. (In press). Oxidative stability of oil-inwater emulsions stabilised with protein or surfactant emulsifiers in various oxidation conditions. *Food Chemistry*.

Bezelgues, J. B., Serieye, S., Crosset-Perrotin, L., & Leser, M. E. (2008). Interfacial and foaming properties of some food grade low molecular weight surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *331*, 56-62.

Birdi, K. S. (1999). *Self-assembly monolayer structures of lipids and macromolecules at interfaces*. New York: Kluwer Academic/Plenum.

Bongard, S., Meynier, A., Riaublanc, A., & Genot, C. (2009). Protein-stabilized oil-in-water emulsions and low-fat dairy stirred gels. *Journal of Food and Nutrition Research*, 48(1), 42-50.

Borwankar, R. P., & Wasan, D. T. (1988). Equilibrium and dynamics of adsorption of surfactants at fluid-fluid interfaces. *Chemical Engineering Science*, 43(6), 1323-1337.

Bos, M. A., & van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *91*(3), 437-471.

Boyd, J., Parkinson, C., & Sherman, P. (1972). Factors affecting emulsion stability, and the HLB concept. *Journal of Colloid and Interface Science*, *41*(2), 359-370.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brown, E. G., & Hayes, J. (1955). The absorptiometric determination of polyethyleneglycol monooleate. *Analyst*, 80, 755-767.

Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiation Research*, *145*(5), 532-541.

Cairoli, S., Iametti, S., & Bonomi, F. (1994). Reversible and irreversible modifications of betalactoglobulin upon exposure to heat. *Journal of Protein Chemistry*, *13*(3), 347-354.

Calligaris, S., Manzocco, L., & Nicoli, M. C. (2007). Modelling the temperature dependence of oxidation rate in water-in-oil emulsions stored at sub-zero temperatures. *Food Chemistry*, 101(3), 1019-1024.

Calligaris, S., & Nicoli, M. C. (2006). Effect of selected ions from lyotropic series on lipid oxidation rate. *Food Chemistry*, 94(1), 130-134.

Calligaris, S., Sovrano, S., Manzocco, L., & Nicoli, M. C. (2006). Influence of crystallization on the oxidative stability of extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 529-535.

Carlsen, C. U., Moller, J. K. S., & Skibsted, L. H. (2005). Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 485-498.

Caro, A. L., Nino, M. R. R., & Patino, J. M. R. (2009). Topography of dipalmitoyl-phosphatidylcholine monolayers penetrated by beta-casein. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 346(1-3), 146-157.

Casanova, H., & Dickinson, E. (1998). Rheology and flocculation of oil-in-water emulsions made with mixtures of alpha(s1)-casein plus beta-casein. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207(1), 82-89.

Castelain, C., & Genot, C. (1994). Conformational-Changes of Bovine Serum-Albumin Upon Its Adsorption in Dodecane-in-Water Emulsions as Revealed by Front-Face Steady-State Fluorescence. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, *1199*(1), 59-64.

Cayot, P., & Lorient, D. (1998). Structures et Technofonctions des Protéines du Lait. Paris: Lavoisier Tech & Doc.

Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M. T., Lercker, G., & Decker, E. A. (2007). Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chemistry*, *102*(1), 161-167.

Chaiyasit, W., Silvestre, M. P. C., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Ability of surfactant hydrophobic tail group size to alter lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3077-3080.

Chan, H. W.-S. (1987). The mechanisms of autoxidation. In: H. W.-S. Chan, Autoxidation of unsaturated lipids (pp. 141-206). London: Academic Press.

Chapleau, N., & de Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids*, *17*(3), 273-280.

Chee, C. P., Roberts, R. F., & Coupland, J. N. (2006). Effect of temperature, time, medium form and casein on lipid oxidation of polyunsaturated fatty acids in algae oil. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 61(2), 142-145.

Chen, B., Li, H., Ding, Y., & Rao, J. (2011a). Improvement of physicochemical stabilities of emulsions containing oil droplets coated by non-globular protein-beet pectin complex membranes. *Food Research International*, 44(5), 1468-1475.

Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2010). Role of Continuous Phase Anionic Polysaccharides on the Oxidative Stability of Menhaden Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3779-3784.

Chen, B. C., Han, A., Laguerre, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011b). Role of reverse micelles on lipid oxidation in bulk oils: impact of phospholipids on antioxidant activity of alphatocopherol and Trolox. *Food & Function*, 2(6), 302-309.

Cheng, Y., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *120*(1), 101-108.

Cheng, Z., & Li, Y. (2007). What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: an update. *Chemical Reviews*, 107, 748-766.

Cho, Y.-J., Alamed, J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Ability of Chelators to Alter the Physical Location and Prooxidant Activity of Iron in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Food Science*, 68(6), 1952-1957.

Choi, S. J., Decker, E. A., Henson, L., Popplewell, L. M., & McClements, D. J. (2010). Influence of Droplet Charge on the Chemical Stability of Citral in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Food Science*, *75*(6), C536-C540.

Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. AYR, Scotland: The Oily Press.

Clausen, M. R., Skibsted, L. H., & Stagsted, J. (2009). Characterization of Major Radical Scavenger Species in Bovine Milk through Size Exclusion Chromatography and Functional Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(7), 2912-2919.

Combe, N. (2002). Bioavailability of fatty acids and Population Reference Intake. *OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 9(2-3), 135-138.

Conde, E., Gordon, M. H., Moure, A., & Dominguez, H. (2011). Effects of caffeic acid and bovine serum albumin in reducing the rate of development of rancidity in oil-in-water and water-in-oil emulsions. *Food Chemistry*, *129*(4), 1652-1659.

Connor, W. E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1), 171S-175S.

Corongiu, F. P., & Banni, S. (1994). Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology*, 233, 303-310.

Cosgrove, J. P., Church, D. F., & Pryor, W. A. (1987). The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 22(5), 299-304.

Coupland, J. N., & McClements, D. J. (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 7(3), 83-91.

Courthaudon, J. L., Dickinson, E., & Christie, W. W. (1991a). Competitive adsorption of lecithin and beta-casein in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*(8), 1365-1368.

Courthaudon, J. L., Dickinson, E., & Dalgleish, D. G. (1991b). Competitive Adsorption of Beta-Casein and Nonionic Surfactants in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, *145*(2), 390-395.

Courthaudon, J. L., Dickinson, E., Matsumura, Y., & Clark, D. C. (1991c). Competitive Adsorption of Beta-Lactoglobulin + Tween 20 at the Oil-Water Interface. *Colloids and Surfaces*, *56*, 293-300.

Crabb, N. T., & Persinger, H. E. (1964). The determination of polyoxyethylene nonionic surfactants in water at the parts per million level. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *41*, 752-755.

Culbertson, S. M., & Porter, N. A. (2000). Unsymmetrical Azo Initiators Increase Efficiency of Radical Generation in Aqueous Dispersions, Liposomal Membranes, and Lipoproteins. *Journal of the American Chemical Society*, *122*, 4032-4038.

Cuvelier, M. E., Bondet, V., & Berset, C. (2000). Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: Structure-activity relationship. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(8), 819-823.

Dai, L., Li, W., & Hou, X. (1997). Effect of the molecular structure of mixed nonionic surfactants on the temperature of miniemulsion formation. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, *125*(1), 27-32.

Dalgleish, D. G. (1993). The Sizes and Conformations of the Proteins in Adsorbed Layers of Individual Caseins on Latices and in Oil-in-Water Emulsions. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 1(1), 1-8.

Dalgleish, D. G. (1997a). Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science* & *Technology*, 8(1), 1-6.

Dalgleish, D. G. (1997b). Food emulsions stabilized by proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2(6), 573-577.

Dalgleish, D. G., Goff, H. D., Brun, J. M., & Luan, B. B. (2002). Exchange reactions between whey proteins and caseins in heated soya oil-in-water emulsion systems - overall aspects of the reaction. *Food Hydrocolloids*, *16*(4), 303-311.

Dalgleish, D. G., Srinivasan, M., & Singh, H. (1995). Surface-Properties of Oil-in-Water Emulsion Droplets Containing Casein and Tween-60. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2351-2355.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, *329*, 23-38.

Dalsgaard, T. K., Nielsen, J. H., Brown, B., Stadler, N., & Davies, M. J. (2011). Dityrosine, DOPA and radical formation from tyrosine residues on milk proteins with globular and flexible structures as a result of riboflavin-mediated photo-oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7939-7947.

Dalsgaard, T. K., Sorensen, J., Bakman, M., Vognsen, L., Nebel, C., Albrechtsen, R., & Nielsen, J. H. (2010). Light-induced protein and lipid oxidation in cheese: Dependence on fat content and packaging conditions. *Dairy Science & Technology*, *90*(5), 565-577.

Damodaran, S. (2004). Adsorbed layers formed from mixtures of proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *9*, 328-339.

Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3), R54-R66.

Dangles, O., Dufour, C., & Fargeix, G. (2000). Inhibition of lipid peroxidation by quercetin and quercetin derivatives: antioxidant and prooxidant effects. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 2(6), 1215-1222.

Dauphas, S. (2005). Thèse de doctorat. Propriétés interfaciales d'assemblages protéique et lipoprotéique. *Faculté des Sciences et des Techniques*: Université de Nantes.

Dauphas, S., Amestoy, M., Llamas, G., Anton, M., & Riaublanc, A. (2008). Modification of the interactions between beta-casein stabilised oil droplets with calcium addition and temperature changing. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 231-238.

Davies, E. M. (1988). Protein assays: A review of common techniques. *American Biotechnology Laboratory*, 6(5), 28-37.

Davies, K. J., Delsignore, M. E., & Lin, S. W. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9902-9907.

Day, J. P. R., Pudney, P. D. A., & Bain, C. D. (2010). Ellipsometric study of the displacement of milk proteins from the oil-water interface by the non-ionic surfactant C10E8. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *12*(18), 4590-4599.

Decker, E., Alamed, J., & Castro, I. (2010). Interaction Between Polar Components and the Degree of Unsaturation of Fatty Acids on the Oxidative Stability of Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(7), 771-780.

Decker, E. A., & McClements, D. J. (2001). Transition metal and hydroperoxide interactions: An important determinant in the oxidative stability of lipid dispersions. *Inform*, *12*, 251-255.

Diaz, M., Dunn, C. M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003). Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2365-2370.

Dickinson, E. (1991). Competitive Adsorption and Protein Surfactant Interactions in Oil-in-Water Emulsions. *ACS Symposium Series*, 448, 114-129.

Dickinson, E. (1992). Les colloïdes alimentaires. Paris: Masson.

Dickinson, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: Overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2607-2619.

Dickinson, E. (1998). Proteins at interfaces and in emulsions - Stability, rheology and interactions. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, 94(12), 1657-1669.

Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 20(3), 197-210.

Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482.

Dickinson, E. (2010). Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 40-49.

Dickinson, E. (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1966-1983.

Dickinson, E., & Golding, M. (1997). Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, *11*(1), 13-18.

Dickinson, E., Radford, S. J., & Golding, M. (2003). Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, *17*(2), 211-220.

Dickinson, E., Ritzoulis, C., & Povey, M. J. W. (1999). Stability of emulsions containing both sodium caseinate and Tween 20. *Journal of Colloid and Interface Science*, *212*(2), 466-473.

Dickinson, E., & Tanai, S. (1992). Protein Displacement from the Emulsion Droplet Surface by Oil-Soluble and Water-Soluble Surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(2), 179-183.

Dimakou, C. P., Kiokias, S. N., Tsaprouni, I. V., & Oreopoulou, V. (2007). Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophysics*, 2(1), 38-45.

Dimitrova, T. D., & Leal-Calderon, F. (1999). Forces between emulsion droplets stabilized with Tween 20 and proteins. *Langmuir*, *15*(26), 8813-8821.

Dimitrova, T. D., Leal-Calderon, F., Gurkov, T. D., & Campbell, B. (2001). Disjoining pressure vs thickness isotherms of thin emulsion films stabilized by proteins. *Langmuir*, *17*(26), 8069-8077.

Dimitrova, T. D., Leal-Calderon, F., Gurkov, T. D., & Campbell, B. (2004). Surface forces in model oil-in-water emulsions stabilized by proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, *108-109*, 73-86.

Djordjevic, D., Cercaci, L., Alamed, J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Chemical and physical stability of citral and limonene in sodium dodecyl sulfate-chitosan and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(9), 3585-3591.

Djordjevic, D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Oxidative stability of whey proteinstabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential omega-3 fatty acid delivery systems (Part B). *Journal of Food Science*, 69(5), C356-C362.

Donnelly, J. L., Decker, E. A., & McClements, D. J. (1998). Iron-catalyzed oxidation of Menhaden oil as affected by emulsifiers. *Journal of Food Science*, *63*(6), 997-1000.

Doorn, J. A., & Petersen, D. R. (2003). Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144, 93-100.

Douillard, R., Daoud, M., & Aguié-Béghin, V. (2003). Polymer thermodynamics of adsorbed protein layers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(4-5), 380-386.

Dynarowicz-Latka, P., Dhanabalan, A., & Oliveira, O. N. (2001). Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, *91*(2), 221-293.

Elias, R. J., Bridgewater, J. D., Vachet, R. W., Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006). Antioxidant mechanisms of enzymatic hydrolysates of beta-lactoglobulin in food lipid dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9565-9572.

Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441.

Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10248-10253.

Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Impact of thermal processing on the antioxidant mechanisms of continuous phase beta-lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *104*(4), 1402-1409.

Endo, Y., Hoshizaki, S., & Fujimoto, K. (1997). Oxidation of synthetic triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: Effect of oxidation system and triacylglycerol structure. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 74(9), 1041-1045.

Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, *80*(4), 1290-1296.

Estévez, M., Ventanas, S., & Heinonen, M. (2011). Formation of Strecker aldehydes between protein carbonyls - alpha-Aminoadipic and gamma-glutamic semialdehydes - and leucine and isoleucine. *Food Chemistry*, *128*(4), 1051-1057.

Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. Meat Science, 89(3), 259-279.

Euston, S. R., & Hirst, R. L. (1999). Comparison of the concentration-dependent emulsifying properties of protein products containing aggregated and non-aggregated milk protein. *International Dairy Journal*, 9(10), 693-701.

Euston, S. R., & Mayhill, P. G. (2001). Time- and temperature-dependent changes in the adsorbed layer on caseinate-stabilized emulsion droplets. *Food Research International*, *34*(5), 369-376.

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(14), 8139-8144.

Fang, Y., & Dalgleish, D. G. (1993a). Casein adsorption on the surfaces of oil-in-water emulsions modified by lecithin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1(6), 357-364.

Fang, Y., & Dalgleish, D. G. (1993b). Dimensions of the Adsorbed Layers in Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Caseins. *Journal of Colloid and Interface Science*, *156*(2), 329-334.

Fang, Y., & Dalgleish, D. G. (1997). Conformation of beta-Lactoglobulin Studied by FTIR: Effect of pH, Temperature, and Adsorption to the Oil-Water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, *196*(2), 292-298.

Faraji, H., & Lindsay, R. C. (2004). Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7164-7171.

Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4558-4564.

Fiorentini, D., Landi, L., Barzanti, V., & Cabrini, L. (1989). Buffers can modulate the effect of sonication on egg lecithin liposomes. *Free Radical Research Communications*, *6*, 243-250.

Fisk, I. D., White, D. A., Lad, M., & Gray, D. A. (2008). Oxidative stability of sunflower oil bodies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(10), 962-968.

Fomuso, L. B., Corredig, M., & Akoh, C. C. (2002a). Effect of emulsifier on oxidation properties of fish oil-based structured lipid emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2957-2961.

Fomuso, L. B., Corredig, M., & Akoh, C. C. (2002b). Metal-catalyzed oxidation of a structured lipid model emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(24), 7114-7119.

Forni, L. G. (1990). Free radical reactions involving fatty acids: the pulse radiolysis approach. In: C. Vigo-Pelfrey, *Membrane Lipid Oxidation* (pp. 15-32). Boca Raton: CRC Press.

Frankel, E. N. (1985). Chemistry of Autoxidation: Mechanism, Products and Flavor Significance. In: D. B. Min, & T. Smouse, *Flavor Chemistry of Fats and Oils* (pp. 1-37). Champaign, IL: American oil Chemists' Society.

Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, 57(1), 51-55.

Frankel, E. N. (1998). Lipid Oxidation. Dundee: The Oily Press LTD.

Frankel, E. N. (2005). Lipid Oxidation Second Edition. The Oily Press LTD.

Frankel, E. N., Satue-Gracia, T., Meyer, A. S., & German, J. B. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(7), 2094-2099.

Frasch-Melnik, S., Norton, I. T., & Spyropoulos, F. (2010). Fat-crystal stabilised w/o emulsions for controlled salt release. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 437-442.

Gaines, G. L. (1966). Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. Interscience Publisher.

Gambardella, F., Ganzeveld, I. J., Winkelman, J. G. M., & Heeres, E. J. (2005). Kinetics of the reaction of FeII(EDTA) with oxygen in aqueous solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44, 8190-8198.

Garcia, E., Gutierrez, S., Nolasco, H., Carreon, L., & Arjona, O. (2006). Lipid composition of shark liver oil: effects of emulsifying and microencapsulation processes. *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 697-701.

Gardner, H. W. (1979). Lipid Hydroperoxide Reactivity with Proteins and Amino Acids: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 220-229.

Gardner, H. W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology* and Medicine, 7, 65-86.

Genot, C., Gandemer, G., Paternoster, D., & Marion, D. (1990). Etude en système modèle des modifications biochimiques de la sérum albumine bovine en présence de lipides faiblement oxydés. *Sciences des Aliments*, *10*, 403-415.

Genot, C., Kansci, G., & Laroche, M. (1994). Measurement of phospholipid oxidation in model membranes by determination of oxygen consumption with a semi-automatic polarographic method. *Sciences des Aliments*, *14*, 673-682.

Genot, C., Meynier, A., & Riaublanc, A. (2003). Lipid oxidation in emulsions. In: A. Kamal-Eldin, *Lipid Oxidation Pathways* (pp. 190-244). Champaign: AOCS Press.

Gerrard, J. A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology*, *13*(12), 391-399.

Ghosh, S., & Rousseau, D. (2009). Freeze-thaw stability of water-in-oil emulsions. *Journal of Colloid* and *Interface Science*, 339(1), 91-102.

Gohtani, S., Sirendi, M., Yamamoto, N., Kajikawa, K., & Yamano, Y. (1999). Effect of droplet size on oxidation of docosahexaenoic acid in emulsion system. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20(5), 1319-1325.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766.

Gotoh, N., Noguchi, Y., Ishihara, A., Yamaguchi, K., Mizobe, H., Nagai, T., Otake, I., Ichioka, K., & Wada, S. (2010). Highly Unsaturated Fatty Acid might Act as an Antioxidant in Emulsion System Oxidized by Azo Compound. *Journal of Oleo Science*, *59*(12), 631-639.

Grande, R. G. R., & Carvalho, A. J. F. (2011). Compatible Ternary Blends of Chitosan/poly(vinyl alcohol)/poly(lactic acid) Produced by Oil-in-Water Emulsion Processing. *Biomacromolecules*, *12*(4), 907-914.

Granger, C., Barey, P., Toutain, J., & Cansell, M. (2005). Direct quantification of protein partitioning in oil-in-water emulsion by front-face fluorescence: Avoiding the need for centrifugation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 43(3-4), 158-162.

Grigoriev, D. O., & Miller, R. (2009). Mono- and multilayer covered drops as carriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(1), 48-59.

Grosch, W. (1982). Lipid degradation products and flavour. In: I. D. Morton, & A. D. Macleod, *Food flavours* (pp. 325-398). Amsterdam: Elsevier.

Gudipati, V., Sandra, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2010). Oxidative Stability and in Vitro Digestibility of Fish Oil-in-Water Emulsions Containing Multilayered Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8093-8099.

Gunaseelan, K., Romsted, L. S., Gallego, M. J. P., Gonzalez-Romero, E., & Bravo-Diaz, C. (2006). Determining alpha-tocopherol distributions between the oil, water, and interfacial regions of macroemulsions: Novel applications of electroanalytical chemistry and the pseudophase kinetic model. *Advances in Colloid and Interface Science*, *123*, 303-311.

Guzun-Cojocaru, T., Koev, C., Yordanov, M., Karbowiak, T., Cases, E., & Cayot, P. (2011). Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: Transfer of iron from chelates to milk proteins at interface. *Food Chemistry*, *125*(2), 326-333.

Haahr, A. M., & Jacobsen, C. (2008). Emulsifier type, metal chelation and pH affect oxidative stability of n-3-enriched emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(10), 949-961.

Habeebullah, S. F. K., Nielsen, N. S., & Jacobsen, C. (2010). Antioxidant Activity of Potato Peel Extracts in a Fish-Rapeseed Oil Mixture and in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87(11), 1319-1332.

Hait, S. K., & Moulik, S. P. (2001). Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor-acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile-lipophile balance and other parameters of the surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 4(3), 303-309.

Halliwell, B. (1996). Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Research*, 25(5), 439-454.

Hammond, E., & White, P. (2011). A Brief History of Lipid Oxidation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88, 891-897.

Hanlon, M. C., & Seybert, D. W. (1997). The pH dependence of lipid peroxidation using watersoluble azo initiators. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(5), 712-719. Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, *1504*(2-3), 196-219.

He, Q., Zhang, Y., Lu, G., Miller, R., Mohwald, H., & Li, J. B. (2008). Dynamic adsorption and characterization of phospholipid and mixed phospholipid/protein layers at liquid/liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, *140*(2), 67-76.

Heins, A., McPhail, D. B., Sokolowski, T., Stockmann, H., & Schwarz, K. (2007). The location of phenolic antioxidants and radicals at interfaces determines their activity. *Lipids*, 42(6), 573-582.

Helgason, T., Awad, T., Kristbergsson, K., Decker, E. A., McClements, D. J., & Weiss, J. (2009). Impact of Surfactant Properties on Oxidative Stability of beta-Carotene Encapsulated within Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 8033-8040.

Hidalgo, F. J., & Zamora, R. (2002). Methyl linoleate oxidation in the presence of bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5463-5467.

Hirano, S., Miyashita, K., Ota, T., Nishikawa, M., Maruyama, K., & Nakayama, S. (1997). Aqueous oxidation of ethyl linoleate, ethyl linolenate, and ethyl docosahexaenoate. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *61*(2), 281-285.

Holman, R. T., & Elmer, O. C. (1947). The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 24, 127-129.

Hsieh, R. J., & Kinsella, J. E. (1989). Oxidation of polyunsaturated fatty acids: Mechanisms, products and inhibition with emphasis on fish. *Advances in Food and Nutrition Research*, *33*, 233-241.

Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003a). Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1435-1439.

Hu, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2003b). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(6), 1696-1700.

Huang, S. W., Frankel, E. N., Schwarz, K., Aeschbach, R., & German, J. B. (1996a). Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 2951-2956.

Huang, S. W., Frankel, E. N., Schwarz, K., & German, J. B. (1996b). Effect of pH on antioxidant activity of alpha-tocopherol and Trolox in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2496-2502.

Huang, S. W., Hopia, A., Schwarz, K., Frankel, E. N., & German, J. B. (1996c). Antioxidant activity of alpha-tocopherol and Trolox in different lipid substrates: Bulk oils *vs* oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(2), 444-452.

Hunneche, C. S., Lund, M. N., Skibsted, L. H., & Nielsen, J. (2008). Antioxidant activity of a combinatorial library of emulsifier - Antioxidant bioconjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9258-9268.

Hunt, J. A., & Dalgleish, D. G. (1994). Adsorption Behavior of Whey-Protein Isolate and Caseinate in Soya Oil-in-Water Emulsions. *Food Hydrocolloids*, 8(2), 175-187.

Im, S. H., Jeong, Y. H., & Ryoo, J. J. (2008). Simultaneous analysis of anionic, amphoteric, nonionic and cationic surfactant mixtures in shampoo and hair conditioner by RP-HPLC/ELSD and LC/MS. *Analytica Chimica Acta*, *619*(1), 129-136.

Imai, H., Maeda, T., Shima, M., & Adachi, S. (2008). Oxidation of methyl linoleate in oil-in-water micro- and nanoemulsion systems. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(9), 809-815.

Jacobsen, C. (2008). Omega-3s in food emulsions: overview and case studies. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 19(5), 9-12.

Jacobsen, C. (2010a). Challenges when developing omega-3 enriched foods. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 17*(4), 251-258.

Jacobsen, C. (2010b). Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: a multidisciplinary challenge. *Foods for Health in the 21st Century: A Road Map for the Future*, vol. 1190 (pp. 141-150). Oxford: BLACKWELL PUBLISHING.

Jacobsen, C., Timm, M., & Meyer, A. S. (2001). Oxidation in fish oil enriched mayonnaise: Ascorbic acid and low pH increase oxidative deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3947-3956.

Jorgensen, L., Martins, S., & van de Weert, M. (2009). Analysis of Protein Physical Stability in Lipid Based Delivery Systems-The Challenges of Lipid Drug Delivery Systems. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *5*(4), 401-408.

Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Castera, A., & Le Guillou, A. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *80*(12), 1209-1215.

Kajiwara, K., Niki, R., Urakawa, H., Hiraji, Y., Donkai, N., & Nagura, M. (1988). Micellar structure of beta-casein observed by small-angle X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 955, 128-134.

Kanazawa, A., Sawa, T., Akaike, T., & Maeda, H. (2002). Dietary lipid peroxidation products and DNA damage in colon carcinogenesis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*, 439-447.

Karel, M., Schaich, K., & Roy, R. B. (1975). Interaction of Peroxidizing Methyl Linoleate with Some Proteins and Amino-Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(2), 159-163.

Kargar, M., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2011). The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 357(2), 527-533.

Kellerby, S. S., Gu, Y. S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006a). Lipid oxidation in a menhaden oil-in-water emulsion stabilized by sodium caseinate cross-linked with transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10222-10227.

Kellerby, S. S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2006b). Role of proteins in oil-in-water emulsions on the stability of lipid hydroperoxides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7879-7884.

Kerkaert, B., Mestdagh, F. d. r., Cucu, T., Aedo, P. R., Ling, S. Y., & De Meulenaer, B. (2011). Hypochlorous and Peracetic Acid Induced Oxidation of Dairy Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 907-914.

Kerwin, B. A. (2008). Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *97*(8), 2924-2935.

Khan, M. A., & Shahidi, F. (2000). Oxidative stability of stripped and nonstripped borage and evening primrose oils and their emulsions in water. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(9), 963-968.

Kiokias, S., & Bot, A. (2006). Temperature cycling stability of pre-heated acidified whey proteinstabilised o/w emulsion gels in relation to the internal surface area of the emulsion. *Food Hydrocolloids*, 20(2-3), 245-252.

Kiokias, S. N., Dimakou, C. P., Tsaprouni, I. V., & Oreopoulou, V. (2006). Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophysics*, 1(3), 115-123.

Kishk, Y. F. M., & Al-Sayed, H. M. A. (2007). Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *Lwt-Food Science and Technology*, 40(2), 270-277.

Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloids*, *19*(6), 1044-1053.

Kotsmar, C., Grigoriev, D. O., Xu, F., Aksenenko, E. V., Fainerman, V. B., Leser, M. E., & Millert, R. (2008). Equilibrium of Adsorption of Mixed Milk Protein/Surfactant Solutions at the Water/Air Interface. *Langmuir*, 24(24), 13977-13984.

Kubouchi, H., Kai, H., Miyashita, K., & Matsuda, K. (2002). Effects of emulsifiers on the oxidative stability of soybean oil TAG in emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79(6), 567-570.

Labuza, T. P. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 2, 355-405.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244-282.

Laguerre, M. L., Lopez Giraldo, L. J., Lecomte, J. R. M., Figueroa-Espinoza, M.-C., Barea, B., Weiss, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2009). Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11335-11342.

Laguerre, M. L., Lopez Giraldo, L. J., Lecomte, J. R. M., Figueroa-Espinoza, M.-C., Barea, B., Weiss, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2010). Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of Phenolipids in Emulsion: A Parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2869-2876.

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, 447-454.

Le Denmat, M., Anton, M., & Beaumal, V. (2000). Characterisation of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, *14*(6), 539-549.

Leal-Calderon, F., & Schmitt, V. (2008). Solid-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13(4), 217-227.

Leaver, J., Law, A. J. R., & Brechany, E. Y. (1999). Covalent modification of emulsified beta-casein resulting from lipid peroxidation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 210(1), 207-214.

Lee, J., & Decker, E. A. (2011). Effects of metal chelator, sodium azide, and superoxide dismutase (SOD) on the oxidative stability in riboflavin photosensitized O/W emulsion systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6271–6276.

Lee, S. J., Choi, S. J., Li, Y., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). Protein-Stabilized Nanoemulsions and Emulsions: Comparison of Physicochemical Stability, Lipid Oxidation, and Lipase Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 415-427.

Legrand, P. (2004). Comment augmenter l'apport en acides gras n-3 ? Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 11(1), 50-54.

Lesmes, U., Sandra, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2010). Impact of surface deposition of lactoferrin on physical and chemical stability of omega-3 rich lipid droplets stabilised by caseinate. *Food Chemistry*, *123*(1), 99-106.

Let, M. B., Jacobsen, C., & Meyer, A. S. (2004). Effects of fish oil type, lipid antioxidants and presence of rapeseed oil on oxidative flavour stability of fish oil enriched milk. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *106*(3), 170-182.

Let, M. B., Jacobsen, C., & Meyer, A. S. (2007a). Ascorbyl palmitate, gamma-tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2369-2375.

Let, M. B., Jacobsen, C., Sorensen, A. D. M., & Meyer, A. S. (2007b). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1773-1780.

Lethuaut, L., Metro, F., & Genot, C. (2002). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-inwater emulsions stabilized by protein. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79(5), 425-430.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*, *186*, 464-478.

Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, *36*(9), 1495-1502.

Liu, Q., Raina, A. K., Smith, M. A., Sayre, L. M., & Perry, G. (2003). Hydroxynonenal, toxiccarbonyls, and Alzheimer disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 305-313.

Logani, M. K., & Davies, R. E. (1980). Lipid Oxidation - Biologic Effects and Antioxidants - a Review. *Lipids*, 15(6), 485-495.

Lomova, M. V., Sukhorukov, G. B., & Antipina, M. N. (2010). Antioxidant Coating of Micronsize Droplets for Prevention of Lipid Peroxidation in Oil-in-Water Emulsion. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2(12), 3669-3676.

Long, E. K., Murphy, T. C., Leiphon, L. J., Watt, J., Morrow, J. D., Milne, G. L., Howard, J. R. H., & Picklo, M. J. (2008). Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation. *Journal of Neurochemistry*, *105*(3), 714-724.

Lorrain, B., Dufour, C., & Dangles, O. (2010a). Influence of serum albumin and the flavonol quercetin on the peroxidase activity of metmyoglobin. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(9), 1162-1172.

Lorrain, B., Dangles, O., Genot, C., & Dufour, C. (2010b). Chemical Modeling of Heme-Induced Lipid Oxidation in Gastric Conditions and Inhibition by Dietary Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 676-683.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

Lu, D. M., & Rhodes, D. G. (2000). Mixed composition films of Spans and Tween 80 at the air-water interface. *Langmuir*, *16*(21), 8107-8112.

Lucas, R., Comelles, F., Alcaintara, D., Maldonado, O. S., Curcuroze, M., Parra, J. L., & Morales, J. C. (2010). Surface-Active Properties of Lipophilic Antioxidants Tyrosol and Hydroxytyrosol Fatty Acid Esters: A Potential Explanation for the Nonlinear Hypothesis of the Antioxidant Activity in Oilin-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8021-8026.

Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 83-95.

Luo, Z., Murray, B. S., Yusoff, A., Morgan, M. R. A., Povey, M. J. W., & Day, A. J. (2011). Particle-Stabilizing Effects of Flavonoids at the Oil/Water Interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2636-2645.

Mackie, A. R., Gunning, A. P., Wilde, P. J., & Morris, V. J. (2000). Orogenic Displacement of Protein from the Oil/Water Interface. *Langmuir*, *16*(5), 2242-2247.

Mahoney, J. R., & Graf, E. (1986). Role of alpha-tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model systems. *Journal of Food Science*, *51*(5), 1293-1296.

Mailliart, P., & Ribadeau-Dumas, B. (1988). Preparation of beta-Lactoglobulin and p-Lactoglobulin-Free Proteins from Whey Retentate by NaCl Salting Out at Low pH. *Journal of Food Science*, *53*(3), 743-745.

Maldonado-Valderrama, J., Gunning, A. P., Wilde, P. J., & Morris, V. J. (2010). In vitro gastric digestion of interfacial protein structures: visualisation by AFM. *Soft Matter*, *6*(19), 4908-4915.

Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Husband, F. A., Mackie, A. R., Morris, V. J., & Wilde, P. J. (2008). Interfacial characterization of beta-lactoglobulin networks: Displacement by bile salts. *Langmuir*, 24(13), 6759-6767.

Mancuso, J. R., McClements, D. J., & Decker, E. A. (1999a). Ability of iron to promote surfactant peroxide decomposition and oxidize alpha-tocopherol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4146-4149.

Mancuso, J. R., McClements, D. J., & Decker, E. A. (1999b). The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4112-4116.

Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206-210.

Martin, R. A., Richard, C., & Rousseau-Richard, C. (1990). Oxidation of linoleic acid and related or similar compounds. In: C. Vigo-Pelfrey, *Membrane Lipid Oxidation* (pp. 63-100). Boca Raton: CRC Press.

Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635-R666.

Matsumura, Y., Satake, C., Egami, M., & Mori, T. (2000). Interaction of gum arabic, maltodextrin and pullulan with lipids in emulsions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64(9), 1827-1835.

McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. Boca Raton: CRC Press.

McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270-1282.

Medina, I., Lois, S., Alcantara, D., Lucas, R., & Morales, J. C. (2009). Effect of Lipophilization of Hydroxytyrosol on Its Antioxidant Activity in Fish Oils and Fish Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9773-9779.

Mei, L. Y., Decker, E. A., & McClements, D. J. (1998a). Evidence of iron association with emulsion droplets and its impact on lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5072-5077.

Mei, L. Y., McClements, D. J., Wu, J. N., & Decker, E. A. (1998b). Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl. *Food Chemistry*, *61*(3), 307-312.

Mercier, J. C., Grosclaude, F., & Ribadeau-Dumas, B. (1972). Primary structure of bovine caseins. A review. *Milchwiss*, 27, 402-408.

Mestdagh, F., Kerkaert, B., Cucu, T., & De Meulenaer, B. (2011). Interaction between whey proteins and lipids during light-induced oxidation. *Food Chemistry*, *126*(3), 1190-1197.

Meynier, A., Rampon, V., Dalgalarrondo, M., & Genot, C. (2004). Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution. *International Dairy Journal*, *14*(8), 681-690.

Mezouari, S., & Eichner, K. (2007). Evaluation of the stability of blends of sunflower and rice bran oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*(5), 531-535.

Min, B., Nam, K. C., & Ahn, D. U. (2010). Catalytic mechanisms of metmyoglobin on the oxidation of lipids in phospholipid liposome model system. *Food Chemistry*, *123*(2), 231-236.

Min, D. J., Winterton, L., & Andrade, J. D. (1998). Behavior of model proteins, pretreated in urea and/or dithiothreitol, at air/solution interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 197(1), 43-47.

Minotti, G., & Aust, S. D. (1992). Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 27(3), 219-226.

Miyashita, K., Inukai, N., & Ota, T. (1997). Effect of Tween 20 on the oxidative stability of sodium linoleate and sodium docosahexaenoate. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *61*(4), 716-717.

Miyashita, K., Tateda, N., & Ota, T. (1994). Oxidative Stability of Free Fatty-Acid Mixtures from Soybean, Linseed, and Sardine Oils in an Aqueous-Solution. *Fisheries Science*, *60*(3), 315-318.

Mora-Gutierrez, A., Attaie, R., & Farrell, H. M. (2010). Lipid Oxidation in Algae Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Bovine and Caprine Caseins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5131-2139.

Morris, V. J., & Gunning, A. P. (2008). Microscopy, microstructure and displacement of proteins from interfaces: implications for food quality and digestion. *Soft Matter*, 4(5), 943-951.

Mosca, M., Ceglie, A., & Ambrosone, L. (2010). Lipid Oxidation in Water-in-Olive Oil Emulsions Initiated by a Lipophilic Radical Source. *Journal of Physical Chemistry B*, *114*(10), 3550-3558.

Mozuraityte, R., Rustad, T., & Storro, I. (2006). Oxidation of cod phospholipids in liposomes: Effects of salts, pH and zeta potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *108*(11), 944-950.

Murray, B. S., & Dickinson, E. (1996). Interfacial Rheology and the Dynamic Properties of Adsorbed Films of Food Proteins and Surfactants. *Food Science and Technology International*, 2(3), 131-145.

Nakaya, K., Ushio, H., Matsukawa, S., Shimizu, M., & Ohshima, T. (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids*, *40*(5), 501-507.

Nakazawa, R., Shima, M., & Adachi, S. (2008). Effect of Oil-droplet Size on the Oxidation of Microencapsulated Methyl Linoleate. *Journal of Oleo Science*, *57*(4), 225-232.

Neff, W. E., & ElAgaimy, M. (1996). Effect of linoleic acid position in triacylglycerols on their oxidative stability. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29(8), 772-775.

Nielsen, N. S., Petersen, A., Meyer, A. S., Timm-Heinrich, M., & Jacobsen, C. (2004). Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7690-7699.

Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2002). Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5445-5449.

Nuchi, C. D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2001). Impact of tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4912-4916.

Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal*, 24, 1311-1317.

O'Brien, P. J. (1969). Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles. *Canadian Journal of Biochemistry*, 47, 485-492.

Oehlke, K., Heins, A., Stockmann, H., & Schwarz, K. (2010). Impact of emulsifier microenvironments on acid-base equilibrium and activity of antioxidants. *Food Chemistry*, *118*(1), 48-55.

Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2003). Influence of Environmental Conditions on the Stability of Oil in Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin/Chitosan Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(18), 5522-5527.

Okuda, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). Impact of lipid physical state on the oxidation of methyl linolenate in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9624-9628.

Osborn, H. T., & Akoh, C. C. (2004). Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 84(3), 451-456.

Osborn-Barnes, H. T., & Akoh, C. C. (2003). Copper-catalyzed oxidation of a structured lipid-based emulsion containing alpha-tocopherol and citric acid: Influence of pH and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6851-6855.

Ostdal, H., Davies, M. J., & Andersen, H. J. (2002). Reaction between protein radicals and other biomolecules. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*(2), 201-209.

Patton, S., & Huston, G. (1986). A method for isolation of milk fat globules. *Lipids*, 21(2), 170-174.

Pekkarinen, S. S., Stockmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I. M., & Hopia, A. I. (1999). Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3036-3043.

Peltonen, L. J., & Yliruusi, J. (2000). Surface pressure, hysteresis, interfacial tension, and CMC of four sorbitan monoesters at water-air, water-hexane, and hexane-air interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 227(1), 1-6.

Petersen, D. R., & Doorn, J. A. (2004). Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radical Biology and Medicine*, *37*(7), 937-945.

Pichot, R., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2010). O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: The effect of surfactant type and concentration. *Journal of Colloid and Interface Science*, *352*(1), 128-135.

Pilpel, N., & Rabbani, M. E. (1988). Interfacial films in the stabilization of sunflower oil in water emulsions with nonionics. *Journal of Colloid and Interface Science*, *122*(1), 266-273.

Pokorny, J. (1987). Major Factors Affecting the Autoxidation of Lipids. In: H. W.-S. Chan, *Autoxidation of Unsaturated Lipids* (pp. 141-206). London: Academic Press.

Pokorny, J. (2003). Problèmes de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. In: J. Graille, *Lipides et corps gras alimentaires* (pp. 51-75). Paris: Lavoisier.

Ponginebbi, L., Nawar, W. W., & Chinachoti, P. (1999). Oxidation of linoleic acid in emulsions: Effect of substrate, emulsifier, and sugar concentration. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(1), 131-138.

Porter, N. A. (1986). Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Accounts of Chemical Research*, 19, 262-268.

Porter, W. L. (1980). Recent trends in food applications of antioxidants. In: M. G. Simic, & M. Karel, *Autoxidation in food and biological systems*. New York: Plenum Press.

Prior, E. (2003). Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In: J. Graille, *Lipides et corps gras alimentaires* (pp. 147-187). Paris: Lavoisier.

Pryor, W. A., & Castle, L. (1984). Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. In: L. Packer, *Oxygen radicals in biological systems* (pp. 293-295). Orlando: Academic Press.

Raikos, V. (2010). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 259-265.

Rampon, V., Brossard, C., Mouhous-Riou, N., Bousseau, B., Llamas, G., & Genot, C. (2004). The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin. A front-surface fluorescence study. *Advances in Colloid and Interface Science*, *108*, 87-94.

Rampon, V., Genot, C., Riaublanc, A., Anton, A., Axelos, M. A. V., & McClements, D. J. (2003a). Front-face fluorescence spectroscopy study of globular proteins in emulsions: Influence of droplet flocculation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(9), 2490-2495.

Rampon, V., Genot, C., Riaublanc, A., Anton, M., Axelos, M. A. V., & McClements, D. J. (2003b). Front-face fluorescence spectroscopy study of globular proteins in emulsions: Displacement of BSA by a nonionic surfactant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(9), 2482-2489.

Rampon, V., Lethuaut, L., Mouhous-Riou, N., & Genot, C. (2001). Interface characterization and aging of bovine serum albumin stabilized oil-in-water emulsions as revealed by front-surface fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4046-4051.

Rampon, V., Riaublanc, A., Anton, M., Genot, C., & McClements, D. J. (2003c). Evidence that homogenization of BSA-stabilized hexadecane-in-water emulsions induces structure modification of the nonadsorbed protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(20), 5900-5905.

Razanamahefa, L., Lafay, L., Oseredczuk, M., Thiebaut, A., Laloux, L., Gerber, M., Astorg, P., & Berta, J. L. (2005). Dietary fat consumption within French population and quality data on major food contributors composition. *Bulletin Du Cancer*, *92*(7-8), 647-657.

Refsgaard, H. H. F., Tsai, L., & Stadtman, E. R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 611-616.

Reich, L., & Stivala, S. S. (1969). Autoxidation of Hydrocarbons and Polyolefins. New York: Marcel Dekker.

Relkin, P. (1998). Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of beta-lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22, 56-66.

Relkin, P., Sourdet, S., Smith, A. K., Goff, H. D., & Cuvelier, G. (2006). Effects of whey protein aggregation on fat globule microstructure in whipped-frozen emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 1050-1056.

Richards, A., Golding, M., Wijesundera, C., & Lundin, L. (2011). The Influence of Secondary Emulsifiers on Lipid Oxidation within Sodium Caseinate-Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88, 65-73.

Riemersma, R. A. (2002). Analysis and possible significance of oxidised lipids in food. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(7), 419-420.

Ries, D., Ye, A., Haisman, D., & Singh, H. (2010). Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 20(2), 72-78.

Rival, S. G., Boeriu, C. G., & Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 295-302.

Roginsky, V., Zheltukhina, G. A., & Nebolsin, V. E. (2007). Efficacy of metmyoglobin and hemin as a catalyst of lipid peroxidation determined by using a new testing system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6798-6806.

Rullier, B., Novales, B., & Axelos, M. A. V. (2008). Effect of protein aggregates on foaming properties of beta-lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 330(2-3), 96-102.

Salminen, H., Heinonen, M., & Decker, E. (2010). Antioxidant Effects of Berry Phenolics Incorporated in Oil-in-Water Emulsions with Continuous Phase beta-Lactoglobulin. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 87(4), 419-428.

Samokyszyn, V. M., Miller, D. M., Reif, D. W., & Aust, S. D. (1990). Iron-catalyzed lipid peroxidation. In: C. Vigo-Pelfrey, *Membrane Lipid Oxidation*. Boca Raton: CRC Press.

Sanchez, C. C., Nino, M. R. R., Caro, A. L., & Patino, J. M. R. (2005). Biopolymers and emulsifiers at the air-water interface. Implications in food colloid formulations. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 225-234.

Schaich, K. (2005). Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. In: F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition*: John Wiley & Sons.

Schaich, K. (2008). Co-oxidation of proteins by oxidizing lipids. In: A. Kamal-Eldin, & D. B. Min, *Lipid Oxidation Pathways*, vol. 2 (pp. 181-272). Urbana: AOCS Press.

Schwartz, D. K. (1997). Langmuir-Blodgett film structure. Surface Science Reports, 27, 241-334.

Schwarz, K., Huang, S. W., German, J. B., Tiersch, B., Hartmann, J., & Frankel, E. N. (2000). Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4874-4882.

Serfert, Y., Drusch, S., & Schwarz, K. (2009). Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, *113*(4), 1106-1112.

Shen, Z. P., Udabage, P., Burgar, I., & Augustin, M. A. (2005). Characterization of fish oil-in-water emulsions using light-scattering, nuclear magnetic resonance, and gas chromatography-headspace analyses. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 82(11), 797-802.

Shimada, K., Muta, H., Nakamura, Y., Okada, H., Matsuo, K., Yoshioka, S., Matsudaira, T., & Nakamura, T. (1994). Iron-Binding Property and Antioxidative Activity of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(8), 1607-1611.

Shimada, K., Okada, H., Matsuo, K., & Yoshioka, S. (1996). Involvement of chelating action and viscosity in the antioxidative effect of xanthan in an oil/water emulsion. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60(1), 125-127.

Silvestre, M. P. C., Chaiyasit, W., Brannan, R. G., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Ability of surfactant headgroup size to alter lipid and antioxidant oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2057-2061.

Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), 502-507.

Sims, R. J., Fioriti, J. A., & Trumbetas, J. (1979). Effect of sugars and sugar alcohols on autoxidation of safflower oil in emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *56*, 742-745.

Singh, H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1938-1944.

Sirendi, M., Gohtani, S., & Yamano, Y. (1998). Effect of some polysaccharides on oxidative stability of methyl linoleate in emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *19*(5), 679-694.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76-85.

Sorensen, A. D. M., Baron, C. P., Let, M. B., Bruggemann, D. A., Pedersen, L. R. L., & Jacobsen, C. (2007). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Oxidation linked to changes in protein composition at the oil-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1781-1789.

Sorensen, A. D. M., Haahr, A. M., Becker, E. M., Skibsted, L. H., Bergenstahl, B., Nilsson, L., & Jacobsen, C. (2008). Interactions between iron, phenolic compounds, emulsifiers, and pH in omega-3enriched oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(5), 1740-1750.

Stockmann, H., Schwarz, K., & Huynh-Ba, T. (2000). The influence of various emulsifiers on the partitioning and antioxidant activity of hydroxybenzoic acids and their derivatives in oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77(5), 535-542.

Sugiarto, M., Ye, A. Q., Taylor, M. W., & Singh, H. (2010). Milk protein-iron complexes: Inhibition of lipid oxidation in an emulsion. *Dairy Science & Technology*, *90*(1), 87-98.

Sun, C. H., & Gunasekaran, S. (2009). Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 165-174.

Sun, C. H., Gunasekaran, S., & Richards, M. P. (2007). Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 555-564.

Tadolini, B. (1987). Iron autoxidation in MOPS and HEPES buffers. *Free Radical Research Communications*, 4(3), 149-160.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, *108-109*, 303-318.

Taherian, A. R., Britten, M., Sabik, H., & Fustier, P. (2011). Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 868-878.

Takase, K., & Niki, R. (1980). A sedimentation equilibrium study of the temperature-dependant association of bovine beta-casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 622, 1-8.

Tcholakova, S., Denkov, N. D., & Lips, A. (2008). Comparison of solid particles, globular proteins and surfactants as emulsifiers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *10*, 1608-1627.

Tikekar, R. V., Johnson, A., & Nitin, N. (2011). Real-time measurement of oxygen transport across an oil-water emulsion interface. *Journal of Food Engineering*, *103*(1), 14-20.

Tikekar, R. V., & Nitin, N. (2011). Effect of physical state (solid *vs.* liquid) of lipid core on the rate of transport of oxygen and free radicals in solid lipid nanoparticles and emulsion. *Soft Matter*, 7(18), 8149-8157.

Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1473-1478.

Torres, M., Lloret, C., Sosa, M., & Maestri, D. (2006). Composition and oxidative stability of soybean oil in mixtures with jojoba oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *108*(6), 513-520.

Trautwein, E. A. (2001). N-3 Fatty acids - physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *103*(1), 45-55.

Uri, N. (1961). Mechanism of antioxidation. In: W. Lundberg, *Autoxidation and antioxidants* (pp. 133-169). New-York: Wiley.

Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., Maiorino, M., Bittolo Bon, G., & Sevanian, A. (1998). Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(2), 250-252.

van Aken, G. A. (2003). Competitive adsorption of protein and surfactants in highly concentrated emulsions: effect on coalescence mechanisms. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2-3), 209-219.

van Ruth, S. M., Roozen, J. P., & Jansen, F. (2000). Release of odour active compounds from oxidised sunflower oil and its oil-in-water emulsion. *Frontiers of Flavour Science*, 292-299.

Vesper, H., Schmelz, E.-M., Nikolova-Karakashian, M. N., Dillehay, D. L., Lynch, D. V., & Merrill, A. H. (1999). Sphingolipids in Food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition. *The Journal of Nutrition*, *129*(7), 1239-1250.

Vigo-Pelfrey, C. (1990). Membrane Lipid Oxidation. Boca Raton: CRC Press.

Viljanen, K., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2004). Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1104-1111.

Villière, A. (2005). Thèse de doctorat. Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines. *Faculté des Sciences et Techniques*: Université de Nantes.

Villière, A., & Genot, C. (2006). Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 13*(2-3), 152-159.

Villière, A., Rousseau, F., Brossard, C., & Genot, C. (2007). Sensory evaluation of the odour of a sunflower oil emulsion throughout oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 38-48.

Villière, A., Viau, M., Bronnec, I., Moreau, N., & Genot, C. (2005). Oxidative stability of bovine serum albumin- and sodium caseinate-stabilized emulsions depends on metal availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1514-1520.

Volden, J., Bjelanovic, M., Vogt, G., Slinde, E., Skaugen, M., Nordvi, B., & Egelandsdal, B. (2011). Oxidation progress in an emulsion made from metmyoglobin and different triacylglycerols. *Food Chemistry*, *128*(4), 854-863.

Voutsinas, L. P., Cheung, E., & Nakai, S. (1983). Relationships of Hydrophobicity to Emulsifying Properties of Heat Denatured Proteins. *Journal of Food Science*, 48(1), 26-32.

Wang, J., Reyes Suarez, E., Kralovec, J., & Shahidi, F. (2010). Effect of Chemical Randomization on Positional Distribution and Stability of Omega-3 Oil Triacylglycerols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8842-8847.

Wang, S. Y., Hansen, P. M. T., & Barringer, S. A. (1998). Effects of sucrose and CMC on D₂O diffusion in water. *Food Hydrocolloids*, *12*, 115-119.

Waraho, T., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). Prooxidant Mechanisms of Free Fatty Acids in Stripped Soybean Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(15), 7112-7117.

Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011a). Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *129*(3), 854-859.

Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011b). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(1), 3-13.

White, P. (1995). Conjugated diene, anisidine value, and carbonyl value analyses. In: K. Warner, & M. Eskin, *Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods* (pp. 159-178). Champaign: AOCS Press.

Wijesundera, C., Ceccato, C., Watkins, P., Fagan, P., Fraser, B., Thienthong, N., & Perlmutter, P. (2008). Docosahexaenoic acid is more stable to oxidation when located at the sn-2 position of triacylglycerol compared to sn-1(3). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(6), 543-548.

Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, *108*, 63-71.

Wolff, S. P. (1994). Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, 233, 182-189.

Wu, G. S., R.A., S., & Mead, J. F. (1978). Autoxidation of fatty acid monolayers absorbed on silica gel. II. Rates and products. *Lipids*, *12*, 971-978.

Ye, A. Q. (2008). Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate. *Food Chemistry*, *110*(4), 946-952.

Yokozawa, T., Cho, E. J., Hara, Y., & Kitani, K. (2000). Antioxidative Activity of Green Tea Treated with Radical Initiator 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5068-5073.

Yoshimura, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, T., Uchiyama, K., Ohsawa, K., & Imaeda, K. (1992). Effects of Buffer Solutions and Chelators on the Generation of Hydroxyl Radical and the Lipid Peroxidation in the Fenton Reaction System. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *13*, 147-154.

Zamora, R., & Hidalgo, F. J. (2001). Inhibition of proteolysis in oxidized lipid-damaged proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 6006-6011.

Zhai, J., Miles, A. J., Pattenden, L. K., Lee, T. H., Augustin, M. A., Wallace, B. A., Aguilar, M. I., & Wooster, T. J. (2010). Changes in beta-Lactoglobulin Conformation at the Oil/Water Interface of Emulsions Studied by Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy. *Biomacromolecules*, *11*(8), 2136-2142.

Zhang, G., Ni, Y., Churchill, J., & Kokot, S. (2006). Authentication of vegetable oils on the basis of their physico-chemical properties with the aid of chemometrics. *Talanta*, 70(2), 293-300.

Zhu, L., Chen, J. Q., Liu, Y., Pan, Y., & Chang, J. Y. (2011). Differential Scanning Calorimetry Analysis for Water-in-Oil Emulsions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(5), 1117-1123.

Annexes

Annexe I. Caractéristiques physico-chimiques des huiles purifiées par différentes méthodes

Tableau XV. Caractéristiques physico-chimiques d'huile de colza commerciale non purifiée ou purifiée par mélange direct avec différents matériaux adsorbants (huile/matériau adsorbant 2/1; v/v).

Huile/matériau adsorbant	Tension superficielle (air/eau)	Quantité de tocophérols $(\mu g g^{-1}) (1)$	Quantité d'hydroperoxydes (µmol g ⁻¹) (2)
Huile non purifiée	$13,0 \pm 1,0$	501,2	$1,09 \pm 0,10$
Huile purifiée avec silice	$28,7\pm1,0$	513,4	$0,34 \pm 0,13$
Huile purifiée avec alumine	$28,7 \pm 1,0$	$1,80 \pm 0,60$	$0,34 \pm 0,23$
Huile purifiée avec silice/alumine (1/1 : v/v)	-	30,7	-

(1) Détermination de la quantité de tocophérols par HPLC en phase normale couplée à un détecteur de fluorescence.

(2) Dosage des hydroperoxydes présents dans l'huile par la méthode au xylénol orange.

Le cas échéant, les résultats représentent la moyenne \pm l'écart-type de 3 analyses au minimum.

Annexe II. Préparation d'esters méthyliques et composition en acides gras

Les esters méthyliques sont préparés en milieu acide selon un protocole adapté de la méthode décrite par Christie (1989). A environ exactement 15 mg de l'échantillon à analyser déposés dans un tube en verre sont ajoutés 100 μ l de solution de standard interne (acide heptadécanoïque, C17:0, solution à 5 mg ml⁻¹ dans de l'acétone/méthanol ; 2/1 ; v/v). Après évaporation du solvant sous flux d'azote pendant environ 5 minutes, 500 μ l de toluène, 2 ml de méthanol et 400 μ l d'acide sulphurique sont ajoutés. Le tube hermétiquement fermé est agité énergiquement (agitateur de type vortex, 1 minute, 3500 rpm), puis placé à 100°C pendant 1 heure. Après refroidissement, 1 ml d'eau millipore puis 2 ml d'hexane sont ajoutés, et le tube agité au vortex. Après séparation des phases hexanique et aqueuse, la phase hexanique supérieure est prélevée et recueillie dans un pilulier. Après une éventuelle dilution dans de l'hexane, cette phase est injectée en chromatographie en phase gazeuse (CPG).

L'appareil utilisé pour l'analyse des esters méthyliques est un chromatographe Hewlett Packard 5890 Series II, équipé d'une colonne de chromatographie contenant une phase stationnaire polaire J&W Scientific DB-225 (longueur 30 m, diamètre interne 0,320 mm, épaisseur du film 0,25 μ m, phase stationnaire constituée de 50% de cyanopropylphényl et de 50% de méthyl-polysiloxane), d'une pré-colonne et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'injecteur utilisé en mode « on-column » est réglé à une température de 250°C. Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène, avec un débit de 2 ml min⁻¹ et la température du détecteur est fixée à 250°C. La flamme du détecteur est alimentée par un mélange d'air et d'hydrogène avec des débits de 250 et 25 ml min⁻¹, respectivement. Le programme de température appliqué est le suivant :

 $50^{\circ}C (1 \text{ min}) \rightarrow \text{chauffage } 10^{\circ}C \text{ min}^{-1} \rightarrow 180^{\circ}C \rightarrow \text{chauffage } 5^{\circ}C \text{ min}^{-1} \rightarrow 220^{\circ}C (10 \text{ min}).$

Le passage dans le détecteur des esters méthyliques permet l'enregistrement d'une variation de tension. Les pics du chromatogramme obtenu sont identifiés par rapport à des solutions standard (Supelco PUFA n°3 from menhaden oil LA92635 47085U et solution standard d'acides gras saturés). L'intégration des pics du chromatogramme est réalisée à l'aide du logiciel Borwin. Les résultats ont été exprimés en g de chaque acide gras pour 100 g d'acides gras totaux, en utilisant la surface intégrée pour chaque acide gras détecté, ou en g par kg d'échantillon, en utilisant la surface du pic correspondant au standard interne. Trois essais sont réalisés par échantillon.

Annexe III. Détermination de la solubilité des protéines en fonction du pH

La solubilité des trois protéines étudiées a été testée dans des tampons (10 mM) à différents pH, en présence de 80 mM de NaCl (pH 3,0 : tampon acide phosphorique ; pH 4,0 : tampon acide acétique ; pH 5,0 : tampon acide acétique ; pH 6,0 : tampon acide 4-morpholine éthanesulfonique (MES) ; pH 6,7 : tampon PIPES). On a préparé des solutions de protéines dans chacun de ces tampons de façon à avoir une concentration de 1 g Γ^1 si les protéines étaient parfaitement solubles. Après plusieurs heures de dissolution à 4°C sous agitation magnétique modérée, des aliquotes de chaque solution ont été introduites dans des tubes Eppendorfs et centrifugées (10000×g, 20 minutes, 20°C). La concentration en protéines dans les surnageants a été déterminée par spectrophotométrie UV en considérant l'absorbance à 278 nm et en se référant à des gammes d'étalonnage préalablement établies pour les trois protéines dans la phase aqueuse). La Figure 41 représente la concentration en protéines solubles en fonction du pH, pour les trois protéines étudiées.



Figure 41. Solubilité de la SAB (\blacklozenge), de la β -caséine (\blacksquare) et de la β -lactoglobuline (\bullet) en fonction du pH. Les solutions ont été préparées dans des tampons contenant 80 mM de NaCl.

Annexe IV. Détermination de l'état d'agrégation des protéines par gel filtration

Afin de déterminer l'état d'agrégation des protéines utilisées dans la formulation des émulsions, des solutions de β -lactoglobuline, SAB et β -caséine ont été caractérisées en gel filtration. L'appareillage utilisé est une chaîne Waters Alliance 2695 couplée à un détecteur à barrettes de diode (Waters 996 photodiode Array Detector). Les solutions protéiques sont préparées à hauteur de 1 g l⁻¹ dans un tampon Tris 50 mM et NaCl 0,1 M, pH 7,0. La gel filtration est réalisée avec une colonne TSK 3000. Le débit est réglé à 0,4 ml min⁻¹ et le volume d'injection est de 50 µl. La phase mobile est constituée de tampon Tris 50 mM, NaCl 0,1 M en mode isocratique. La masse moléculaire des espèces éluées est déterminée en fonction de leur temps de rétention par rapport à des standards de masse moléculaire connue. Les chromatogrammes obtenus en gel filtration pour la SAB et la β -lactoglobuline sont présentés dans la Figure 42.



Figure 42. Chromatogrammes obtenus en gel filtration pour la SAB (—) et la β -lactoglobuline (—).

Annexe V. Détermination de l'état d'hydrolyse des protéines par chromatographie liquide haute performance en phase inverse

La caractérisation de l'état d'hydrolyse des protéines a été réalisée en recherchant la présence éventuelle de peptides par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse avec une colonne apolaire Symmetry 300 C18 5 μ m Waters (taille des billes : 5 μ m ; porosité : 300 Å). Le solvant A est constitué d'eau et d'acide trifluoroacétique (TFA) à hauteur de 0,11 g/100 g. Le solvant B est constitué d'eau (20 g/100 g), d'acétonitrile (80 g/100g) et de TFA (0,09 g/100 g). Le débit est constant et réglé à 0,2 ml min⁻¹. Le gradient de phase mobile appliqué est défini comme suit :

0 à 30 min : on passe de 100% de phase A à 100% de phase B avec un gradient linéaire,

30 à 32 min : 100% de phase B,

32 à 32,5 min : on passe de 100% de phase B à 100% de phase A avec un gradient linéaire. Le volume d'injection est de 25 μ l.

La Figure 43 représente les chromatogrammes obtenus pour les trois protéines.



Figure 43. Chromatogrammes obtenus en HPLC phase inverse pour la SAB (—), la β -caséine (—) et la β -lactoglobuline (—).

Annexe VI. Protocole de détermination de la teneur en eau des poudres protéiques

La teneur en eau des 3 poudres protéiques utilisées a été déterminée par étuvage, d'après le protocole décrit par la norme AFNOR NF T51-054. Une masse connue de chacune des poudres protéiques est placée une nuit à l'étuve à 103°C. Le résidu est ensuite pesé précisément. La différence de masse entre les deux pesées correspond à la masse d'eau initialement présente dans l'échantillon. Trois essais ont été réalisés par échantillon.



Annexe VII. Caractérisation des protéines natives par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE)

Figure 44. Caractérisation d'albumine de sérum bovin (SAB), de β -caséine, de β lactoglobuline (β -lg, lots 1 et 2) par électrophorèses sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (présence de sodium dodécyl sulfate) ou non dénaturant, en milieu réducteur (présence de β -mercaptoéthanol (BME)) ou non réducteur, en présence de fer (+ Fe) ou non.



Annexe VIII. Optimisation du choix des différentes conditions d'incubation des émulsions : température, concentrations en initiateurs d'oxydation

Figure 45. Consommation d'oxygène au cours de l'incubation d'émulsions stabilisées par le Tween 20, à pH 6,7, dans différentes conditions. L'incubation considérée comme la référence est réalisée à 25°C en présence de FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 μ M) (•). Les autres conditions testées sont : (A) sans initiateur d'oxydation, à 50°C (\Box), 37°C (\diamond) ou 33°C (\triangle) ; (B) à 25°C, en présence de MetMb 2 μ M (\Box) ou 1 μ M (\diamond) ; (C) à 25°C, en présence de FeCl₃/ascorbate de sodium (1/1 ; M/M ; 100 μ M (\Box) ou 50 μ M (\diamond)) ; (D) à 25°C en présence d'AAPH 1 mM (\Box). Dans toutes les conditions testées, l'incubation est réalisée à l'obscurité, sous agitation lente (5 rpm). Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6 à 12).





Figure 46. Droites d'étalonnage obtenues pour le dosage du Tween 80 (A), du Span 20 (B), du monolaurate de glycérol (C) et du Citrem (D) en présence de monoheptadécanoyl glycérol. Chaque point représente la moyenne de 3 essais.
Annexe X. Calcul de la quantité d'oxygène consommé au cours de l'incubation des émulsions

Référence flacons : Interchim, headspace vials 20 ml ref 426950 Interchrom.

Volume du flacon (V _{flacon})	20,5 ml
Volume d'émulsion ($V_{ém}$)	3 ml
Volume d'air dans flacon (V _{air})	17,5 ml
Pourcentage en volume d'O ₂ dans l'air à pression atmosphérique (P_{O2})	20,944 %
Volume molaire des gaz parfaits (V _m) (20°C, P _{atm})	24 M^{-1}
Volume prélevé (V ₁)	0,1 ml
Pourcentage huile dans émulsion (P _H)	30 g/100 g

$$\begin{split} \underline{\text{Masse d'huile par flacon }(m_1) \text{ en } kg : \\ m_1 &= ((V_{\acute{em}} \times P_H) / 100) \times (1 / 1000) \\ m_1 &= 9 \times 10^{-4} \text{ kg} \\ (\text{on considère que 1 ml d'émulsion} \approx 1 \text{ g}). \end{split}$$

Nombre de moles initial d'O₂ dans l'espace de tête (n_{O2}) en µmol : $n_{O2} = (V_{O2} / V_m) \times 10^6$ $n_{O2} = 152,717 \mu mol$

Nombre de moles initial d'O₂ dans le volume d'air prélevé (n₁) en μ mol : n₁ = (n_{O2} × V₁) / V_{air} n₁ = 0,873 μ mol

 $\begin{array}{l} \underline{Quantité\ d'oxygène\ consommé\ a\ l'instant\ t\ (Q_t)\ en\ mmol\ d'O_2\ par\ kg\ d'huile}:\\ Q_t = (n_{O2} - (((A_t \times n_1)\ /\ A_0) \times (V_{air}\ /\ V_1))) \times (0,001\ /\ m_1)\\ Q_t = (152,717\ -\ (((A_t \times 0,873)\ /\ A_0) \times (17,5/\ 0,1))) \times (0,001\ /\ 9 \times 10^{-4})\\ Avec:\\ A_t:\ aire\ du\ pic\ d'O_2\ a\ l'instant\ t\\ A_0:\ aire\ moyenne\ des\ pics\ d'O_2\ du\ blanc\ air \end{array}$





Figure 47. Consommation d'oxygène au cours de l'incubation d'émulsions stabilisées par la SAB (\blacklozenge , \diamondsuit) ou la BCN (\blacksquare , \Box) à 25°C à l'obscurité, après ajout séparé des solutions de FeSO₄ et d'EDTA (1/1 ; M/M ; 200 µM) (symboles pleins) ou du complexe FeSO₄/EDTA (1/1 ; M/M ; 200 µM) préalablement formé par mélange des deux solutions pendant environ 1 h (symboles vides). Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 6).

CONSTRUCTION RAISONNEE D'INTERFACES POUR PROTEGER LES LIPIDES EMULSIONNES CONTRE L'OXYDATION

Les acides gras polyinsaturés ont des effets bénéfiques pour la santé. Cependant, leur forte oxydabilité réduit la qualité sensorielle et nutritionnelle des aliments enrichis en ces acides gras. Dans ces formulations, l'huile est généralement dispersée et stabilisée par des émulsifiants qui se partagent entre les différentes phases des émulsions et peuvent favoriser ou ralentir l'oxydation des lipides. L'objectif de cette thèse était de montrer que la composition et la structure de l'interface entre l'huile et la phase aqueuse peuvent être maîtrisées de façon à protéger les lipides en émulsion contre l'oxydation. Une approche mettant directement en relation la structure et la composition de l'interface avec les cinétiques d'oxydation a été mise en œuvre.

L'oxydation des lipides a été suivie dans des émulsions incubées dans des conditions variées, stabilisées par des protéines ou des tensioactifs et dans lesquelles les émulsifiants étaient majoritairement localisés à l'interface. L'oxydation est moins rapide lorsque les interfaces sont stabilisées par des tensioactifs que lorsqu'elles sont stabilisées par des protéines. Dans ce dernier cas, l'oxydation des protéines adsorbées à l'interface précède celle des lipides. L'utilisation d'émulsifiants en mélange ou de protéines dénaturées ou agrégées ne permet pas d'améliorer les propriétés de barrières des interfaces contre l'oxydation des lipides. La reconstruction des couches interfaciales impliquées dans les émulsions sur des films plans a permis d'établir que l'homogénéité de la couche interfaciale est un facteur clé dans le déroulement de l'oxydation des lipides en émulsion.

Mots-clés : émulsion, lipides, oxydation, interface, protéines, tensioactifs, cinétique

CONTROLLED DESIGN OF INTERFACES TO PROTECT LIPIDS AGAINST OXIDATION IN EMULSIONS

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) are recognized for their health benefits. However, their huge oxidizability may decrease the sensory and nutritional properties of PUFA-enriched foods. In these matrices, oil is usually dispersed and stabilized by emulsifiers which partition among the emulsion phases and may either favor or slow down lipid oxidation. The aim of this work was to demonstrate that the composition and the structure of the oil/water interface can be designed to protect emulsified lipids against oxidation. A coupled approach relating interfacial structure and composition characteristics to oxidation kinetics was thus carried out.

Lipid oxidation in emulsions stabilized with the highest possible proportions of proteins or surfactants located at the interface and incubated in various conditions was slower in the surfactant-stabilized emulsions than in the proteinstabilized ones. In the latter case, adsorbed proteins oxidized prior to lipid oxidation. However, the ability of the interface to behave as barrier against lipid oxidation was not improved by the use of mixtures of emulsifiers or of unfolded or aggregated proteins. Finally, the reconstitution of the emulsion interfacial layers on planar interfaces proved the homogeneity of the interfacial layer to be a key factor in the development of lipid oxidation in emulsions. **Keywords**: emulsion, lipids, oxidation, interface, proteins, surfactants, kinetics