

Centre – Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**DEVELOPPEMENT D'UNE BOISSON NUTRITIVE STABLE À BASE DE
PROTEINES D'ŒUF ENRICHIE EN EXTRAITS NATURELS AYANT DES
FONCTIONS BIOLOGIQUES**

Par

Aymen Ben Abdeljalil

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître en Sciences (M.Sc.)
En **Microbiologie et Biotechnologie**

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Marie-Élise Parent,
INRS-AFSB

Examineur externe

Paul Angers,
Université Laval

Directeur de recherche

Monique Lacroix
INRS-AFSB

REMERCIEMENTS

C'est avec une immense gratitude que je prends ce moment pour exprimer mes sincères remerciements pour toute personne ayant participé de proche ou de loin pour le soutien tout au long de mon parcours de maîtrise. Je tiens à remercier tout d'abord ma directrice de recherche Pr Monique Lacroix, pour m'offrir cette opportunité enrichissante dans son laboratoire de recherche à travers ce projet. J'ai tellement apprécié son mentorat inestimable, sa patience et son encouragement constant. Son expertise et ses conseils ont été essentiels pour réaliser les objectifs de mon travail.

Je veux remercier également Mr Stéphane Salmieri pour son assistance tout au long de ma recherche. Ses recommandations et son support étaient certainement cruciaux pour le bon déroulement de mes expériences.

J'aimerais remercier énormément Dr Lily Jaiswal, Dr Zahra Allahdad (Mona), Dr Shiv Shankar qui ont contribué par leurs recommandations, leurs corrections et leurs soutiens durant différents moments de mon projet.

Je suis également reconnaissant envers mes collègues de laboratoire et mes amis Mohammad, Jumana, Tofa, Sahra, Elizabeth, Elnaz, Chaima, Ghada pour leur soutien mutuel et leurs échanges enrichissants. Je remercie également mes stagiaires Emma et Amel. Leur collaboration a été une source d'inspiration et de motivation tout au long de mon parcours.

Je n'oublie pas le soutien inconditionnel de ma famille; ma mère, mon père mon frère et ma sœur qui ont été mes piliers dans les moments de doute et de stress. Leur amour et leur encouragement m'ont donné la force nécessaire pour persévérer et atteindre cet objectif.

Enfin, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers l'INRS pour tous les services fournis, la qualité d'enseignement et les ressources mises à ma disposition. Sans oublier le service de bibliothèque dirigé par Michel Courcelles.

Votre soutien indéfectible a été la pierre angulaire de cette réussite, et je suis profondément reconnaissant pour cette expérience inoubliable.

Avec toute ma gratitude,

RÉSUMÉ

Compte tenu des attributs nutritionnels et fonctionnels des œufs pour la santé, ce projet vise à concevoir et optimiser trois boissons protéinées à base d'œufs frais, poudre d'œufs (blanc, jaune et œuf entier), huile végétale, et d'hydrocolloïdes adsorbants (HA) à travers une conception composite centrale. Les concentrations optimales des formulations avec œuf entier, blanc d'œuf et jaune d'œuf sont en ordre comme suit (6,8 g protéines, 13,7 g HA, 10,5 mL huile, 5,7pH), (8 g protéines, 11,57 g HA, 9,8 mL huile, 6,44 pH), (7,7 g protéines, 12,7 g HA, 6,87 mL huile, 6,44 pH). La microscopie électronique à transmission et l'aspect physique des boissons ont prouvé une meilleure homogénéité des particules de forme sphérique avec une taille moyenne d'environ 80 nm avec 2 cycles de microfluidisation. La phosvitine a pu résister au traitement de haute pression. 3 saveurs développées avec une teneur protéique entre 17g et 22g par 237mL à base de jus de carotte, de jus de canneberge et d'extraits de fruits ont été fortement appréciées. Les extraits ajoutés ont montré une forte teneur en phénols totaux et activité antiradicalaire. Le traitement de 63°C pendant 3 minutes avec l'activité antibactérienne de l'acide L tartrique ont favorisé la stabilité microbiologique des boissons pendant 50 jours de stockage à 4°C.

Mots-clés : Boisson fonctionnelle ; protéine d'œuf ; stabilité ; optimisation ; microfluidisation ; phosvitine ; stabilité-microbiologie ; nutritionnel

ABSTRACT

Given the nutritional and functional attributes of eggs for health, this project aims to design a protein beverage based on fresh eggs, egg powder, vegetable oil and adsorbent hydrocolloids (HA). Three formulations based on egg white, egg yolk and whole egg were optimized through a central composite design. The optimal concentrations of the formulations with whole egg, egg white and egg yolk are in order as follows (6.8 g protein, 13.7 g HA, 10.5 mL oil, 5.7 pH), (8 g protein, 11.57 g HA, 9.8 mL oil, 6.44 pH), (7.7 g protein, 12.7 g HA, 6.87 mL oil, 6.44 pH). Transmission electron microscopy and the physical appearance of the beverages improved homogeneity of spherical particles, with an average size of around 80 nm after 2 cycles of microfluidization. The stability of phosvitin was proved to withstand the high-pressure treatment of microfluidization and sonication. Three flavours based on carrot juice, cranberry juice and fruit extracts with a high protein content between 17 g to 22 g per 237 mL were highly appreciated after sensorial analysis. The added extracts showed high levels of total phenols and anti-radical activity. Pasteurization at 63°C for 3 minutes, combined with the antibacterial activity of L-tartaric acid, ensured the beverages' microbiological stability for 50 days' storage at 4°C.

Keywords : Functional beverage; egg protein; stability; optimization; microfluidization; phosvitin; shelf life; nutritional

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	IX
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XVII
1 INTRODUCTION.....	1
2 REVUE DE LITTERATURE	4
2.1 PROTÉINES ET BESOIN NUTRITIONNELS	4
2.1.1 <i>Les protéines : propriétés et fonctionnalité</i>	<i>4</i>
2.1.2 <i>Besoins nutritionnels en protéines</i>	<i>4</i>
2.1.3 <i>Les différentes sources de protéines commerciales.....</i>	<i>5</i>
2.2 L'ŒUF COMME SOURCE DE PROTÉINE	6
2.2.1 <i>Composition de l'oeuf.....</i>	<i>6</i>
2.2.2 <i>Valeur nutritive et propriétés nutraceutiques de l'œuf</i>	<i>7</i>
2.2.3 <i>Propriétés fonctionnelles des composants de l'œuf</i>	<i>8</i>
2.3 LA PHOSVITINE, UNE PROTEINE FONCTIONNELLE DANS LE JAUNE D'ŒUF.....	10
2.4 LES BOISSONS PROTEINEES	10
2.4.1 <i>Boissons hyperprotéinées.....</i>	<i>10</i>
2.4.2 <i>Boissons fonctionnelles</i>	<i>11</i>
2.4.3 <i>Digestibilité et assimilation des acides aminés des boissons protéinées.....</i>	<i>11</i>
2.5 DÉVELOPPEMENT DE NANOÉMULSION.....	12
2.5.1 <i>Définition de nanoémulsion.....</i>	<i>12</i>
2.5.2 <i>Stabilité des nanoémulsions</i>	<i>13</i>
2.5.3 <i>Paramètres d'évaluation de la stabilité d'émulsion.....</i>	<i>14</i>
2.5.4 <i>Méthodes pour améliorer la stabilité des boissons.....</i>	<i>16</i>
2.5.4.1. <i>Sonication</i>	<i>17</i>
2.5.4.2. <i>Microfluidisation</i>	<i>17</i>
2.6 ENRICHISSEMENT DES BOISSONS AVEC POLYPHÉNOLS ET ADDITIFS ANTIOXYDANTS.....	18
2.6.1 <i>Additifs nutritionnels, améliorent la qualité de boisson.....</i>	<i>19</i>

2.6.2	<i>Polyphénols et antioxydants</i>	20
2.6.3	<i>Autres additifs améliorant les qualités organoleptiques</i>	21
2.7	STABILITÉ MICROBIOLOGIQUE DE LA BOISSON.....	21
2.7.1	<i>Agents pathogènes des boissons</i>	21
2.7.2	<i>Agents antimicrobiens naturels</i>	22
2.7.3	<i>Durée de vie des produits</i>	23
2.8	VALEUR NUTRITIONNELLE.....	24
3	PROBLEMATIQUE, BUT, HYPOTHESE, OBJECTIF, ET METHODOLOGIE	25
3.1	PROBLEMATIQUE	25
3.2	BUT	26
3.3	HYPOTHESES	26
3.4	OBJECTIFS	26
3.5	MOYEN POUR ATTEINDRE LES OBJECTIFS.....	27
4	ARTICLE:	29
5	REFERENCES ARTICLE	59
6	ANALYSES COMPLÉMENTAIRES	66
6.1	ANALYSE SENSORIELLE.....	66
6.2	ANALYSE DE STABILITÉ DE PHOSVITINE	66
6.2.1	<i>Extraction de la phosvitine</i>	66
6.2.2	<i>Analyse de la protéine sur gel d'électrophorèse</i>	67
6.3	ANALYSE DE LA TENEUR EN PHÉNOL	67
6.4	ANALYSE DE L'ACTIVITÉ ANTIRADICALAIRE.....	68
6.5	ANALYSE DE LA VALEUR NUTRITIVE	69
6.6	ANALYSE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES EXTRAITS.....	69
6.7	ANALYSE DE LA DURÉE DE VIE DES BOISSONS	70
7	RESULTATS COMPLÉMENTAIRES	71
7.1	ANALYSE SENSORIELLE.....	71
7.2	ANALYSE DE STABILITÉ DE PHOSVITINE	73
7.3	ANALYSE DE TENEUR EN PHÉNOLS.....	74
7.4	ANALYSE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE	76
7.5	ANALYSE DE LA VALEUR NUTRITIVE	77
7.6	ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNES DES EXTRAITS	81
7.7	ÉVALUATION DE LA DURÉE DE VIE DE BOISSON	82
8	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	84

8.1	ANALYSES DES PARAMÈTRES DE RÉPONSE DE STABILITÉ POUR OPTIMISER LA COMPOSITION DES ÉMULSIONS	84
8.2	EFFET DES VARIABLES SUR LA TAILLE MOYENNE DES PARTICULES	85
8.3	EFFET DES VARIABLES SUR L'INDICE DE POLYDISPERSITÉ.....	86
8.4	EFFET DES VARIABLES SUR LA CHARGE DES PARTICULES (ZETA-POTENTIEL)	87
8.5	EFFET DES VARIABLES SUR LA VISCOSITÉ DES ÉMULSIONS	88
8.6	COMPOSITIONS OPTIMALES DES ÉMULSIONS	88
8.7	SUIVIE DE STABILITÉ DES ÉMULSIONS DURANT 50 JOURS	89
8.8	OPTIMISATION DE PROCESSUS DE MICROFLUIDISATION	90
8.9	CARACTÉRISATION DES MICROPARTICULES PAR TEM.....	92
8.10	ANALYSE DE L'EFFET DES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS SUR LA STABILITÉ DE LA PHOSVITINE	93
8.11	ANALYSE DE TENEUR EN PHÉNOLS.....	93
8.12	ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS	94
8.13	ANALYSE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS	95
8.14	ANALYSE SENSORIELLE.....	95
8.15	ÉVALUATION DE LA STABILITÉ MICROBIOLOGIQUE DES FORMULATIONS	96
8.16	ANALYSE DE VALEUR NUTRITIONNELLE.....	98
8.17	CONCLUSION GÉNÉRALE	98
9	BIBLIOGRAPHIE.....	100

LISTE DES FIGURES

FIGURE 2.1 ANATOMIE DE L'ŒUF (CREER AVEC BIORENDER)	6
FIGURE 2.2 COMPOSITION POUR 100 G D'ŒUF ENTIER FRAIS	7
FIGURE 4.1. 3D SURFACE PLOTS OF THE VARIABLES EFFECT ON THE EMULSIONS DROPLET SIZE AS A FUNCTION OF A: PROTEIN AND AH CONCENTRATION ON EPBB-1, B: PROTEIN AND AH CONCENTRATION ON EPBB-2 AND , C: PH AND AH CONCENTRATION ON EPBB-3. ..	39
FIGURE 4.2 3D SURFACE PLOTS OF THE WHOLE EGG EMULSION EPBB-1 DROPLET SIZE AS A FUNCTION OF PH AND OIL CONCENTRATION, AT CONSTANT PROTEIN AND AH CONCENTRATIONS.	41
FIGURE 4.3 3D SURFACE PLOTS OF THE EMULSION PDI AS A FUNCTION OF A: PH AND AH ON EPBB- 1, B: PH AND OIL CONCENTRATION ON EPBB-2, C: PROTEIN AND AH CONCENTRATION ON EPBB-3.....	42
FIGURE 4.4 3D SURFACE PLOTS SHOWING THE EFFECT OF PROTEIN AND AH CONCENTRATION ON THE ZETA POTENTIAL FOR A (EPBB-1) AND B (EPBB-2), AND C: THE EFFECT OF PH AND AH ON THE ZETA POTENTIAL OF EPBB-3.....	44
FIGURE 4.5 3D SURFACE PLOTS OF THE VISCOSITY OF THE EMULSION AS A FUNCTION OF A: PROTEIN AND AH CONCENTRATIONS OF EPBB-1, B: OIL AND PROTEIN CONCENTRATIONS OF EPBB-2, C: AH AND PROTEIN OF EPBB-3.	46
FIGURE 4.6 STABILITY PARAMETERS (Z-AVERAGE, PDI AND ZETA POTENTIAL) OF EPBB-1, EPBB-2 AND EPBB-3 DURING 30 DAYS OF STORAGE IN 4°C OF EMULSIONS PREPARED BY SONICATION.	49
FIGURE 4.7 THE PHYSICAL ASPECT OF EPBB FORMULATIONS (EPBB-1, EPBB-2, EPBB-3) WITH DIFFERENT PROCESSES OF MICROFLUIDIZATION AND SONICATION AFTER 30 DAYS OF STORAGE IN 4°C.....	52
FIGURE 4.8 COMPARAISON BETWEEN TEM MICROGRAPHS OF OPTIMIZED FORMULATIONS A (EPBB- 1), B (EPBB-2) AND C (EPBB-3) AFTER SONICATION AND D (EPBB-1), E (EPBB-2) AND F (EPBB-3) AFTER MICROFLUIDIZATION PROCESS, WITH A RESOLUTION OF 100 NM.....	56
FIGURE 6.1 GRAPHIQUE RADAR POUR L'EVALUATION SENSORIELLE DES 4 BOISSONS DEVELOPPEES	72

FIGURE 6.2 ÉLECTROPHORESE SUR GEL SDS-PAGE DE LA PHOSVITINE (1. STANDARD MOLECULAIRE 2. PHOSVITINE CONTROL 3. PHOSVITINE AVEC SONICATION 4. PHOSVITINE AVEC LA MICROFLUIDISATION 5. PHOSVITINE EXTRAITE DE FORMULATION).....	74
FIGURE 6.3 TENEUR EN PHENOLS TOTALE DES EXTRAITS EN MG PAR ML	75
FIGURE 6.4 HISTOGRAMME DES TENEURS EN PHENOL DES FORMULATIONS DEVELOPPEES	75
FIGURE 6.5 ACTIVITE ANTIRADICALAIRE DES EXTRAITS EN POUDRE ET DES JUS EN MM EQ TROLOX .	77
FIGURE 6.6 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'ACIDE TARTRIQUE PAR LE DEEP AGAR TEST CONTRE 4 BACTERIES (E. COLI, S. AUREUS, SAL. TYPHIMERIUM ET LISTERIA MONOCYTOGENES)	82
FIGURE 6.7 DUREE DE CONSERVATION DE CONTROLE ET DES 4 FORMULATIONS TESTEES PAR RAPPORT AU CONTROLE PENDANT 50 JOURS DE STOCKAGE A 4°C.....	83

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1 BESOIN EN PROTEINES SELON L'AGE ET LE SEXE	5
TABLEAU 2.2 LES MAJEURES PROTEINES BIOACTIVES DANS L'ŒUF ENTIER	9
TABLEAU 2.3 PRINCIPALES FAMILLES DE COMPOSES PHENOLIQUES PRESENTS DANS LES FRUITS	19
TABLEAU 4.1 OPTIMAL VARIABLE VALUES AND THEIR DESIRABILITY FOR OPTIMAL STABILITY CONDITIONS OF EACH EPBB.	48
TABLEAU 4.2 EVALUATION OF THE EFFECT OF DIFFERENT MICROFLUIDIZATION CYCLES ON THE STABILITY PARAMETERS OF EACH EPBB.	50
TABLEAU 4.3 AVERAGE PARTICLE SIZES OF OPTIMIZED EMULSIONS WITH SONICATION AND MICROFLUIDIZATION.	57
TABLEAU 6.1 ABSORBANCE DES BANDES DANS LE GEL ELECTROPHORESE ET LEUR POIDS MOLECULAIRE	74
TABLEAU 6.2 VALEUR NUTRITIVE DE LA FORMULATION 1 (A BASE DE MULTIEXTRAITS VEGETAUX ET DE SAVEUR DE MANGUE).	77
TABLEAU 6.3 VALEUR NUTRITIVE DE LA FORMULATION 2 (A BASE DE JUS DE CANNEBERGE ET DE SAVEUR DE FRAMBOISE).	78
TABLEAU 6.4 VALEUR NUTRITIVE DE LA FORMULATION 3 (A BASE DE JUS DE CAROTTE ET DE SAVEUR DE PECHE).	79
TABLEAU 6.5 VALEUR NUTRITIVE DE LA FORMULATION 4 (SAVEUR FRAMBOISE).	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS

EPBB	Boisson à base de protéine d'œuf
AAE	Acides Aminés Essentiels
RTD	Boisson Prêtes à Boire
PDI	Indice de polydispersité
RSM	Méthodologie de Réponse de Surface
CV	Coefficient de variance
DLS	Dynamic Light Scattering
HE	Huiles Essentielles
HIS	Histidine
Gly	Glycine
Lys	Lysine
Ala	Alanine
Glu	Acide glutamique
Thr	Thréonine
DLS	Dynamic Light Scattering
ETM	Microscopie Électronique à Transmission

1 INTRODUCTION

Les protéines, une combinaison de 20 acides aminés différents liés par des liaisons peptidiques, sont l'un des éléments nutritionnels les plus essentiels à consommer pour une alimentation saine. Ces composés jouent un rôle majeur dans la constitution des muscles et d'autres tissus de la structure humaine. De plus, ils sont utilisés pour produire de l'hémoglobine, des hormones et des enzymes (Paddon-Jones et al., 2015). Le corps humain peut synthétiser douze de ces acides aminés, ceux-ci ne sont pas nécessaires à consommer dans un régime alimentaire et ils sont appelés acides aminés non essentiels. Le reste doit être consommé dans l'alimentation quotidienne puisqu'elle représente leur seule source. En plus de leurs différentes propriétés fonctionnelles, les protéines possèdent un effet significatif sur l'odeur, la saveur et la texture des aliments manufacturés. (Doublie et al., 2000). L'apport nutritionnel recommandé en protéines pour un adulte en bonne santé avec un minimum d'activité physique est de 0,83 g de protéines/kg de poids corporel/jour (Tome, 2012). Les valeurs pour les enfants sont plus élevées (entre 0.95 et 1.1 g/kg de poids corporel/jour) parce qu'ils grandissent progressivement. Pour les personnes âgées de plus de 70 ans, des apports entre 1 et 1.2 g /kg de poids corporel/jour sont nécessaires pour maintenir la masse musculaire, la force et la fonction. Pour les athlètes, les recommandations varient entre 1.2 et 2.2 g /kg de poids corporel/jour. Ces apports sont souvent plus élevés chez les athlètes en raison de l'augmentation de la masse musculaire et pour la réparation musculaire après l'exercice. Les protéines alimentaires consommées doivent être de haute qualité avec une valeur biologique supérieure à 75% (Rand et al., 2003; Wu, 2016). La valeur biologique d'une protéine correspond à sa capacité de fournir les acides aminés nécessaires à la croissance, au maintien et à la réparation des tissus corporels. Une valeur biologique élevée indique que cette protéine possède les bonnes proportions d'AAE en plus d'être facilement digestible et absorbable par le corps. Pour combler ces besoins protéiques, plusieurs études antérieures ont envisagé d'utiliser des protéines à base de soja pour les substituts de repas, y compris les shakes, les barres et les boissons protéinées (Childs et al., 2008). Bien que les protéines de soja aient un profil nutritionnel équilibré par rapport à d'autres sources végétales, sa teneur en acides aminés soufrés est limitée comme la cystéine et la méthionine (Tome, 2012). De plus, le soja est dépourvu de vitamines (B12 et D) et a un faible rapport d'efficacité protéique (gain de poids/quantité de protéines ingérées par un rat en croissance) (1,97) par rapport à 3,8 pour les œufs et 2,5 pour la caséine, une des protéines du lait. L'utilisation nette des protéines de soja par l'organisme humain (Net Protein Utilisation : NPU =

$\left(\frac{\text{Protéines réellement utilisées par l'organisme}}{\text{Protéines totales consommées}} \times 100\%\right)$ est également faible de 61 contre 100 pour les protéines d'œufs, ce qui réduit sa valeur biologique de 100 % à 74 % (Agarwal et al., 2015).

Par conséquent, il est important de trouver une alternative au soja afin d'offrir une source protéique mieux équilibrée et de meilleure valeur nutritive sur le marché. Les œufs offrent un équilibre nutritionnel parfait avec un profil complet d'AAE et de toutes les formes de vitamines, y compris les vitamines B12 et D (Réhault-Godbert et al., 2019). En outre, les protéines de l'œuf se caractérisent par une digestibilité et une valeur biologique plus élevées par rapport aux protéines de soja et de lactosérum (Childs et al., 2008). Il a été rapporté que parmi toutes les protéines, l'œuf présentait le score de digestibilité des protéines d'acides aminés corrigés (PDCAAS) le plus élevé avec 118 %, comparé au poisson et à la viande avec 92 à 94 %, au soja 90 à 93 % et aux céréales avec 35 à 37 % (Tome, 2012). Les œufs sont non seulement considérés comme l'une des meilleures sources de protéines, de lipides, de minéraux et de vitamines, mais contiennent également de nombreuses propriétés fonctionnelles telles que les propriétés émulsifiantes et moussantes. L'œuf a une couleur et une saveur uniques, ce qui est important pour de nombreux produits alimentaires (Abeyrathne et al., 2013). De plus, l'œuf a une longue durée de conservation et la saveur est agréable par rapport aux protéines de soja.

De nombreuses études ont démontré que la consommation d'œufs possède plusieurs attributs fonctionnels dont l'alimentation humaine a grandement besoin, y compris de promouvoir la santé osseuse (Park et al., 2018; DiMarco et al., 2017). Plusieurs protéines possèdent différentes propriétés telles que la propriété chélatrice des ions métalliques du phosphatidylsérine, l'activité antioxydante de l'ovalbumine, les propriétés émulsifiantes et antihypertensives de l'ovotransferrine, immunomodulatrices de l'immunoglobuline, antimicrobienne de lysozyme, inhibitrices de la protéase de l'ovomucoïde et des propriétés de liaison des vitamines de lipovitelline (Alais et al., 2020; Réhault-Godbert et al., 2019; Abeyrathne et al., 2013).

Par conséquent, une boisson enrichie en protéines d'œuf a été suggérée comme solution prometteuse pour combler les besoins nutritionnels en protéines des consommateurs, y compris ceux des personnes âgées, des enfants et des athlètes. Ce breuvage présente un meilleur apport chargé d'excellentes protéines nutritionnelles, d'une digestibilité élevée, d'une valeur biologique plus élevée et comprend tous les AAE, vitamines et minéraux nécessaires à la nutrition humaine.

Un mode de vie trépidant et occupé pousse les consommateurs à se tourner vers des options de repas rapides et saines. Cela s'est traduit par la pénétration des boissons prêtes à boire (RTD) qui offrent des nutriments fonctionnels et favorisent les modes de vie actifs. De plus en plus, ces

consommateurs souhaitent jouer un rôle proactif pour leur santé sans dépendre des produits pharmaceutiques qui pourraient avoir des effets secondaires possibles (Corbo et al., 2014). À la suite de cette demande croissante, le marché des boissons fonctionnelles et protéinées est en pleine extension.

De même, les aliments fonctionnels ne sont définis que vaguement comme fournissant les nutriments nécessaires comme les protéines. Sachant qu'une boisson protéinée de type Boost commerciale contient 10 g de protéines par portion de 237 mL, un aliment fonctionnel avec des nutriments spécifiques ajoutés, tel que les fibres et les vitamines peut prévenir plusieurs maladies liées à la nutrition.

Le développement d'une boisson riche en protéines nécessite l'application d'une émulsion. En effet, ce processus permet d'homogénéiser les ingrédients, de créer une dispersion uniforme et de produire une boisson stable au cours de temps. Aussi, pour améliorer la digestibilité et les propriétés physico-chimiques, y compris la texture. La phase dispersée contient principalement des huiles non aromatisants tels que des huiles végétales ou aromatisant comme les terpènes et d'autres ingrédients complètement ou partiellement insolubles dans l'eau, telle que des colorants, des arômes, des parfums, des antioxydants, des vitamines et des agents de charge (McClements, 2004). Pour améliorer les propriétés physico-chimiques des boissons, des polysaccharides sont souvent ajoutés pour maintenir la stabilité pendant l'entreposage aussi pour d'autres raisons comme pour contrôler la viscosité et la texture.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Protéines et Besoin nutritionnels

2.1.1 Les protéines : propriétés et fonctionnalité

Comme étant des macronutriments essentiels pour le corps humain, les protéines possèdent plusieurs fonctions métaboliques et structurelles (Wadhava et al., 2014). L'apport azoté alimentaire est un facteur nutritionnel important dans la régulation du renouvellement protéique du corps. La structure des protéines alimentaires est un facteur essentiel pour leur digestibilité et leur taux d'assimilation. La masse protéique représente environ 15% de la masse totale de l'organisme et varie fréquemment en fonction du régime alimentaire (Alais et al., 2020).

En plus de leur rôle primaire comme source d'acides aminés essentiels, les protéines alimentaires contiennent dans leurs séquences des peptides, qui, une fois libérés par protéolyse, pourraient exercer des effets régulateurs sur certaines fonctions physiologiques ou métaboliques. Ces effets touchent le système immunitaire, digestif, nerveux et cardiovasculaire. Parmi les majeures fonctions biologiques que possèdent les protéines, on peut citer l'activité antibactérienne, antimutogène, immunostimulante ou chélatrice de minéraux (Paddon-Jones et al., 2015).

En outre, les protéines jouent un rôle primordial dans l'industrie alimentaire en ayant plusieurs propriétés comme étant organoleptiques en affectant l'acquisition et la fixation des arômes. Aussi, la solubilité en ayant un effet sur la dispersibilité et la mouillabilité (Morach et al., 2021). Les protéines ont d'autres propriétés comme la capacité de rétention d'eau, coagulation et gélification, moussage et foisonnement, émulsification, liaison des peptides, agrégation, fibrillation, extrusion, texturation et peuvent avoir de la compatibilité avec d'autres additifs pour la fixation des acides aminés (Alais et al., 2020; Tomé, 2008).

2.1.2 Besoins nutritionnels en protéines

Les besoins en protéines et leur apport quotidien peuvent varier en fonction de l'âge, le sexe et l'activité physique. Cependant, le poids corporel médian peut également affecter les besoins de l'organisme. D'après Tomé, (2008), l'apport nutritionnel recommandé pour un adulte en bonne santé ayant une activité physique minimale, est de 0,83 g par kg de poids corporel par jour de protéines digestibles de haute qualité. Mais, comme le montre le **tableau 2.1**, cet apport est plus

élevé chez les personnes ayant une plus grande demande métabolique comme les athlètes, les nourrissons, les enfants et les femmes enceintes ou allaitantes (Davies & Jakeman, 2020). Pour le maintien de la masse musculaire chez les athlètes, un entraînement en force nécessitait des apports azotés supérieurs au minimum d'apport normal recommandé (Bigard, 1996). Il faut maintenir une supplémentation constante de 20 à 25 g de protéines par repas, en particulier à partir de sources de protéines de haute qualité. Cette supplémentation constante peut être difficile à maintenir, surtout si la source de protéines n'est pas appétissante (Harwood & Drake, 2019).

Tableau 2.1 Besoin en protéines selon l'âge et le sexe

Cibles	Recommandation
Hommes de 19 à 70 ans (70kg)	56 g par jour
Femmes de 19 à 70 ans (70kg)	46 g par jour
Enfant moins de 8 ans	2 g/kg/jour
Femme enceinte ou allaitante	30 g par jour plus que l'apport normal
Athlètes	1, 76 g.Kg ⁻¹ .j ⁻¹

Source : (Wadhav et al., 2014; Bigard, 1996)

2.1.3 Les différentes sources de protéines commerciales

Les sources de protéines sont très variées et se divisent en deux catégories, les protéines végétales et les protéines animales. Actuellement, on trouve sur le marché plusieurs suppléments protéiques d'origine végétale comme le soja, le lupin, le pois, la pomme de terre et blé. (Salmieri & Lacroix, 2023.) Les protéines de soja sont largement consommées comme étant des protéines de haute qualité nutritionnelle grâce à leur prix abordable et leur disponibilité massive mondiale (Lonnie et al., 2020). Pourtant, du fait que le marché est en plein potentiel, plusieurs autres protéines sont en émergence telles que le chanvre et les microalgues de source végétale, le beondegi et les criquets de source animale (Dridi et al., 2023; Tomotake et al., 2010).

Les suppléments alimentaires sont majoritairement enrichis par des protéines animales. Par exemple, le lactosérum qui est un sous-produit de l'industrie laitière (Hertzler et al., 2020). Ceci

est utilisé pour ses propriétés nutritionnelles et fonctionnelles. Ils apportent également des minéraux précieux, tels que le calcium, le magnésium et le phosphore, aux formulations, ce qui peut réduire le besoin de sources supplémentaires de ces minéraux (Agarwal et al., 2015). Cependant, plusieurs personnes présentent des intolérances aux protéines lactières y compris le lactose et ceci constituent un obstacle qui réduit son utilisation (Jaiswal & Worku, 2022).

2.2 L'œuf comme source de protéine

Pendant longtemps, l'œuf entier de poule a été considéré comme une source alimentaire complète à travers tous ces composants (**Fig 2.1**). Sa composition en acides aminés essentiels est utilisée comme base pour calculer les indices chimiques d'autres protéines (Alais et al., 2020).

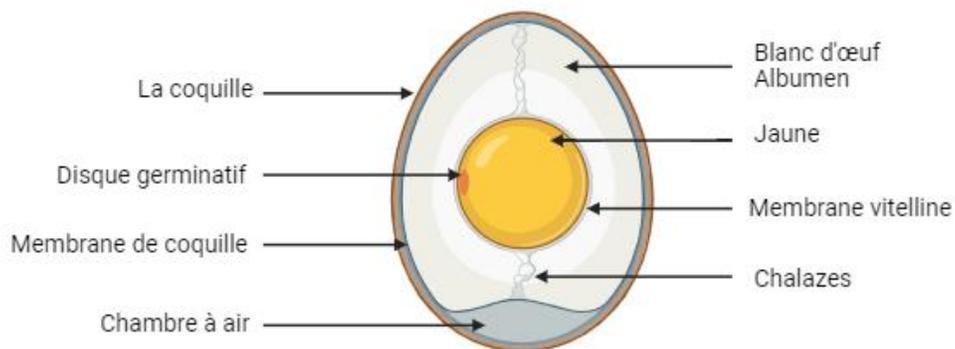


Figure 2.1 Anatomie de l'œuf (Crée avec Biorender)

2.2.1 Composition de l'œuf

Les protéines d'œuf sont réparties uniformément entre le jaune et le blanc d'œuf, tandis que les vitamines, les minéraux et les lipides sont essentiellement concentrés dans le jaune. L'œuf ne contient pas de fibres et son composant principal est l'eau (Réhault-Godbert et al., 2019). Les principaux composants nutritionnels de l'œuf sont très stables, en fonction du rapport entre le blanc et le jaune d'œuf, contrairement aux ingrédients secondaires, qui sont affectés par divers facteurs, notamment la nutrition et la race du poulet. Dans un œuf entier, qu'il soit cru qu'il soit frais ou qu'il soit pondu, l'eau, les protéines, les lipides, les glucides et les minéraux représentent

respectivement environ 66 %, 12 %, 11 %, 0,5 % et 11 % de la masse totale de l'œuf (**Fig.2.2**) (Alais et al., 2020).

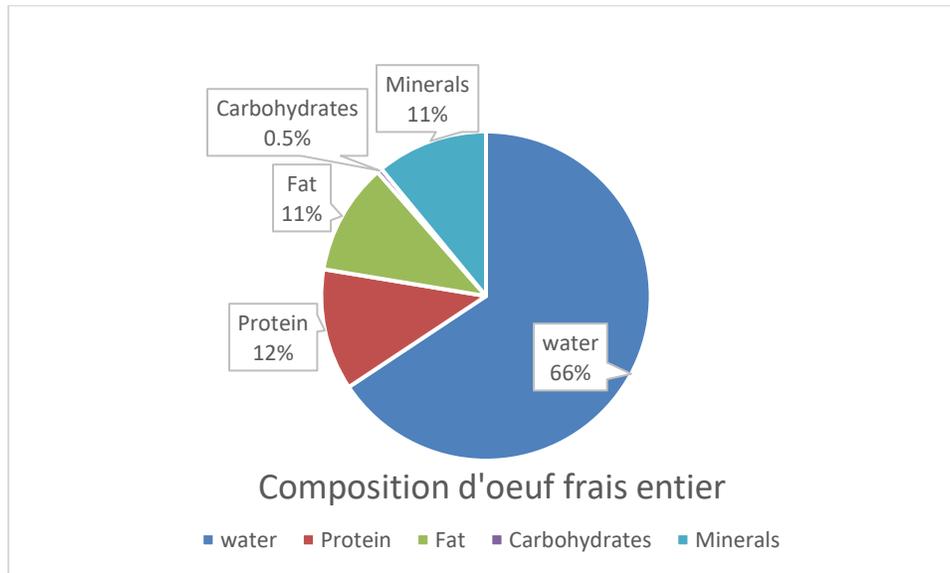


Figure 2.2 Composition pour 100 g d'œuf entier frais
Données tirées de (Alais et al., 2020)

2.2.2 Valeur nutritive et propriétés nutraceutiques de l'œuf

L'œuf présente une source biologique élevée de protéines précieuses et possède un riche profil d'acides aminés essentiels (Leucine, Isoleucine, Valine, Lysine, Méthionine, Phénylalanine, Thréonine, Tryptophane, Histidine) et acides aminés non essentiels (Arginine, Cystéine, Glutamine, Tyrosine, Glycine, Proline, Sérine, Alanine, Asparagine, Acide aspartique, Acide glutamique) (Nowik, 1995). Il fournit plusieurs vitamines à l'alimentation humaine telle que A, B2, B6, B12 et D. En outre, il contient du rétinol et des tocophérols et une source potentielle de minéraux comme : sélénium, zinc, calcium, phosphore, fer, iode, potassium et magnésium (Abeyrathne et al., 2013; Bhat et al., 2015). L'œuf contient aussi des lipides comme les triglycérides, les phospholipides, du cholestérol et des acides gras. Parmi lesquels on note acides gras saturés comme l'acide palmitique, mono-insaturés comme l'acide oléique et polyinsaturés comme l'acide linoléique (oméga-6) et alpha linoléique (oméga-3). De plus, l'œuf se caractérise comme étant un aliment nutraceutique offrant des avantages pour la santé humaine, y compris la prévention et le traitement de certaines maladies (Réhault-Godbert et al., 2019). Les œufs

constituent une source encapsulée de micro et de macronutriments qui répondent à toutes les exigences du développement embryonnaire jusqu'à l'éclosion. Les composés de l'œuf fournissent non seulement une activité antimicrobienne par la présence de lysozyme et phosvitine, mais aussi anti-inflammatoire et antihypertenseur par la présence respective de l'ovotransferrine et de l'ovalbumine (Charles et al., 2008). En plus, les protéines d'œuf présentent une digestibilité exceptionnellement élevée (supérieure à 118%). La présence de leucine contribue à favoriser la solidité des os et la croissance musculaire (Réhault-Godbert et al., 2019). L'œuf reste un produit alimentaire à haute valeur nutritionnelle pour les adultes, y compris pour les personnes âgées et les enfants, et est largement consommé dans le monde entier. Pourtant, pendant des années, les recommandations des nutritionnistes ont encore exercé une influence sur la limitation de la consommation d'œufs pour limiter le développement des maladies cardiovasculaires. La plupart des études expérimentales, cliniques et épidémiologiques concluent qu'il n'y a aucune preuve d'une association entre le cholestérol alimentaire consommé par les œufs et l'augmentation du cholestérol plasmatique total (Réhault-Godbert et al., 2019). En effet, la présence de lécithine dans le jaune d'œuf permet d'émulsifier les graisses dans le tractus digestif facilitant leur digestion et absorption en augmentant la formation des lipoprotéines HDL (lipoprotéines de haute densité). Ces lipoprotéines transportent le cholestérol des tissus vers le foie qui sera converti par la suite en sels biliaires et excrété (Jonas, 2000). D'où les œufs peuvent être consommés dans une alimentation équilibrée sans craindre les maladies cardiovasculaires.

2.2.3 Propriétés fonctionnelles des composants de l'œuf

En plus d'avoir une haute valeur nutritive, l'œuf offre des propriétés fonctionnelles extrêmement importantes pour la transformation en industrie alimentaire. Parmi ces propriétés le pouvoir coagulant de l'œuf entier, ceci consiste en une rupture des liaisons intramoléculaires provoquant un dépolissage des molécules protéiques. Ce phénomène est affecté par divers agents physiques (température, action mécanique) et chimiques (métaux lourds, ions inorganiques) (Alais et al., 2020). Aussi le pouvoir anti-cristallisant de l'ovalbumine du blanc d'œuf, qui à 3%, permet de limiter la formation de cristaux de saccharose qui rend la texture désagréable. Ceci est utile pour inhiber la cristallisation du sucre dans diverses préparations alimentaires, notamment les glaçages, les crèmes pâtisseries et les confitures. En l'ajoutant, le blanc d'œuf réagit comme un agent moussant par excellence grâce à la présence de l'ovalbumine. Cette propriété permet de créer une structure légère et aérée, idéale pour la fabrication de mousses et des desserts pâtisseries. Enfin, le pouvoir émulsifiant de jaune d'œuf, qui joue le rôle d'un tensioactif en

réduisant la tension entre deux phases immiscibles ou bien le rôle d'un agent épaississant qui augmente la viscosité de la phase continue recherchée dans la préparation de sauces mayonnaise, de crèmes et de desserts où une texture crémeuse et onctueuse est souhaitée (Abeyrathne et al., 2013; Charles et al., 2008). Le **tableau 2.2** ci-dessous présente plus spécifiquement les protéines majeures qui existent dans le blanc et le jaune d'œuf, leurs pourcentages dans l'extrait sec et leurs activités biologiques.

Tableau 2.2 Les majeures protéines bioactives dans l'œuf entier

Partie de l'œuf	Protéines d'intérêt	Proportion % d'extrait sec	Activité biologique/ Propriétés
Blanc d'œuf	Ovalbumine	54	Antimicrobien, antihypertensive, antioxydant/ gélifiant, moussant
	Ovotransferrine	12	Fixation des cations métallique, antihypertensive, inhibiteur de bactéries
	L'ovomucoïde	11	Inhibe la trypsine, allergisante
	L'ovomucine	3.5	Facteur de viscosité, inhibiteur de l'hémagglutination virale
	Lysozyme	3.5	Lyse les polysaccharides des bactéries Gram+, moussant, agent conservateur
Jaune d'œuf	La lipovitellénine	68	Transport de lipides et de cholestérol dans le sang
	Lipovitelline	16	Liaison aux lipides, Transport des vitamines telles que A, D, E et K, stockage des nutriments
	Les livétines	10	Activité émulsifiante, Liaison aux lipides, stabilisation des émulsions

	Phosvitine	4	Antimicrobien, Antioxydant, liant fer-calcium, prévention des dommages oxydatifs de l'ADN, prévention de l'ostéoporose
--	------------	---	--

Extrait de (Alais et al., 2020; Réhault-Godbert et al., 2019)

2.3 La phosvitine, une protéine fonctionnelle dans le jaune d'œuf

Le jaune d'œuf est composé d'une partie liquide, appelée plasma, et des particules en suspension appelées granules. Parmi les protéines majeures qui existent dans la fraction granulaire ; la phosvitine. C'est une phosphoglycoprotéine qui contient 80% du phosphore lié aux protéines et 10% du phosphore de l'œuf entier. Bien qu'étant lié aux lipovitellines, c'est une protéine soluble dans l'eau. La phosvitine est considérée comme molécule hétérogène comme étant composée de l' α phosvitine (160 KDa) et la β phosvitine (190 KDa). En effet, elle est composée de deux monomères de masse moléculaire entre 18,5 et 60 kDa. En présence de chlorure de sodium, l' α phosvitine se précipite plus facilement que la β phosvitine (Alais et al., 2020). La sérine présente 30% des résidus d'acides aminés dans la phosvitine. L' α phosvitine est plus riche en Gly, Ala, Lys, Glu, et Thr alors que la β phosvitine est plus riche en His (Charles et al., 2008).

Cette protéine possède plusieurs propriétés nutraceutiques, comme étant antimicrobienne, antioxydant (permet la prévention des dommages oxydatifs liés à l'ADN et modulateur de sécrétion des enzymes antioxydant) et préventif de l'ostéoporose. La phosvitine possède une très forte capacité chélatrice de métaux grâce à la forte teneur (96 %) de l'acide aminé Serine sous forme de phosphoserine (Bhat et al., 2015). La phosvitine se caractérise aussi par le pouvoir liant du fer et du calcium, ce qui inhibe la formation de complexe de fer ou de phosphates de calcium insoluble. Par conséquent, augmenter la biodisponibilité du calcium ou de fer et prévenir l'oxydation des aliments. En plus, elle possède un fort potentiel pour la fortification osseuse (Samaraweera et al., 2011).

2.4 Les boissons protéinées

2.4.1 Boissons hyperprotéinées

Les boissons protéinées sont réputées pour leurs qualités fonctionnelles et nutritionnelles. Auparavant consommées uniquement par les athlètes et les culturistes notamment pour le maintien et le développement de la masse musculaire. De nos jours, un plus grand nombre de

consommateurs nord-américains souhaitent désormais que les aliments qu'ils consomment contiennent une plus grande quantité de protéines (Paddon-Jones et al., 2015). De plus, ces produits peuvent également s'adresser aux enfants et aux personnes âgées dont les besoins en protéines sont plus élevés (Salmieri & Lacroix, 2023). Une multitude de produits protéinés ont répondu à la demande croissante du marché comme les barres, les biscuits, les confiseries, les céréales protéinées et y compris les boissons protéinées. Ces produits proviennent de plusieurs sources protéiques comme le lactosérum, le soja, les œufs. (Harwood & Drake, 2019)

2.4.2 Boissons fonctionnelles

Les aliments fonctionnels ne sont définis que vaguement comme fournissant les nutriments nécessaires, comme les protéines, pour satisfaire la carence alimentaire du corps humain. Alors qu'en réalité, ils dépassent cette limite en ayant plusieurs fonctions comme étant des aliments qui supportent le système immunitaire avec des nutriments spécifiques tels que les fibres et les vitamines. Récemment, une augmentation progressive et remarquable des produits alimentaires saine de nature biologique et respectueuse de la nature s'est démarquée (Morach et al., 2021). Ceci explique la demande croissante des boissons fonctionnelles sur le marché depuis que leur rôle proactif d'amélioration de la santé humaine et de soutien du système immunitaire a été démontré. Ainsi, la demande des boissons protéinées naturelles a suscité un grand intérêt des athlètes à la faveur des apports protéinés synthétiques, ceci afin d'éviter les effets secondaires possibles (Corbo et al., 2014). Les boissons protéinées commerciales contiennent généralement 10 g de protéines par portion de 237 mL, les boissons fonctionnelles contiennent, de plus, des composés bioactifs tels que les lipides et les peptides qui servent comme antioxydant, antibactérien ou immunostimulant (Day et al., 2009) . Ces boissons nutritionnelles peuvent également prévenir les maladies liées à l'alimentation comme le rachitisme lié à une carence en vitamine D, en calcium et en protéines, le kwashiorkor ou le marasme lié à une malnutrition protéino-énergétique (Ndong, 2012; Wadhwa et al., 2014), ou encore servir comme substitut de repas qui sont riches en plusieurs protéines afin de pouvoir fournir un apport complet de nutriments (Corbo et al., 2014; Henry, 2010).

2.4.3 Digestibilité et assimilation des acides aminés des boissons protéinées

La digestibilité s'applique à la fraction des composants alimentaires qui est transformée par la digestion en matière accessible par les processus physico-chimiques qui ont lieu dans le lumen (Carbonell-Capella et al., 2014).

Les taux de digestion et d'absorption des protéines alimentaires peuvent être considérablement augmentés ou diminués par des traitements alimentaires tels que le chauffage, la gélification et l'hydrolyse enzymatique, avec des impacts métaboliques possibles, par exemple sur la synthèse musculaire ou l'homéostasie du glucose (Loveday, 2023).

La transformation des aliments à des températures extrêmement élevées, à un pH alcalin et/ou en présence de sucres réducteurs peut modifier les chaînes latérales des acides aminés, influence la digestion et l'absorption des protéines, ce qui entraîne la perte de biodisponibilité. Certains ingrédients alimentaires riches en protéines sont délibérément agrégés, gélifiés ou hydrolysés au cours de la fabrication. L'hydrolyse améliore la digestibilité des protéines et augmente l'utilisation des nutriments par les organes abdominaux tels que les intestins, l'estomac, le pancréas, le foie et la rate. L'agrégation et la gélification peuvent ralentir ou accélérer la protéolyse dans l'intestin, en fonction de la microstructure de l'agrégat (Loveday, 2023; Morach et al., 2021).

De ce fait, la production d'une boisson enrichie avec des protéines à haute valeur nutritive et hautement digestible présente un défi majeur. En effet, les protéines, avec leur structure complexe et leur sensibilité aux facteurs physico-chimiques, présentent un défi majeur de solubilité. Vu les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques et la tendance des protéines à agréger dans des conditions défavorables, une nanoémulsion est nécessaire pour maintenir une bonne solubilité et homogénéité durant le stockage (Singh, 2016). Ceci, en permettant une structure homogène et une apparence attrayante. Aussi, pour la stabilité des protéines en préservant leur fonctionnalité et leur qualité nutritionnelle au cours de la pasteurisation et de l'entreposage. Le principe de nanoémulsion peut offrir des gouttelettes de taille nanométrique, notamment une plus grande surface spécifique, une meilleure biodisponibilité des composants et une meilleure stabilité. (Dridi et al., 2023)

2.5 Développement de nanoémulsion

2.5.1 Définition de nanoémulsion

La dispersion d'une phase liquide sous forme de minuscules gouttelettes dans un autre liquide non miscible est appelée émulsion. Dans les préparations alimentaires, les émulsions d'huile dans l'eau où généralement la phase huileuse est dispersée dans la phase aqueuse sont les plus fréquentes (Petruț et al., 2016). Par définition ce système est thermodynamiquement instable, il présente deux phases non miscibles qui ont tendance à se séparer au cours du temps en raison

de l'interaction de faible énergie entre les molécules d'huile et d'eau (McClements, 2004). Dynamiquement, des émulsions stables peuvent être produites par l'ajout de tensioactifs tels que des émulsifiants ainsi que des agents épaississants pour contrôler l'interaction énergétique du mélange (Sun et al., 2007). Par ces additifs, la déstabilisation de l'émulsion ne peut qu'être retardée et non totalement entravée. Des polysaccharides sont ajoutés aux émulsions en tant qu'agent épaississant pour modifier le comportement rhéologique de la phase continue afin d'empêcher les mécanismes d'instabilité tels que la coalescence, l'écémage ou la sédimentation, la maturation d'Ostwald (ou disproportion) et la séparation de phase (Mirhosseini et al., 2009 ; Tadros, 2009). Bien qu'un seul de ces phénomènes soit suffisant pour déstabiliser complètement l'émulsion, la plupart du temps, ils se produisent en combinaison, car l'apparition de l'un peut en améliorer ou en favoriser un autre par exemple le crémage de la taille des globules gras lors de la coalescence ou de l'agrégation intensifiera la sédimentation (Vanapalli et al., 2002).

2.5.2 Stabilité des nanoémulsions

La stabilité ou l'instabilité de l'émulsion présente de nombreuses similitudes avec les suspensions. Si la densité de l'huile est supérieure à la densité du fluide, un tassement dû à la gravité peut se produire. Cela peut également se produire avec des émulsions eau-dans-huile si la densité des gouttelettes d'eau est supérieure à la densité de la phase huileuse.

La maturation d'Ostwald peut se produire lorsque la solubilité dans l'huile est importante, ce qui signifie que les petites gouttelettes ont une solubilité plus élevée que les grosses gouttelettes et ont tendance à se dissoudre et à se déposer sur les plus grosses gouttelettes pendant le stockage. Cependant, deux processus instables différents peuvent être distingués dans les systèmes d'émulsion : la coalescence, qui se produit en raison de l'amincissement et même de la destruction du film liquide entre les gouttelettes, conduisant finalement à la connexion de ces gouttelettes et finalement à une certaine séparation de l'huile (Binks, 1998). L'inversion de phase est la séparation et l'échange d'un milieu et d'une phase dispersée. Par exemple, le milieu de dispersion forme des gouttelettes et les gouttelettes dispersées forment une phase continue. Par exemple, une émulsion H/E se transforme en une émulsion E/H et vice versa.

Le comportement rhéologique de l'émulsion est une caractéristique de base de la stabilité des liquides. En fait, ces mesures fournissent des informations sur la charge, la taille et la distribution des gouttelettes. Des changements significatifs dans la rhéologie des propriétés de la phase, dus à l'épuisement ou à la gélification, peuvent être révélateurs d'effets énormes sur la stabilité de l'émulsion (Tadros, 2004).

Les propriétés d'une suspension peuvent être déterminées en comprenant comment les colloïdes individuels interagissent. En fait, l'amplitude relative des forces d'attraction telles que les forces de Van der Waals, l'hydrophobicité ou l'épuisement et les forces de répulsion entre les gouttelettes telles que la floculation électrostatique, stérique ou thermique affectent la stabilité physique, les propriétés optiques et le comportement rhéologique des systèmes d'émulsion. La stabilisation des dispersions de polymères se produit également par deux mécanismes principaux qui dépendent de la combinaison de surface des polymères et des particules (Ingersent et al., 1990). La stabilisation stérique se fait par adsorption des macromolécules à la surface de la particule ; et la stabilisation électrostatique se produit par répulsion mutuelle des doubles couches électriques de deux particules. Cela garantit une stabilité optimale de l'émulsion et empêche les gouttelettes de s'accumuler plus rapidement. En effet, les forces de répulsion entre les gouttelettes d'émulsion évitent la formation d'émulsion grossière qui provoque l'agglomération et la sédimentation (Mirhosseini et al., 2009).

2.5.3 Paramètres d'évaluation de la stabilité d'émulsion

2.5.3.1 Taille des particules

Le diamètre des gouttelettes joue un rôle crucial pour l'obtention d'une bonne stabilité des émulsions. En effet, l'augmentation de taille de particules ou de leur nombre peut être un indicateur d'instabilité physique (Benita, 2019). En outre, l'amélioration de la stabilité des émulsions peut être obtenue en réduisant la taille des gouttelettes. Les émulsions, dont le diamètre des gouttelettes est inférieur à 100 nm, sont appelées microémulsions et présentent souvent une stabilité thermodynamique (Heurtault, 2003; McClements, 2000). Ce qui est recherché dans notre cas pour la stabilité des boissons protéinées.

Les émulsions de boissons sont principalement composées d'agents aromatiques comprenant des acides gras à petite chaîne, solubles dans une phase aqueuse qui n'est pas continue. Par conséquent, ils peuvent pénétrer à travers la phase continue et former de plus grosses gouttelettes, ceci accroît l'instabilité de l'émulsion huile dans eau (Hunter et al., 2008). Généralement, la taille des gouttelettes diminue avec l'augmentation de la concentration des particules (tout en maintenant une teneur fixe en phase dispersée) jusqu'à un certain point après lequel la taille se stabilise (Tavernier et al., 2016). Aussi, le processus de production de nanoémulsion (comme la sonication ou la microfluidisation) est un facteur important dans la réduction de taille des particules.

Pour évaluer la stabilité de ces émulsions à long terme, il est nécessaire de mesurer les changements de la taille des particules au fil du temps (Drelich et al., 2010; Hunter et al., 2008). Une meilleure stabilité peut être observée dans les émulsions contenant des phases dispersées de plus petit diamètre et peut être expliqué par les processus de déstabilisation qui surviennent, tels que la coalescence qui présente le fusionnement de deux ou plusieurs gouttelettes ou bien le mûrissement d'Ostwald qui entraîne une augmentation de la taille des gouttelettes (Capek, 2004).

La spectroscopie de corrélation de photons, également connue sous le nom de diffusion dynamique de lumière DLS, est la technique la plus puissante pour les mesures de routine de la taille des nanoparticules (Verger & Pattus, 1976) et la plupart des études sur les solutions lipidiques utilisent la DLS pour déterminer la taille des particules (Torchilin, 2020). La DLS mesure la fluctuation de l'intensité de lumière diffusée causée par le mouvement des particules. Aussi, la microscopie électronique à transmission (ETM) s'est avérée être un outil puissant pour fournir des informations sur l'absorption des nanoparticules, leur biodistribution et leurs relations avec les autres composants, grâce à sa haute résolution. C'est une technique permettant de fournir des visualisations détaillées de l'intérieur de l'échantillon obtenues par un faisceau d'électrons transmis à travers un échantillon mince (Malatesta, 2021).

2.5.3.2 Charge des particules (Z-potentiel)

La stabilité d'une émulsion est évaluée par l'ampleur relative des forces d'attraction, par exemple la force de Van der Waals et répulsive par exemple les forces électrostatiques, stériques et forces d'hydratation entre les gouttelettes de l'émulsion (McClements, 2015). Les charges de surface jouent un rôle essentiel dans le contrôle des interactions entre les gouttelettes au sein du système (Achouri et al., 2012; Mirhosseini et al., 2008). En effet, les émulsions huile dans l'eau sont généralement stabilisées par la répulsion électrostatique entre les gouttelettes ayant une charge de surface élevée supérieure à ± 30 mV ce qui empêche l'agglomération (Vanapalli et al., 2002). En revanche, la stabilité stérique se produit lorsque la molécule d'émulsifiant adhère à la surface des gouttelettes d'huile, maintenant ainsi leur état stable (Campelo et al., 2017).

Le potentiel ζ - peut être utilisé pour mesurer la mobilité des particules dans un champ électrique, ce qui peut donner une indication de la stabilité potentielle du système colloïdal. Pour ce faire, on utilise des appareils qui intègrent à la fois la diffusion de la lumière et les méthodologies de champ électrostatique pour l'analyse ζ (Shams et al., 2023).

2.5.3.3 Indice de polydispersité

Deux émulsions peuvent avoir la même taille de particules, mais elles n'ont pas la même stabilité, car leurs indices de dispersion des particules sont différents. Le PDI indique l'indice de polydispersité liées à l'homogénéité de la distribution de la taille des gouttelettes d'huile dans une émulsion. Plus cet indice est proche de zéro, plus la distribution est uniforme (Campelo et al., 2017). Un PDI faible est considéré comme acceptable et indique une distribution étroite et une population homogène de gouttelettes d'huile. Un PDI élevé signifie une taille de distribution hétérogène et une variation plus importante d'où un indicateur d'instabilité.

2.5.3.4 Viscosité

Parmi les mesures courantes permettant de caractériser le comportement des fluides dans l'industrie alimentaire, la détermination de la viscosité est couramment utilisée (Mirhosseini et al., 2009). C'est une mesure de la résistance d'un fluide à l'écoulement. Elle décrit le frottement interne d'un fluide en mouvement. Des études ont montré que, les attributs sensoriels tels que la texture ont été liés aux propriétés rhéologiques, telles que la viscosité (Akhtar et al., 2006). L'augmentation de la viscosité des solutions peut toutefois entraîner une réduction de la conductivité, ce qui affecte la stabilité (Campelo et al., 2017). C'est pour cela qu'il faut toujours contrôler ce paramètre en maintenant une concentration adéquate entre la phase dispersante et la phase dispersée de la solution. Une viscosité qui ne dépasse pas 2000 CP est considérée comme acceptable pour ne pas provoquer un colmatage au niveau des tubes de canalisation de la microfluidisation ou bien lors de la pasteurisation.

2.5.4 Méthodes pour améliorer la stabilité des boissons

Les propriétés physico-chimiques et sensorielles des aliments dépendent largement de leurs ingrédients, mais sont aussi fortement liées aux conditions de transformation, de stockage et de transport. Plus précisément, les technologies de transformation peuvent affecter les propriétés fonctionnelles (par exemple, la bioactivité et la bioaccessibilité) des composants alimentaires et, par conséquent, leurs efficacités, qualités nutritionnelles et bienfaits potentiels pour la santé (Joana Gil-Chávez et al., 2013). Suite à la demande croissante d'aliments fonctionnels et nutraceutiques, les chercheurs et les industries alimentaires ont rejoint leurs efforts pour développer des technologies de traitement optimales visant à préserver les caractéristiques

qualitatives et nutritionnelles des produits finaux (Galanakis et al., 2006). Parmi ces traitements on note la sonication et la microfluidisation.

2.5.4.1. Sonication

Les ultrasons sont une technologie non thermique connue pour accélérer le transfert de masse en générant des cavitations dans les matrices alimentaires lorsqu'ils sont appliqués en mode haute intensité ($>10 \text{ W/cm}^2$, 100 kHz) (T. J. Mason & Lorimer, 1988). D'autre part, les ultrasons sont très efficaces contre les pathogènes contaminant les jus de fruits, ils ont permis une réduction de 5 logs (exigences de la Food and Drug Administration américaine) d'*Escherichia coli* dans les jus de goyave et d'orange (Zinoviadou et al., 2015). En effet, les ultrasons peuvent détruire les bactéries avec le processus de sonoporation, qui implique la création de microcavitations et de force de cisaillement résultant des ondes sonores à haute fréquence. Les forces de cisaillement et les jets liquides résultant de la formation et de la rupture des microcavitations peuvent endommager les membranes cellulaires des bactéries. Cela provoque leur rupture et leur perturbation permettant aux substances antibiotiques de pénétrer plus facilement dans les cellules bactériennes et de les tuer (Monsen et al., 2009). Cependant, on sait que la bioaccessibilité *in vitro* du lycopène est réduite pendant le traitement par ultrasons de la pulpe de tomate en raison de la libération de pectine après une désestérification partielle (Anese et al., 2015). La sonication est également appliquée dans l'encapsulation moderne (par exemple, la préparation de nanoémulsions colloïdales multiphasées de 10-100 nm à l'aide d'ultrasons) visant à libérer des nutriments et des composés bioactifs à une taille nanométrique (par rapport aux dispersions roto-stator classiques) qui permet une biodisponibilité, une stabilité physique et une énergie plus élevée, ainsi qu'une libération contrôlée dans les tissus cibles du corps humain (Bouayed, 2012; Moraru et al., 2009).

2.5.4.2. Microfluidisation

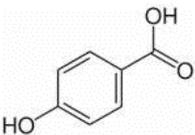
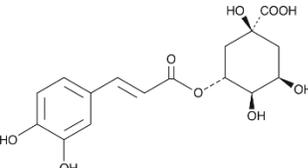
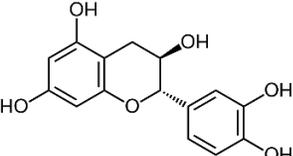
La microfluidisation est une technologie d'homogénéisation à haute pression très particulière : elle est construite de telle manière que le liquide est divisé en deux microflux qui sont projetés l'un contre l'autre dans des microcanaux où ils sont soumis à des forces de cisaillement dans une chambre, appelée chambre de cavitation (Ben-Fadhel et al., 2023). Cette technologie utilise les forces combinées d'un impact à grande vitesse, d'une vibration à haute fréquence, d'une chute de pression instantanée, d'un cisaillement intense, d'une cavitation et d'une pression ultra-élevée pouvant atteindre 200 MPa (Ozturk & Turasan, 2021). Cette homogénéisation à haute pression

est utilisée dans différents processus, y compris la préparation des nanoémulsions hautement stables, l'encapsulation des nanocomposés bioactifs, la réduction microbienne, l'amélioration des fibres alimentaires, etc. Cette technologie est utilisée aussi pour les traitements de jus de fruits (Khan et al., 2014; Lacroix et al., 2005). Karacam et al. (2015), a montré que la microfluidisation à 100 MPa a augmenté le contenu phénolique total, l'activité antioxydante et affecté la couleur positivement du jus d'ananas, ce qui a permis d'obtenir un jus de haute qualité.

2.6 Enrichissement des boissons avec polyphénols et additifs antioxydants

Les fruits et les légumes sont naturellement riches en bioactifs alimentaires sous forme de composés phénoliques (Joana Gil-Chávez et al., 2013). Ces derniers comprennent différentes classes de molécules, y compris les acides phénoliques (comme les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques), les flavonoïdes qui peuvent être subdivisés en plusieurs sous-classes : des flavonols (exemple : quercétine, kaempférol, myricétine), des flavones (exemple : apigénine, lutéoline), des flavonones (exemple : naringénine, hespéridine), des isoflavonoïdes (comme génistéine, daidzéine), des flavonols (comme catéchines, epiccatéchines, gallocaéchines) et aussi les tanins qui peuvent se diviser en des tanins hydrolysables ou tanins condensés (Stagos, 2019; Thériault et al., 2006). Des exemples des principales familles des composés phénoliques sont présentés dans le **tableau 2.3**. Ces composés sont très hétérogènes en ce qui concerne leurs structures, leur distribution dans la nature (par exemple, omniprésents ou présents dans certaines plantes) et leurs caractéristiques (par exemple, lipophiles ou hydrophiles). Ils se diffèrent aussi par leurs sites actifs dans le corps humain, leurs efficacités contre les espèces oxydantes, leurs actions biologiques et leurs concentrations dans les aliments (Carbonell-Capella et al., 2014). Il est donc essentiel de contrôler le degré de désintégration des fruits et des tissus végétaux, car il affecte la fonctionnalité des composants, leurs propriétés et la qualité sensorielles des aliments (couleur, astringence, goût).

Tableau 2.3 Principales familles de composés phénoliques présents dans les fruits

Famille	Exemple	Formule	Fruits sources
Acides hydroxybenzoïques	Acide parahydroxybenzoïque		Fraises
Acides hydroxycinnamiques	Acide cis-5-O-Caféylquinique (acide chlorogénique)		Pruneaux, pommes
Flavonoïdes	(+)- catéchine		Raisin

Extrait de (Mehinagic et al., 2011)

2.6.1 Additifs nutritionnels, améliorant la qualité de boisson

Les boissons fonctionnelles ayant des protéines à haute valeur nutritionnelle ont attiré l'attention des consommateurs grâce à leur apport nutritifs et leur effet positifs sur l'organisme pour promouvoir la santé (Shams et al., 2023). Un additif est une substance ou un mélange de substances, autre qu'une denrée alimentaire de base, qui est présent dans un aliment en raison de nombreux aspects de la production, de la transformation, du stockage ou de l'emballage. Les additifs nutritionnels peuvent être sous forme de vitamines, minérales ou d'autres substances pour des objectifs diététiques particuliers (Bouayed, 2012; Branen et al., 2001). Certaines vitamines sont considérées comme des conservateurs naturels. Ils sont couramment ajoutés aux produits céréaliers pour rétablir les nutriments perdus lors de la transformation ou pour améliorer la valeur nutritive globale de l'aliment. Les minéraux tels que le fer et l'iode se sont également révélés extrêmement utiles pour prévenir les carences nutritionnelles. Les protéines ou les matières protéiques telles que les protéines de soja sont généralement utilisées comme additifs nutritionnels pour les boissons. Cependant, elles sont également utilisées comme agents texturant. Divers dérivés de cellulose, de la pectine et de l'amidon sont utilisés comme additifs fibreux. Les additifs fibreux présentent des avantages nutritionnels indirects, améliorent la texture

des produits alimentaires et sont considérés en tant qu'agents épaississants ou stabilisants (Branen et al., 2001).

2.6.2 Polyphénols et antioxydants

Les composés phénoliques existent naturellement dans les extraits végétaux et des fruits sous forme de substances chimiques considérées comme des métabolites secondaires des plantes. Ils comportent un cycle aromatique et un cycle benzénique avec un ou plusieurs groupes hydroxydes. Ils peuvent être subdivisés en plusieurs groupes: les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques et acides hydroxytrans cinnamiques), les coumarines, les flavonoïdes (flavones, flavonols, isoflavonoïdes, flavanones, et anthocyanines) et les polymères phénoliques (proanthocyanidines et tanins hydrolysables et non hydrolysables) (Craft et al., 2012; Yang et al., 2016). Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques (principalement les flavonoïdes) possèdent des avantages potentiels pour la santé y compris la réduction du risque de cancer et peuvent renforcer l'immunité pour lutter contre certaines maladies infectieuses (Galanakis et al., 2020). En outre, les composés phénoliques, largement répandus dans les plantes, contribuent également aux propriétés sensorielles associées à la qualité des aliments, tels que la couleur et l'arôme (Thériault et al., 2006).

Parmi les propriétés biologiques importantes des polyphénols végétaux, on note leur activité antioxydante. Un certain nombre d'études ont montré que les polyphénols végétaux peuvent être utilisés comme antioxydants et protéger le corps humain contre différentes maladies induites par le stress oxydatif (Stagos, 2019). Les antioxydants sont nécessaires pour s'opposer et prévenir la formation des espèces réactives d'oxygène et de l'azote, qui sont générées *in vivo* et peuvent endommager l'ADN, les lipides, les protéines et d'autres biomolécules (Halliwell, 1996). Plusieurs études ont bien établi que le stress oxydatif joue un rôle important dans la manifestation et les complications du diabète sucré. Ainsi, les composés antioxydants tels que les polyphénols ont été suggérés comme étant utilisés pour la prévention et/ou le traitement de cette maladie qui touche des millions de personnes dans le monde (Burgos-Morón et al., 2019). L'activité antioxydante élevée et également nutraceutique des composés phénoliques des plantes attire l'attention de l'industrie alimentaire, les incitant à remplacer les antioxydants synthétiques par des extraits naturels, jouant un rôle dans la prévention de nombreuses maladies (Thériault et al., 2006).

2.6.3 Autres additifs améliorant les qualités organoleptiques

Une variété de composés dépend de la nature pour conférer de la couleur à l'organisme vivant et pour exécuter diverses fonctions. Dans les aliments crus non transformés, ces composés ou pigments naturels augmentent l'attrait visuel pour les consommateurs, qui associent les colorants alimentaires à la qualité et à la fraîcheur. Ces composés naturels sont largement présents dans les animaux, les plantes et les micro-organismes. En effet, ils se déclinent en différentes nuances de couleur verte, orange, jaune, rose ou rouge.

Bien que ces composés présentent un attrait pour les consommateurs, ils ont également un aspect multifonctionnel pour les organismes vivants. Dans certains cas, les composés participent à des processus métaboliques, par exemple des caroténoïdes ou des réactions de photosynthèses ou biosynthétiques. Dans d'autres cas, ils servent d'antioxydant et préviennent les dommages oxydatifs des biomolécules vulnérables. Par exemple, le fer joue un rôle important dans la fonction de transport de l'hémoglobine HB et de la myoglobine MB pour le transport de l'oxygène et la production d'énergie. Tandis que d'autres, comme les bêta-carotènes, catéchine et vitamine E ou C, remplissent une fonction de protection contre les effets nocifs des radiations UV et de la lumière du soleil. Il n'est donc pas surprenant que l'intérêt pour les composés naturels s'étende au-delà de leur attrait visuel et que les consommateurs souhaitent également englober d'autres caractéristiques que les avantages qu'ils procurent pour la santé et le bien-être des humains. (Simpson & Nollet, 2012)

2.7 Stabilité microbiologique de la boisson

2.7.1 Agents pathogènes des boissons

Les maladies d'origine alimentaire englobent deux catégories distinctes : les infections d'origine alimentaire et les intoxications alimentaires. Les infections d'origine alimentaire surviennent lorsqu'un agent pathogène est consommé par le biais d'un aliment et s'installe dans l'hôte humain. Inversement, l'intoxication d'origine alimentaire se produit lorsque des agents pathogènes toxigènes s'installent dans un produit consommable et produisent des toxines qui sont ensuite ingérées par l'homme (Bintsis, 2017).

Les opérations de manipulation et de transformation alimentaire ont tendance à exposer les aliments prêts à consommer à la contamination par des micro-organismes pathogènes tels que *Escherichia coli*, *Listeria Monocytogenes* et *Salmonella Typhimurium*, qui sont à l'origine de

maladies alimentaires pouvant provoquer des pathologies graves (Tawema et al., 2014). De plus, certains types de levures peuvent contaminer les boissons et dégrader les sucres présents, produisant ainsi de l'alcool et du dioxyde de carbone. Ce qui peut entraîner la fermentation non désirée des boissons. Aussi des bactéries acétiques telles qu'*Acétobacter* et les bactéries lactiques telles que *Lactobacillus* peuvent contaminer les boissons en produisant la fermentation, qui peut altérer la texture et le goût de la boisson (Stratford, 2006).

2.7.2 Agents antimicrobiens naturels

Les consommateurs sont de plus en plus critiques à l'égard l'utilisation de produits chimiques pour la conservation des aliments. Pour remédier à cette situation, on observe actuellement un intérêt croissant pour les techniques de conservation non conventionnelles et non chimiques afin d'inactiver les micro-organismes pathogènes dans les aliments (Tiwari et al., 2009). La biopréservation permet de prolonger la durée de conservation et d'améliorer la sécurité des produits alimentaires en utilisant des microflore naturelles. À l'origine, les épices et les herbes étaient ajoutées pour modifier ou améliorer le goût des aliments. Certaines de ces substances contiennent également des composés antibactériens connus pour contribuer à l'autodéfense des plantes contre les organismes infectieux. En outre, de nombreuses huiles essentielles (HE) de plantes ont des propriétés antimicrobiennes (Oussalah et al., 2004; Severino et al., 2014a). En général, les bactéries Gram positifs sont plus sensibles aux HE que les bactéries Gram négatifs (Severino et al., 2014b). Cette différence est attribuée à la membrane externe des bactéries Gram-négatives, qui est moins perméable aux composés hydrophobes des HE. Malgré le grand potentiel des HE de plantes en tant qu'antimicrobiens naturels, leur utilisation dans la conservation des aliments reste limitée. Principalement en raison de leur arôme persistant, ces huiles peuvent affecter les propriétés organoleptiques des aliments (Sánchez-González et al., 2011). Par ailleurs, certains composés antimicrobiens présents dans la nature peuvent prolonger la durée de conservation des aliments transformés en réduisant le taux de croissance microbienne ou la viabilité comme la lactopéroxydase (lait), le lysozyme (blanc d'œuf), les saponines et les flavonoïdes (herbes et épices), les bactériocines (bactéries lactiques) et la cytosine (carapaces de crevettes) (Rico et al., 2007). Ces composés servent en plus comme antioxydants, anti-inflammatoires, anticancéreux et ils sont riches en nutriments, fibres et vitamines. Il n'est donc pas surprenant que l'intérêt pour les composés naturels s'étende au-delà de leur pouvoir antimicrobien et que les consommateurs souhaitent également englober d'autres

caractéristiques tels que les avantages qu'ils procurent pour la santé et le bien-être des humains (Simpson & Nollet, 2012).

2.7.3 Durée de vie des produits

Il n'existe pas de garantie absolue de l'absence de tous les pathogènes par les méthodes et technologies de transformation actuelles. Toutefois, une réduction d'un ou de plusieurs facteurs de croissance bactérienne aura un effet substantiel sur la réduction des risques de maladies d'origine alimentaire (Rahman, 2007). L'une des méthodes les plus efficaces pour conserver la stabilité microbiologique des aliments est la pasteurisation. C'est un traitement thermique largement appliqué dans l'industrie alimentaire à des fins de sécurité alimentaire en inactivant les bactéries pathogènes, en réduisant le niveau de la flore totale renfermant par exemple les levures et les moisissures et certaines bactéries comme *Pseudomonas Aeruginosa*, *Lactobasillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*... qui fermentent et réduisent la durée de conservation des aliments. Ce processus consiste à chauffer la solution à une haute température pour une courte durée de temps (HTST) (exemple : 61°C en 3 minutes, 72°C en 15 secondes allant jusqu'à 83°C en 15 secondes) afin de préserver la valeur nutritive, les propriétés sensorielles et la digestibilité de certaines protéines. De même, de nombreux changements préjudiciables survenant au cours du stockage des aliments sont accélérés par différentes enzymes (notamment la pectine méthylestérase, les polyphénols oxydases et la peroxydase) qui sont également inactivées par les stress thermiques (Bintsis, 2017). Cependant, lorsque la température dépasse une valeur critique, les protéines commencent à être dénaturées et tous les groupes réactifs situés à l'intérieur de la protéine comme les groupes hydrophobes ou sulfhydryles commencent à être exposés aussi. Lors de leur exposition, ces groupes favorisent l'interaction protéine-protéine, ceci permettra de promouvoir la floculation et la coalescence des gouttelettes (Allahdad et al., 2023).

Il existe aussi d'autres techniques émergentes qui ont démontré une efficacité pour la prolongation de durée de vie dans le procédé de transformation alimentaire tel que la sonication, le blanchiment, l'électrification, traitement magnétique ou par lumière, l'irradiation et le HPP (pasteurisation à froid avec haute pression) ... Ils permettent d'augmenter la valeur nutritive et la digestibilité de certaines protéines (Davies & Jakeman, 2020; Manus et al., 2021). Ces traitements permettent en outre une préhydrolyse des protéines, et donc une meilleure assimilation s'accompagnant parfois d'une amélioration des propriétés sensorielles et physico-chimiques du produit (Allahdad et al., 2022; Botella-Martínez et al., 2022).

2.8 Valeur nutritionnelle

L'évaluation de la valeur nutritionnelle des aliments est une étape indispensable des analyses théoriques et pratiques des produits finaux dans le domaine alimentaire. C'est le moyen qui permet de présenter un aliment pour le consommateur et lui permet de prendre sa décision consciemment (Florence et al., 2014). Plus le consommateur est défini, plus il est facile de cibler un produit qui correspond à ses préférences. La valeur nutritionnelle peut être calculée sur la base des recettes des aliments à l'aide d'un logiciel qui contient déjà une base de données des valeurs nutritives de tous les composants de la recette. Les valeurs obtenues peuvent être la base des allégations de santé marquée sur l'emballage, ce qui présente un facteur important pour la commercialisation (Hammerby, 2015).

Les informations nutritionnelles sont généralement affichées sous forme de tableau sur les emballages alimentaires et dans les bases de données nutritionnelles. Ce tableau détaille les différents nutriments présents dans un aliment particulier, notamment les protéines, les glucides, les graisses, les vitamines et les minéraux. Les valeurs peuvent être exprimées en grammes, milligrammes ou microgrammes, selon le nutriment, et sont généralement accompagnées d'un pourcentage de valeur quotidienne (% DV) basé sur un régime de référence de 2 000 calories (Fichier canadien sur les Éléments nutritifs FCÉN).

3 PROBLÉMATIQUE, BUT, HYPOTHÈSE, OBJECTIF, ET MÉTHODOLOGIE

3.1 Problématique

Les protéines sont des nutriments indispensables pour un système alimentaire équilibré et sont particulièrement cruciales pour être en bonne santé jusqu'au vieillissement (Morley et al., 2010; Paddon-Jones et al., 2015). En effet, un apport adéquat de protéines est essentiel pour maintenir le bon fonctionnement corporel à travers la synthèse et la préservation de la masse musculaire et squelettique. Par conséquent, l'amélioration de la qualité et de la fréquence de la consommation de protéines de haute qualité peut s'avérer bénéfique pour ceux qui souhaitent avoir un bon fonctionnement physiologique de leur organisme au fil du temps. Plus spécifiquement, ceux ayant un besoin plus que la normale à combler comme les personnes âgées ou les athlètes. La production et le développement des boissons fonctionnelles à base de protéines sont l'un des défis des industries alimentaires pour améliorer la santé humaine. Les études antérieures sur les boissons protéinées sont toujours associées aux protéines à base de soja. Bien que la protéine de soja ait un profil nutritionnel équilibré par rapport aux autres sources végétales, sa teneur est limitée en quelques acides aminés comme la méthionine et la cystéine. En outre, le soja est aussi dépourvu de vitamines B₁₂ et D, avec un faible taux d'efficacité protéique 1,97 contre 3,8 pour les œufs. Une alternative aux boissons à base de soja est nécessaire pour fournir une alimentation équilibrée et de l'énergie nécessaire aux personnes âgées, aux enfants et aux athlètes. Le développement de ce type de breuvage nécessite généralement des émulsions huile-dans-eau afin de garder une solution homogène, stable qui peut maintenir l'efficacité des composés actifs. Ceci constitue la base de nombreuses émulsions de boissons commerciales. Cependant, ces émulsions sont des systèmes naturellement et thermodynamiquement instables qui ont tendance à se séparer, au cours du temps, en deux liquides non miscibles. Plusieurs phénomènes d'instabilités peuvent survenir, y compris le crémage, la floculation, la coalescence et la maturation d'Ostwald. En outre, les problèmes les plus importants dans les boissons protéinées prêtes à boire sont la croissance microbienne due au niveau élevé d'eau, le pH presque neutre et sa propriété nutritionnelle. Ces boissons sont généralement développées à base de saveurs commerciales. L'incorporation des extraits de fruits naturels et ingrédients biologiques ayant des fonctions nutritionnelles a toujours incité la curiosité scientifique (Galanakis, 2021). Finalement, la fortification des breuvages en protéines peut être limitée en termes de stabilité lors des traitements thermo-physiques et leur structure protéique risque d'être dénaturée et de perdre sa fonction. Plusieurs défis restent à relever pour garantir

que les ingrédients fonctionnels demeurent "actifs" et "biodisponibles" après la transformation et le stockage des aliments.

3.2 But

ce projet vise à développer une boisson fonctionnelle enrichie avec des protéines d'œufs, mais aussi en ingrédients fonctionnels tels que les polyphénols pour couvrir les besoins protéiques et fonctionnels nécessaires aux athlètes, personnes âgées et toute autre population ayant un déficit d'apport protéique et ayant intérêt à maintenir une bonne santé. Cette boisson sera développée avec des saveurs fruitées et des édulcorants locaux permettant une durée de vie optimale sans recours aux additifs chimiques. Ce breuvage doit offrir une forte valeur nutritive, une haute propriété digestive et une bonne stabilité après les traitements et tout au long de sa conservation.

3.3 Hypothèses

- Les différents types de poudre d'œuf ont un effet sur la stabilité et la viscosité des formulations
- Les concentrations de poudre d'œuf, de polysaccharide, d'huile et de pH a un effet significatif sur les paramètres de stabilité de l'émulsion
- Les extraits de fruits et de légumes ont une forte teneur en polyphénols et une activité antioxydante importante qui va enrichir la valeur nutritive de la boisson
- Grâce à la mise au point de nanoémulsion et d'entrappement de la phosvitine dans des polymères, celle-ci reste stable dans le breuvage même avec les traitements de pasteurisation, sonication et microfluidisation.

3.4 Objectifs

1. Formuler une boisson fonctionnelle enrichie avec 3 types de protéines d'œuf (blanc, jaune et œuf entier) à base d'œuf frais entier, d'huile végétale et d'eau.
2. Développer une nanoémulsion qui permet des conditions d'homogénéisation optimales.
3. Optimiser les conditions de stabilité de boisson (taille des particules, potentiel zêta, indice de polydispersité et viscosité) après pasteurisation et durant l'entreposage.
4. Extraire et évaluer la stabilité de phosvitine dans la boisson après les traitements de pasteurisation, sonication et microfluidisation

5. Évaluer la teneur en polyphénols et l'activité antiradicalaire des extraits utilisés et déterminer leur teneur dans les formulations développées
6. Évaluer l'activité antibactérienne de certains extraits naturels potentiels pour la stabilité microbiologique des boissons.
7. Évaluer les propriétés physico-chimiques et sensorielles des différentes formulations développées
8. Déterminer la durée de vie du breuvage lors d'une conservation à 4°C
9. Estimer la valeur nutritionnelle du produit final

3.5 Moyen pour atteindre les objectifs

1. **Formuler une boisson riche en protéines** : Une boisson sera formulée à base des protéines de la poudre d'œufs (blanc, jaune et œuf entier) (60-80%), de l'œuf frais (13 à 15%), des lipides (15 à 35%), polysaccharides (5-10%), un édulcorant naturel (2,9 à 3,9%), des extraits de fruit aux propriétés nutraceutiques (1-10%), arôme (0,05% v/v) et un stabilisant (0,2-0,6%) à la base de méthode de (Chevalier, 2018; Shams et al., 2023).
2. **Développement de nanoémulsion** : Le fractionnement d'émulsion grossière sera effectué par sonication. Ensuite, la boisson sera homogénéisée suivant la méthode de (Hosseini et al., 2015). En bref, l'homogénéisation d'émulsion sera acheminée à l'aide du disperseur Ultra-Turrax T25 pour obtenir une solution colloïdale. Les conditions d'homogénéisation par microfluidisation (la pression et nombre de passage) seront optimisées en fonction de la stabilité.
3. **Optimisation de la stabilité de l'émulsion** : La stabilité des microdispersions sera déterminée par l'indice de distribution granulométrique (PDI), la taille moyenne des particules et le potentiel ζ (charge des particules). Les paramètres de stabilité de toutes les formulations seront analysés à 25 °C par diffusion dynamique de lumière (DLS) à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)(Bagheri et al., 2020). La microscopie électronique à transmission (TEM) permet d'évaluer la taille, structure et conformation des particules dans l'émulsion (Allahdad et al., 2023).
4. **Évaluer l'activité bactérienne de certaines émulsions naturelles**: L'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles sera évaluée suivant la méthode de Begum et al. (2022). Des émulsions des huiles essentielles naturelles efficaces contre les pathogènes nocifs pour les boissons protéiques seront préparées, suivies par des

analyses sensorielles lors de leur introduction dans les boissons. Les extraits de fruits ajoutés seront aussi analysés pour évaluer leur activité antibactérienne potentielle.

5. **Évaluer la teneur en polyphénols et l'activité antiradicalaire** : L'activité antioxydante et la teneur en polyphénols des extraits ajoutés seront évaluées selon la méthode de Caillet et al. (2006). La détermination de la teneur en polyphénol total de chaque composé sera déterminée avec la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965a), alors que la détermination de l'activité antiradicalaire sera mesurée en fonction de la présence des radicaux libres oxygénés et leur sous-produit générés par l'électrolyse d'une solution saline selon (Tien et al., 2001).
6. **Évaluer la teneur en phosvitine et sa stabilité après les traitements** : La teneur en phosvitine sera déterminée selon la méthode de (Ko et al., 2011) la phosvitine sera extraite du jaune d'œuf puis de la formulation avant et après les traitements (sonication, microfluidisation et pasteurisation). La protéine extraite sera ensuite analysée par gel d'électrophorèse selon le protocole de Guilmineau et al. (2005) pour déterminer sa stabilité après le processus de transformation.
7. **Évaluation des propriétés sensorielles et physico-chimiques** : La viscosité (en cP) et le pH des boissons développées seront mesurées durant la préparation et à l'état final à température ambiante à l'aide d'un viscosimètre Brookfield LVDV-II+. Les propriétés sensorielles des produits finaux : l'aspect général, la texture, l'arôme, le goût et la saveur de tous les échantillons seront évalués selon la méthode de (Tawema et al., 2014) par un test sur une échelle hédonique en 9 points avec 30 panélistes.
8. **Évaluation de la durée de vie des boissons** : Pour l'étude des propriétés antimicrobiennes et la durée de conservation des breuvages à 4°C la méthode de (Begum et al., 2022) sera suivie avec modifications. Des prélèvements des formulations seront analysés pendant 50 jours, les mesures seront prises les jours 1, 3, 6, 9, 14, 16, 30 et 50 pour suivre la croissance bactérienne y compris les comptes totaux, levures et moisissures. Des tests supplémentaires seront ajoutés desqu' une augmentation de la croissance bactérienne est enregistrée.
9. **Estimer la valeur nutritionnelle** : La valeur nutritionnelle des breuvages sera analysée avec le logiciel Genesis (par ESHA, recherche) et dépendant du contenu de chaque formulation, le logiciel fournira la teneur énergétique (kilocalories), teneur en protéines, en cholestérol, en lipides, en sodium et en fluorure (Rosa et al., 2010).

4 ARTICLE:

Développement d'une boisson fonctionnelle à haute teneur en protéines à base d'œuf.

Partie A : optimisation par la méthodologie de réponse de surface et effet de la microfluidisation sur la stabilité de la boisson.

Auteurs :

Aymen Ben Abdeljalil; Lily Jaiswal, Stéphane Salmieri, Monique Lacroix

Soumis le 29/05/2024 au journal Food Hydrocolloids; facteur d'impact (10.7)

Contribution des auteurs :

A. Ben Abdeljalil a conçu le plan des expériences, réalisé les expériences, organisé la base de données, effectué l'analyse statistique et rédigé la première version du manuscrit. M. Lacroix est l'auteur de correspondance et la coordinatrice du projet. Elle a planifié les expériences de recherche. L. Jaiswal, S. Salmieri et M. Lacroix ont contribué à la révision du manuscrit.

Résumé

Le présent travail illustre l'optimisation de trois boissons protéinées stables à base de protéines d'œufs entiers (EPBB-1), des blancs d'œufs (EPBB-2) et des jaunes d'œufs (EPBB-3). À l'aide d'un plan composite central (CCD) à 4 facteurs, toutes les formulations d'EPBB ont été optimisées en faisant varier les concentrations de protéines, d'hydrocolloïdes adsorbants (AH), d'huile et de pH en utilisant la sonication, puis en les comparant avec la microfluidisation. Les boissons ont été optimisées avec une teneur protéique de 6,8 g à 8,0 g, d'AH de 11,6 g à 13,7 g, de l'huile de 6,9 à 10,5 ml et des pH de 5,7 à 6,4. Les réponses de stabilité des boissons optimisées à l'aide de la méthodologie de la surface de réponse (RSM) ont montré une moyenne Z de 676, 1196, 604 nm, un indice de polydispersité (PDI) de 0,44, 0,76, 0,47, un potentiel zêta de -33, -41, -31 mV, et une viscosité de 1520, 648, 1504 cP respectivement. Ces résultats ont été corroborés par la microscopie électronique à transmission (ETM), démontrant une dispersion plus homogène dans les échantillons traités par microfluidisation par rapport à la sonication, avec une taille moyenne des particules d'environ 50 nm et 45 nm pour l'EPBB-1 et l'EPBB-3 respectivement. Bien que l'EPBB-2 ait un PDI plus élevé de 0,76 et une taille de particule plus grande de 84 nm (confirmée par analyse TEM), elle a montré un potentiel zêta de -41 mV indiquant de bonnes caractéristiques de stabilité. L'aspect visuel homogène obtenu après 30 jours de stockage à 4°C confirme la plus grande stabilité des échantillons traités par microfluidisation. Les EPBB stables et ayant une forte teneur protéique allant de 12,3 g à 13,5 g, pourraient être exploités pour développer des boissons commerciales et fonctionnelles pour les personnes âgées, les athlètes et les enfants.

Mots clés : boisson protéinées, œuf, optimisation, émulsion, stabilité, microfluidisation

Abstract

The present work illustrates the development of three stable egg-protein-based emulsion beverages incorporating whole egg (EPBB-1), egg whites (EPBB-2), and egg yolk (EPBB-3). Using a 4-factorial central composite design (CCD), all EPBBs formulations were optimized through varying concentrations of proteins, adsorbing hydrocolloids (AH), oil, and pH (4 independent variables) under sonication, followed by a comparison with microfluidization. The beverages were optimized with proteins ranging in 6.8-8.0 g, AH in 11.6-13.7 g, oil in 6.9-10.5 mL, and pH values from 5.7 to 6.4. The stability responses (dependent variables) of optimized beverages using response surface methodology (RSM) exhibited a Z-average of 676, 1196, 604 nm, a polydispersity index (PDI) of 0.44, 0.76, 0.47, a zeta potential of -33, -41, -31 mV, and a viscosity of 1520, 648, 1504 cP respectively. These results were further corroborated with transmission electron microscopy (TEM), demonstrating a more homogenous dispersion in samples treated with microfluidization compared to sonication, with an average particle size of approximately 50 nm and 45 nm for EPBB-1 and EPBB-3 respectively. Although EPBB-2 had a higher PDI of 0.76 and a larger particle size of 84 nm (confirmed by TEM analysis), it showed a zeta potential of -41 mV indicating good stability features. The homogenous visual appearance obtained after 30 days of storage in 4°C confirm the higher stability of samples treated with microfluidization. The highly stable protein-enriched EPBBs ranging from 12.3 g to 13.5 g proteins could be exploited to develop commercial, functional beverages for the elderly, athletes and children.

Keywords: egg protein beverage, optimization, emulsion, stability, microfluidization

1. Introduction

Proteins, a combination of 20 different amino acids linked by peptide bonds, are nutrient-rich essential macromolecules that perform a vast array of functions in the human body including muscle growth, enzyme synthesis, and hormone production; hence, they should be consumed for a healthy diet. These macromolecules play a significant role in maintaining the human body (Doublier, Garnier, Renard & Sanchez, 2000). Eggs are not only considered one of the best sources of protein (Pathania, Parmar & Tiwari, 2019) but also, contain lipids, different vitamins, and minerals such as vitamin A, vitamin D, vitamin B6, riboflavin, choline, selenium, manganese. Typically, per 100 g, egg white has 15.9 g of proteins preceded by whole raw egg (12.5 g) and egg yolk (10.9 g) (Réhault-Godbert, Guyot & Nys, 2019). In addition to its beneficial nutritional value, the egg has several functional attributes such as antibacterial, antioxidant, anticancer, antihypertensive, emulsifier, immunomodulatory, anti-inflammatory, protease inhibitory, vitamin binding properties and a high biological value, substantially needed for the human diet (Abeyrathne et al., 2013; Réhault-Godbert et al., 2019). Multiple studies have proved that regular egg consumption per day has been linked to promoting bone health (DiMarco, Norris, Millar, Blesso, & Fernandez, 2017; Park, Jung, Choi & Lee, 2018). Furthermore, egg proteins are characterized by having high digestibility and biological value compared to soy and whey proteins (Childs, Thompson, Lillard, Berry & Drake, 2008). It has been reported that among all proteins, egg witnessed the highest Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) with 118 %, compared to fish and meat with 92 to 94%, soy (90-93%) and cereal grains with 35 to 37 % (Tome, 2012).

Milk proteins are biologically highly nutritious fluids and offer ample sustenance and immunity, especially to infants, but some newborns, adults, and even elderly people are allergic to milk because it contains potential allergens. Cow's milk allergy is mainly caused by various components of milk such as casein and whey proteins, including α S1-casein, α S2-casein, α -lactalbumin, κ -casein, and β -casein, as well as bovine serum albumin, immunoglobulins, and lactoferrin contain therein (Jaiswal & Worku, 2022). The allergen in milk is a limiting factor potentially aiming for its mass consumption usage as protein-based beverages. On the other hand, soy protein contains a balanced nutritional profile. Despite being extensively used for the development of many protein-based beverages, it has inadequate amino acid content, hypo-palatability, negligible vitamins D and B12 content, and a low protein efficiency ratio of 1.97 as compared to 3.80 for eggs (Childs et al., 2008; Russell, Drake & Gerard, 2006). Considering the above-mentioned flaws, high protein-enriched eggs could be an apt candidate with a great

potential market in commercial protein-based beverages. With the global accretion in obesity and unhealthy lifestyles, keen interest is mounting in demand for functional beverages containing natural health-promoting nutrients over chemically preserved artificial components. New evidence suggests that current dietary recommendations for protein intake may need to be revised especially for the elderly and young children for long-term health pursuits as they are vulnerable to low protein intake resulting in malnutrition, growth retardation and allied comorbidities (Wu, 2016). Protein-based beverages pursuing general health and well-being are burgeoning as the swiftly expanding industry as protein contributes substantially 30% of total constituents to the beverage industry (Leveille, 2020). In this connection, individuals might benefit by increasing their protein intake frequency and consuming high-quality nutrients through these beverages. Therefore, high-protein beverages have been gaining popularity among health-conscious consumers (elderly, athletes, children) to increase their dietary protein intake (Corbo Bevilacqua, Petrucci, Casanova & Sinigaglia, 2014).

Beverage emulsions are thermodynamically unstable systems due to the positive free energy that increases the surface area between the oil and water phases and the density difference between these two phases. Over time, they tend to separate into two layers through various mechanisms, including creaming, flocculation, coalescence, and Ostwald ripening (Mirhosseini, Tan, Taherian & Boo, 2009). Emulsion instability can be addressed reasonably by mixing emulsifiers/and thickeners before homogenization to form metastable emulsions (Sun, Gunasekaran & Richards, 2007).

Adsorbing hydrocolloids (AH) such as polygalactose derivatives possess an excellent emulsifying property. AH has well-defined surface-active attributes that get adsorbed at the interface between oil and water, and promotes the generation of tiny droplets by reducing the interfacial tension during homogenization (Buffo, Reineccius & Oehlert, 2001; Shams, Allahdad, Jaiswal, Salmieri & Lacroix, 2023).

Vegetable oils are another critical structural component in emulsion systems. They are generally added to the beverage emulsion formulation to obtain desirable optical and rheological properties in emulsion-based commercial products (Mirhosseini, Tan, Hamid & Yusof, 2008). However, these components are not effective if they are not added properly with an adequate homogenization mechanism.

Microfluidization presents an efficient approach for making a stable nanoemulsion under high-pressure homogenization (Khan et al., 2014). Its ultra-high pressure, cavitation, and strong shear rate that have the potential to generate a homogenous and highly stable fluid solution even with

non-polar and hydrophobic sample components. Microfluidization is well recognized for its fine impact on particle size reduction specially for being highly effective in forming emulsion-based systems. Hence, it has been widely used in many applications including nanoparticle synthesis and beverage treatment (Ozturk & Turasan, 2021).

Despite the increasing trend in developing functional beverages with proteins, a handful of commercialized functional beverages on the market are made of egg proteins. Therefore, this study aimed to optimize three high protein beverage emulsions based on three different egg powders (whole egg, yolk, and white), an adsorbing hydrocolloid (AH), vegetable oil, and fresh whole egg via a central composite design (CCD). Response Surface Methodology (RSM) models were used to determine optimized, stable beverage emulsions through microfluidization, and physicochemical analyses were used to evaluate the emulsion stability parameters such as particle morphology by dynamic light scattering (DLS) analysis (charge, size and dispersity), particle structural analysis by transmission electron microscopy (TEM) and absolute viscosity. The egg-protein-enriched optimized beverage emulsion may lead to a natural functional drink that meets the market demand and customers' health pursuits.

2. Materials and Methods

Adsorbing hydrocolloids (AH), a polygalactose derivative, was procured from MP Biomedical (Solon, OH, USA). Vegetable oil was purchased from a local market. Citric acid was obtained from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). The Federation of Egg Producers of Quebec (FPOQ) supplied fresh hens' eggs. The whole egg, egg yolk, and egg white powders were provided from Burnbrae Farms Ltd (Upton, QC, Canada).

2.1. Preparation of oil-in-water (o/w) emulsions

The ingredients quantification was based on the Central Composite Design (CCD) runs suggested by Design-Expert® Software version 11.1.2.0 (Minneapolis, MN, USA). Egg powders including whole egg, egg yolk and egg white, ranging from 0 to 10g, were dissolved slowly in distilled water while stirring followed by the gradual addition of AH (from 0, 7.5 to 15 g). A whole fresh egg was homogenized before adding to the mixture and stirred well. Later, the pH was adjusted (from 3 to 7) with 0.5 M citric acid and 1 M sodium hydroxide. Oil ranging from 3 to 10.5 mL was added dropwise to the mixture using a 10 mL pipette. The final volume of the mixture was adjusted to 150 mL with water followed by pre-emulsion homogenization using a high sheer laboratory homogenizer at 7,000 rpm for 3 minutes Ultra-Turrax T25 disperser (IKA Works Inc., Wilmington,

NC, USA). Using a 12 mm probe, the colloidal suspension was subjected to sonication with a QSonica Q500 sonicator (Newton, CT, USA) at room temperature under 40 kHz and 70 % of full power for 10 min (5 s ON and 5 s OFF). The microemulsion suspension was cooled down during ultrasonication treatment using an ice bath and mixed each 5 minutes during the process to obtain a homogenous mixture. Finally, the microemulsions were heated in a marine bath at 61°C for 3 min and then cooled down immediately. All EPBBs were prepared following the same protocol.

2.2. Viscosity

The viscosity of all EPBBs was measured using a Brookfield LVDV-II + programmable viscometer (Brookfield Engineering, Middleboro, MA, USA). All analyses were performed with a sample size of 16 mL by using a UL Adapter equipped with a YULA-15 spindle (entry code: 00). EPBBs samples were analyzed at a scale range of 100, 50, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 rpm. Viscosity measurements were taken under laminar flow conditions within a satisfying range from 10 to 100% of torque. The measured absolute viscosity was expressed in centipoises (cP). All the measurements were performed in triplicates (n = 3).

2.3. Particle Size, Polydispersity Index (PDI) and Zeta Potential

The particle size, PDI, and zeta potential of microemulsions were identified using the dynamic light scattering (DLS) technique employing a Zetasizer Nano ZS model ZEN3600 from Malvern Panalytical Ltd (St. Laurent, QC, Canada). EPBBs microemulsion samples were diluted to an appropriate concentration of (1:40) with deionized water to avoid multiple scattering effects. The software used to recuperate the data was DTS (version 6.12). Size distribution was characterized by the volumetric percentage and mean particle size of the emulsion droplets obtained by surface-weighted mean diameter according to **Equation 1**:

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (1)$$

Where n_i is the number of droplets with a diameter d_i (Tangsuphoom & Coupland, 2009). The samples were put into a standard capillary electrophoresis cell with gold electrodes to measure the zeta potential. All measurements were carried out at room temperature (25°C) with a medium viscosity of 1.33 cP, a laser wavelength of 659.0 nm, and a medium refractive index of 1.33. These parameters were also measured during the time in day1, 3, 5, 9, 15, 21, 26 until day 30 to check the emulsions stability during the time. All samples were vortexed before analysis, and each sample was measured in triplicate (n = 3).

2.4. Microfluidization

A high-pressure homogenization approach using microfluidization was adopted to form a highly stable nanoemulsion. The EPBBs microemulsions were added to the microfluidizer's inflow reservoir M-110P (Microfluidics Inc., Newton, MA, USA). An electric-hydraulic drive operates a pump with a 5,000–30,000 psi operational pressure range (34–207 MPa). The pump applies consistent pressure to the suspension as it travels to the machine's interaction chamber. The microfluidizer's interaction chamber is Y-shaped and has microchannels that separate the suspensions and collide quickly from different directions, causing a powerful shearing motion. In addition, an external coiling is passed through by the microfluidized suspension. The cooling chamber was covered with ice to prevent the suspensions from overheating. The microfluidized EPBBs nanoemulsions were gathered from the outlet reservoir or recirculated through the system again for more cycling (Khan et al., 2014). The suspensions were operated under an adjusted pressure of 10,000 psi and 3 cycles when samples were collected between each cycle.

2.5. Experimental Design and Data Analysis

The experimental design was conducted using Design Expert software version 11.1.2.0 (Minneapolis, MN) to optimize the stability of all EPBBs. A face-centred ($\alpha = 1$) central composite design with one central point was applied to determine the influence of 4 independent variables namely protein, AH, and oil concentration, as well as the pH on the stability parameters of EPBBs whereas droplet size, PDI, zeta potential and viscosity were considered as the dependent responses. Statistically nonsignificant factors ($P > 0.05$) were removed from the initial models, and the experimental data were refitted with only significant ($P \leq 0.05$) factors to produce the final optimized models. In addition, the fitting quality of models was expressed by the correlation coefficients (R^2) and adjusted R^2 .

For the graphical analysis of the independent variables' interactions, 3D surface plots have been displayed by applying recommended regression models by the software (Quanhong & Caili, 2005). Thus, these plots were depicted from the fitted equations to explain the interactive effects of the independent variables against the response variables. Based on specific registered conditions, 25 experimental runs were processed after modifying and deleting inconsistent repetitions during optimization purposes for EPBB-1 (**Supplementary data, Table 1**). A number of 30 experimental runs were designed for EPBB-2 (**Supplementary data, Table 2**) and EPBB-3 (**Supplementary data, Table 3**). All the experimental runs presented in **supplementary data** were prepared for a final EPBB volume of 150 mL.

2.6. Transmission Electron Microscopy analysis

Transmission electron microscopy (TEM) analysis of EPBBs was carried out after microfluidization and pasteurization treatments. Briefly, 0.1 g of samples were added to 500 μL DMEM and vortexed well. The mixture was dried using absorbing paper after adding 10 μL EPBBs to the TEM grid. The micrographs were collected using a Hitachi H-7100 transmission electron microscope equipped with an electronic AMT camera (AMTXR111) (Rexdale, ON, Canada). The samples were operated under an accelerating voltage of 75 kV.

2.7. Statistical analysis

Data were presented as mean \pm standard error for all triplicates ($n = 3$). Using Design Expert® software, all findings were compared using an analysis of variance (ANOVA). The differences between means were considered significant if the confidence interval was less than or equal to 5% ($P \leq 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of emulsions

An RSM analysis was used to optimize the effect of independent variables (emulsification variable levels) on EPBBs stability. The obtained results of each independent variables on Z-average, PDI, Zeta-potential and viscosity, for each of EPBB-1, EPBB-2 and EPBB-3 were reported in **Supplementary data, tables 4-6** respectively.

ANOVA for the quadratic regression model is presented in **Supplementary data, Table 7** for EPBB-1, **Table 8** for EPBB-2, and **Table 9** for EPBB-3. The lack of fit P-values for all the parameters (Z-average, PDI, Zeta-potential, viscosity) were not significant ($P > 0.05$) indicating the adequacy of the model for predicting these responses in all EPBBs. According to Bei et al. (2009), a non-significant lack of fit value indicates the accuracy of the model, in fact, a significant lack of fit value could indicate that the model is not adequate and doesn't consider other factors in association with response variables and the regressor. In addition, statistical parameters like R^2 and $\text{Adj-}R^2$, as well as the coefficient of variation, were applied for this purpose. For emulsion analysis with whole egg powder (EPBB-1), the coefficient of multiple determinations R^2 of the models for the dependent variables (Z-average, PDI, zeta potential and viscosity) were 0.96, 0.96, 0.88, 0.97 respectively. This reflects the adequacy of the quadratic model to describe and predict the influence of the independent variables on the response variables. Furthermore, the R^2 for the dependent variables (Z-average, PDI, zeta potential and viscosity) for EPBB-2 were 0.9, 0.76, 0.7, and 0.89 and the same for EPBB-3 was 0.97, 0.96, 0.88, 0.96 respectively.

This implies a high correlation between predicted and actual data. As shown in **Supplementary data, tables 7-9**, the respective Adj-R² values were 0.9, 0.89, 0.7, and 0.92 for EPBB-1, 0.81, 0.54, 0.43, and 0.83 for EPBB-2, 0.94, 0.89, 0.71, and 0.92 for EPBB-3. The relative significance of each term was also assessed using a P-value, a small P-value reflecting a greater significant impact on the corresponding independent variables.

3.2. Analysis of RSM models

3.2.1. 3D surface plots of the emulsion droplet size (Z-average)

DLS method, also called photon correlation spectroscopy, is a non-invasive technique well established for constantly measuring the size of particles and molecules in the submicron size (Bei, Marszalek & Youan, 2009). As viscosity directly affects the Brownian motion of nanoparticles; hence for size evaluation, all EPBBs were diluted to ¼ ratio. There is an inverse correlation between the particle's size and the emulsion's stability (McClements, 2015), therefore, the droplet size of nanoemulsions is crucial as it influences the physicochemical properties such as rheological, stability, and release characteristics (Hashtjin & Abbasi, 2015). Furthermore, it was reported that a smaller particle's size has a remarkable effect on the emulsion stability through controlling the emulsion's sedimentation by gravitational separation due to heavier size (Guzey & McClements, 2007). The effect of independent variables on the emulsion particles size was further corroborated with 3D surface plots of the cubic model generated by the RSM of two independent variables within the experimental range while holding the other parameters constant.

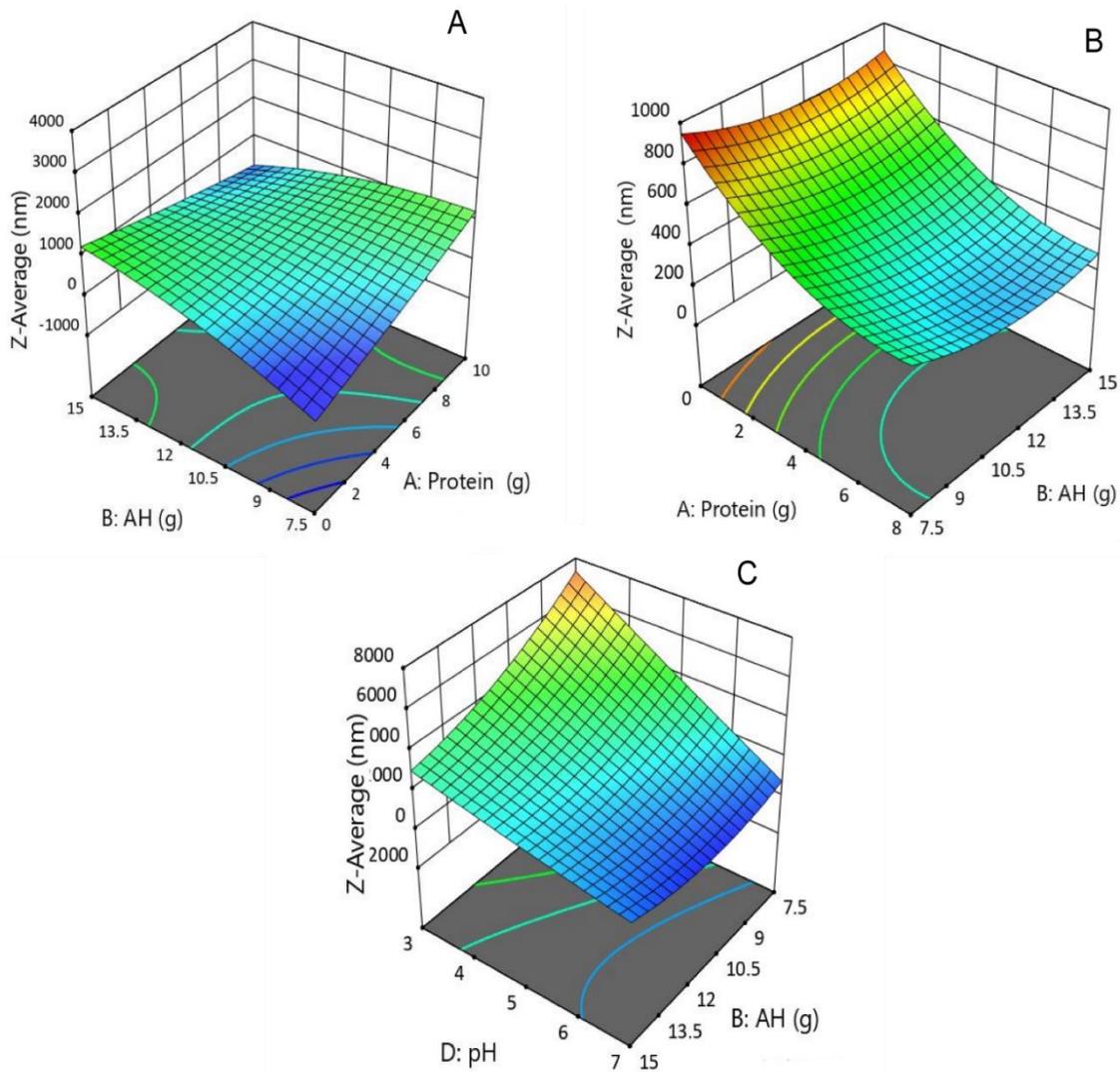


Figure 4.1. 3D surface plots of the variables effect on the emulsions droplet size as a function of A: protein and AH concentration on EPBB-1, B: Protein and AH concentration on EPBB-2 and , C: pH and AH concentration on EPBB-3.

Results show a high correlation between AH and protein concentration that have a significant influence on the particles' size of the final emulsion of EPBB-1, as shown in **Fig. 1.A** Therefore, the droplet size decreased significantly in the extreme conditions of both high or low AH and protein content ($P \leq 0.05$). This might explain the high importance of the polysaccharide (AH) function that could coat the surface area of proteins and form a higher number of smaller particles (Huang, Kakuda & Cui, 2001). Indeed, polysaccharides provide larger surface areas between emulsion droplets and the continuous phase, allowing smaller droplets to form. These results are in agreement with the findings of Hosseini, Tarzi, Gharachorloo, Ghavami & Bakhoda, (2015).

The 3D surface plot of EPBB-2 droplet size in **Fig. 1.B** shows that particles size increases significantly at low protein content, especially with a high AH concentration (12 g to 15 g). This explains the same phenomenon avouched with EPBB-1 indicating that the presence of AH helps to stabilize the emulsion through electrostatic repulsion that creates smaller particle size. However, the different effects of the same parameters (AH and protein) on the average size of emulsions is definitely related to the type of protein. Despite having almost the same characteristics, egg white proteins and whole egg protein react in different ways with the polysaccharide due to the amount of protein present in each.

For EPBB-3, the particle size increased to 7,000 nm at both low pH and AH content, as depicted in **Fig. 1.C**. The mean droplet diameter of emulsions prepared at pH 7 was smaller than that prepared at pH 3 (250 nm compared to 1,600 nm). This could indicate that, at pH 7, egg proteins and AH become oppositely charged and form an electrostatic complex. This complex can contribute to forming a protective layer around the dispersed phase. This layer can prevent droplet coalescence and aggregation, thereby maintaining a smaller particle size distribution and offering a more stable emulsion.

It is noteworthy that AH have a remarkable effect on emulsion stability particularly by affecting the particles size. In fact, the charge carried by AH makes the emulsions sensitive to pH fluctuations. Knowing that AH is composed of a branched hydrophilic Arabian-Galatian units that bend to the hydrophobic polypeptide backbone, the hydrophobic groups adhere to the droplet surface, while the hydrophilic counterpart bonds to the solution. Thus, creating a stable emulsion through preventing droplet aggregation via electrostatic and steric repulsion (Buffo et al., 2001; Gharibzahedi, Mousavi, Hamed & Ghasemlou, 2012; Shams et al., 2023).

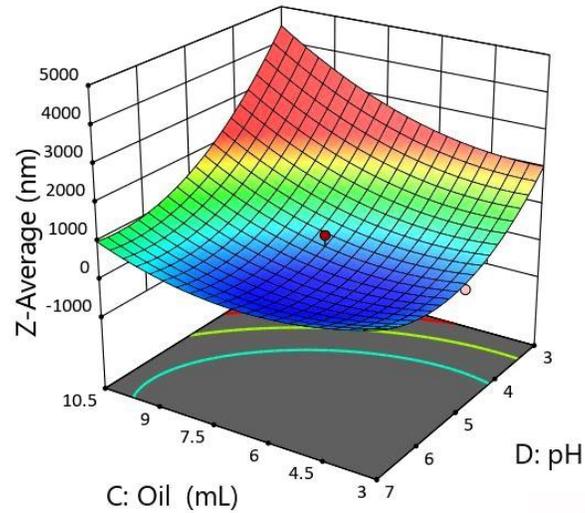


Figure 4.2 3D surface plots of the whole egg emulsion EPBB-1 droplet size as a function of pH and oil concentration, at constant protein and AH concentrations.

The 3D graph in **Fig. 2** revealed that a combination of low pH 3 and a high oil concentration of 7% significantly increased particles size to a range of 4,000 nm ($P \leq 0.05$). The large size of particles could be ascribed to the low pH, which caused the oil droplet to adhere to the emulsion particles' surface, forming a coarse emulsion of oil particles in the solution. As a result the electrostatic repulsion between oil droplets decreases and flocculation can occur due to pH variation that affects the AH-stabilized emulsion around their isoelectric point (pI). The findings were also reported by numerous research studies (Charoen et al., 2011; Dickinson, Galazka & Anderson, 1991; McClements, 2015).

3.2.2. 3D surface plots of the emulsion Polydispersity index (PDI)

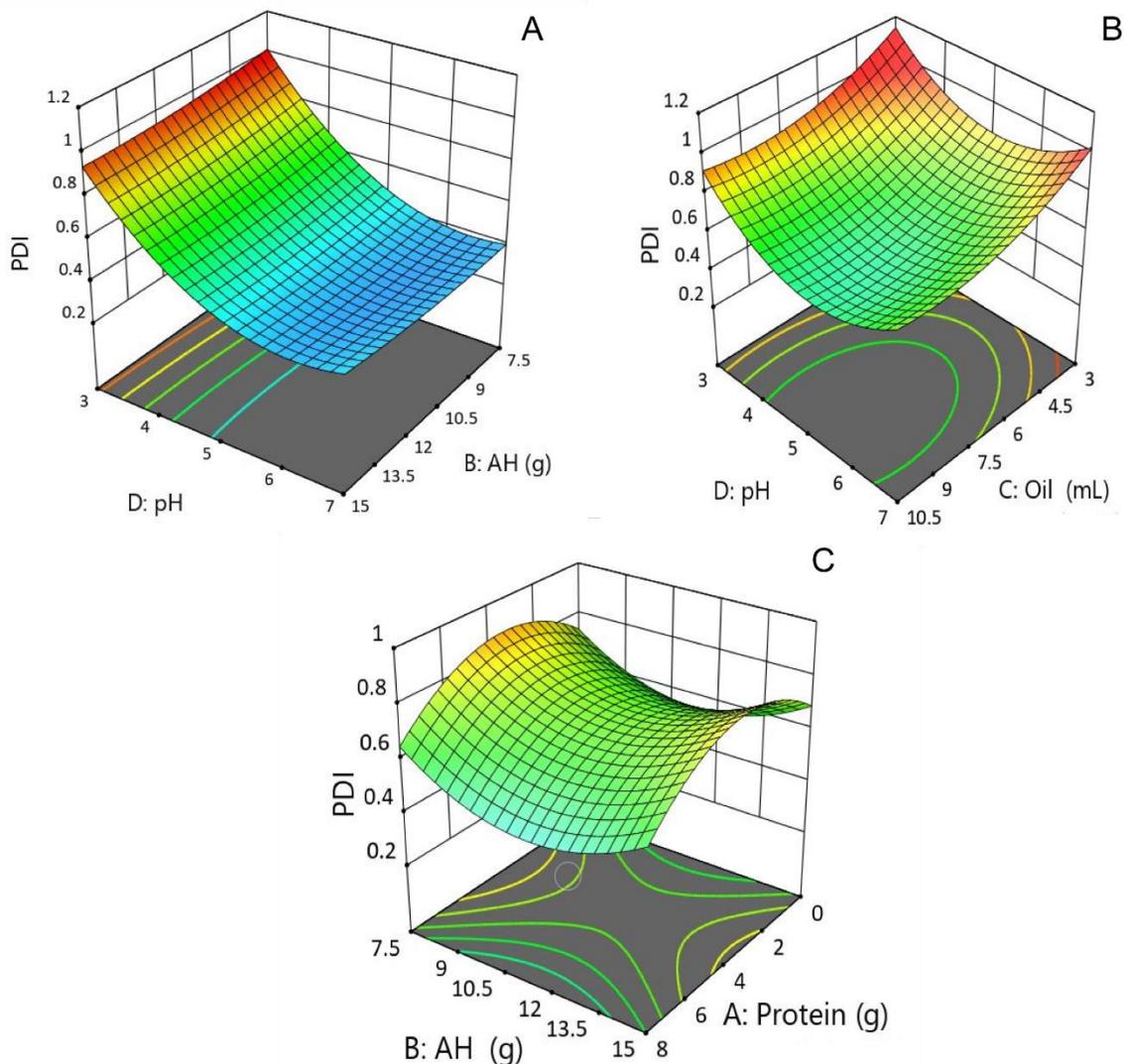


Figure 4.3 3D surface plots of the emulsion PDI as a function of **A:** pH and AH on EPBB-1, **B:** pH and oil concentration on EPBB-2, **C:** protein and AH concentration on EPBB-3.

The effect of pH on the polydispersity index was clearly stated with EPBB-1, as shown in **Fig. 3.A**, pH has a significant effect on the droplet size distribution ($P \leq 0.05$). Results reveal that a neutral pH can reduce particles polydispersity until 0.4, while a more acidic pH leads to a higher PDI value up to 1. In addition, PDI was slightly reduced in the presence of high AH concentration in a low pH.

Fig. 3.B exhibits the effect of both pH and oil combination on the droplet size distribution with constant protein and AH concentration. The results revealed that an optimal PDI value of around

0.2 can be achieved at an average oil content of 7.5 mL to 9 mL with a pH between 5 and 6. However, at low pH and low oil content, PDI rises to 1.1.

PDI was largely affected by pH variations in EPBB-1 and 2, which may be linked to the charged and hydrophilic nature, not only of the polysaccharide surface, but also, of the charges carried by the different egg proteins.

However, the surface plot in **Fig. 3.C** shows the effect of AH and protein content combination on the polydispersity index of EPBB-3. Thus, as the conspicuous observation can be made from the 3D Design, an optimum PDI value of 0.2, could be obtained at the central point of AH (11.25 g) with a maximum protein content of 8 g. Furthermore, a low PDI value was also detected in both low protein concentration while keeping AH concentration on an average of 11.25 g, which clearly states the importance of AH for a homogenous particles distribution in the emulsion. The positive effect of AH on PDI reduction has been discussed by Gharibzahedi et al. (2012), which could be the result of the hydrocolloid's emulsifying activity. Due to the higher surface activity of proteins compared to polysaccharides, the effect of protein concentration on droplet homogeneity can be addressed. Such condition-based interactions lead to competition between egg protein and AH to adsorb onto the droplet surface as an emulsifier. Therefore, the linear effect of egg protein concentration and the effect of its interaction with AH on the PDI of EPBB-3 can be explained (Raikos, Duthie & Ranawana, 2017).

3.2.3. 3D surface plots of the emulsion zeta potential

The zeta potential of the lipid droplets of the microfluidic emulsion in the 3D plot shows values ranging from -25 to -39 mV. In general, particles with values lower than -30 or higher than +30 are considered stable because, at these values, the electrical charge of droplets generates strong repulsive forces between the particles, increasing stability (Heurtault, 2003). Nevertheless, the zeta potential values reported in the present study were highly related to protein concentration, AH and pH. As shown in **Fig. 4.A** for EPBB-1, the zeta potential approaches zero with an increasing protein concentration up to 10 g. However, the value increases upon augmenting the amount of AH. Also, as shown in **Fig. 4.C**, the increasing pH value approaching 7 with an average AH of 12 g increases the negativity of the zeta potential value.

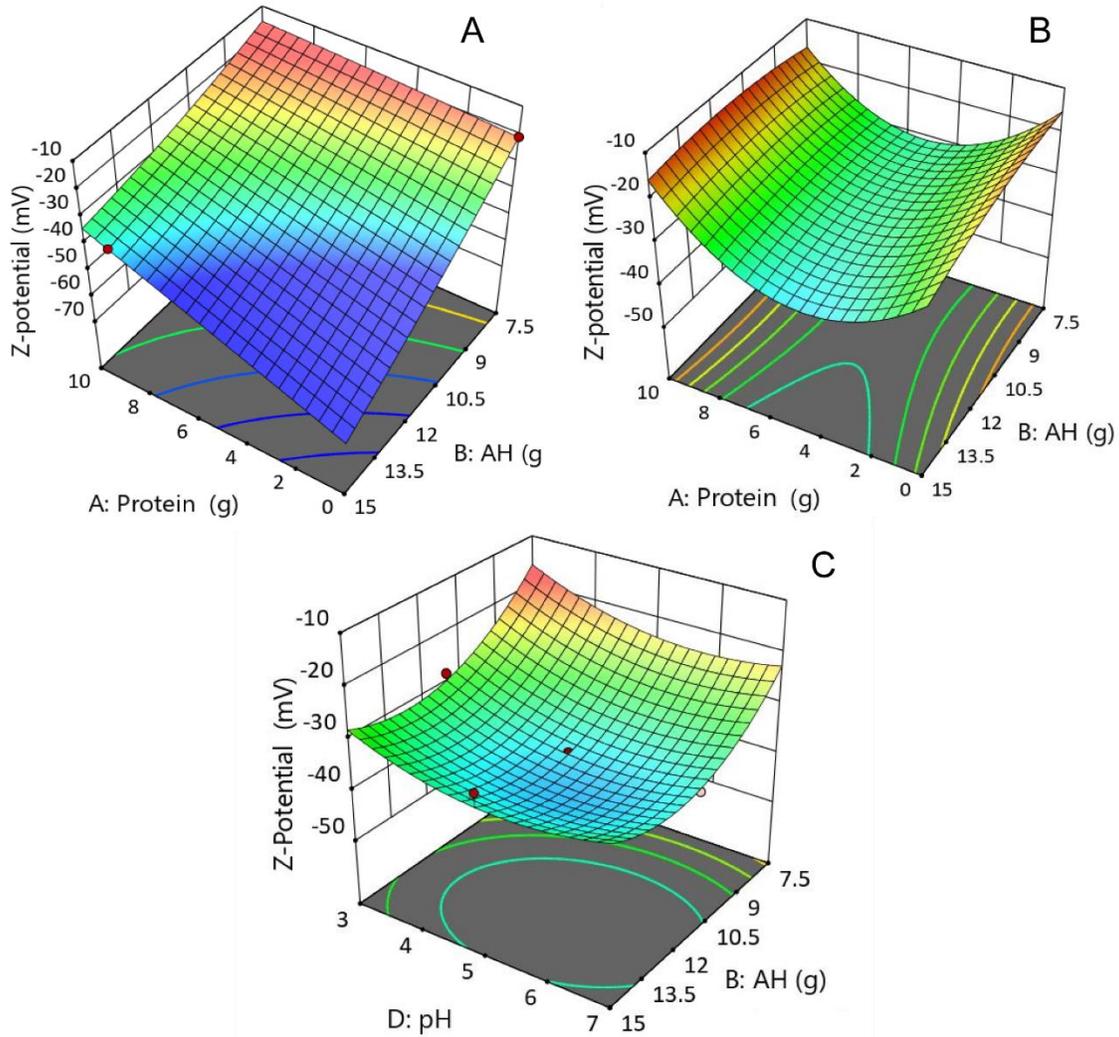


Figure 4.4 3D surface plots showing the effect of protein and AH concentration on the zeta potential for A (EPBB-1) and B (EPBB-2), and C: the effect of pH and AH on the zeta potential of EPBB-3.

The 3D surface plot of EPBB-2 zeta potential in **Fig. 4.B** reveals that charges decrease in extreme conditions of low and high protein concentrations. The optimal zeta potential, in our case the largest negative value ($y = -40$ mV), was obtained with 5 g protein concentration and 12 g AH. Although previous research has reported that the electrical charge (zeta potential) of the emulsion droplets was strongly affected by AH concentration (Mirhosseini et al., 2008). This graph does not show a clear interaction between AH and proteins to create a remarkable effect on the deviation of zeta potential. However, it shows the direct effect of protein concentration on particle charge.

As shown in all the graphs (**Fig. 4A-4C**), a high concentration of AH emphasized the negative charge of particles in the emulsion. This could be due to the AH content that increased the negative surface charge of EPBB droplets which leads eventually to increase the negative charge of zeta potential. This phenomenon was strongly observed, especially with EPBB-1 in **Fig. 4A**. In the absence of egg proteins, strongly negative zeta values are observed due to the inherent negative charge of the AH (Akhtar et al., 2006; Charoen et al., 2011; Shams et al., 2023). However, an increase in egg protein concentration leads to less negativity in zeta values because there are more positively charged proteins, which corroborates with the findings of Nielsen et al. (2013). **Fig. 4C** demonstrates that the optimal particles charge is obtained at a pH between 5 and 6. Conversely, a minimum AH concentration (7.5 g) and an extreme acidic pH value marks a low zeta potential value reaching -18 mV.

These graphs confirm that, at a central point of AH concentration, the optimal EPBB-3 zeta potential is obtained at almost neutral pH between 6 and 7. Juttulapa Piriyaprasarth & Sriamornsak, (2013) showed the effect of pH 4 and 7 on the stability of the emulsion. In fact, the zeta potential of emulsion droplets prepared at pH 7 was more negative than that prepared at pH 4 which agrees with our results. This could explain that changes in pH can modify the protein's charge. When H⁺ concentrations are low (pH >> pI), carboxyl groups become negatively charged (-COO⁻), while amino groups remain neutral (-NH₂), creating a net negative protein charge and vice versa. At the isoelectric point (pI), there is a balance between positively and negatively charged groups on proteins, so that no net charge exists (Charoen et al., 2011).

3.2.4. 3D surface plots of the emulsion viscosity

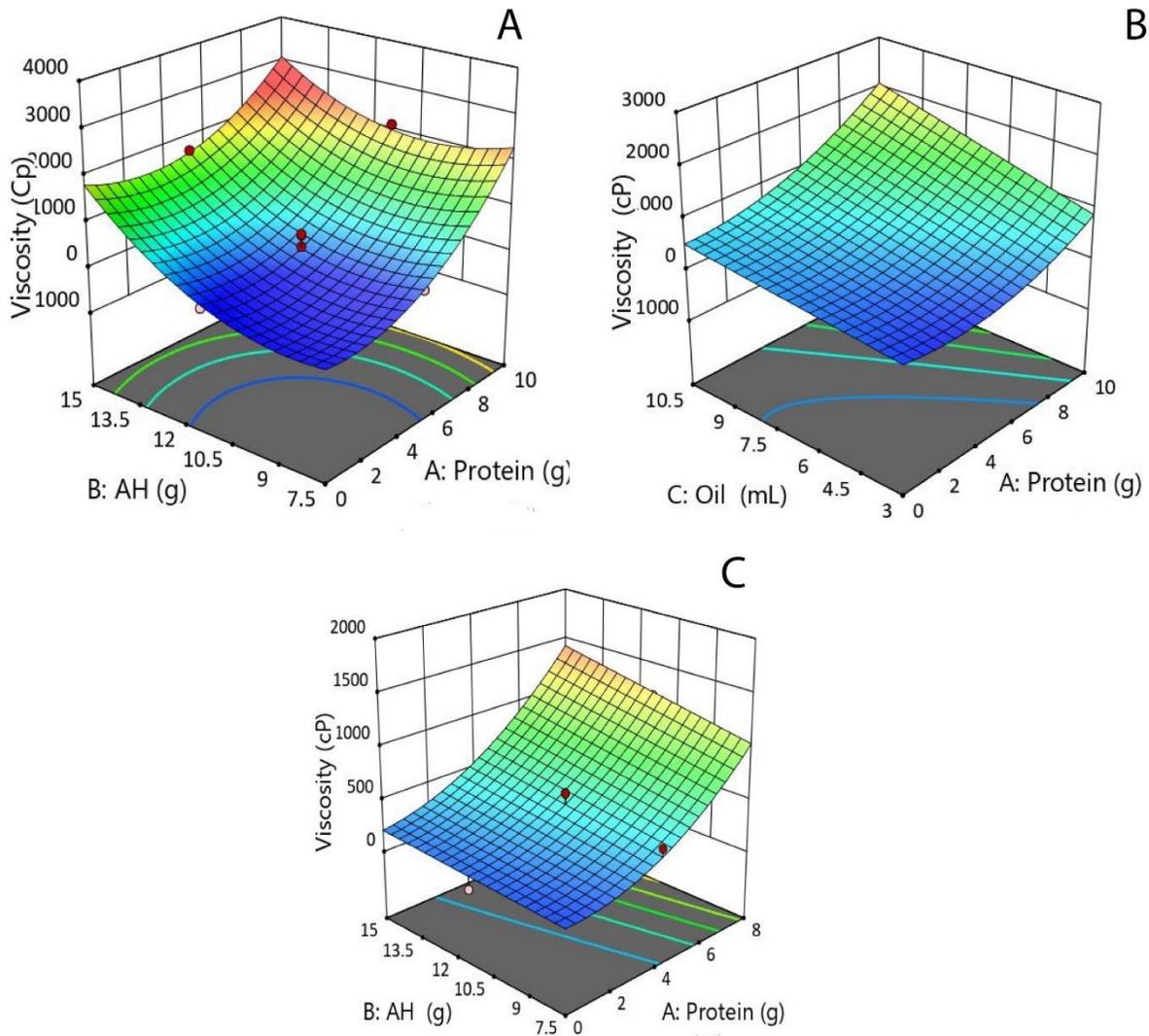


Figure 4.5 3D surface plots of the viscosity of the emulsion as a function of **A:** protein and AH concentrations of EPBB-1, **B:** oil and protein concentrations of EPBB-2, **C:** AH and protein of EPBB-3.

The effect of protein concentration and AH for EPBB-1 is illustrated in **Fig. 5.A**. The viscosity was significantly affected by protein contents and AH concentration ($P \leq 0.05$). With the simultaneous increase in protein and AH concentrations, the viscosity of the emulsion increased to reach 3,000 cP. This could be explained by the high amount of powders including egg protein and AH, which saturated the solution and its ability to dissolve the solid parts. This probably relates to the formation of solid carbon connection between AH and egg proteins creating a complex structure. This finding was also confirmed by (Shi et al., 2023) that adding gums such as xanthan gum

increased the viscosity of samples. Mirhosseini et al. (2008), reported as well that high concentrations of xanthan gum and Arabic gum exhibited a high apparent viscosity. This could be due to the opposite charges between egg protein and polysaccharide, which created high electrostatic interactions and generated particle aggregates that filled the network structure under acidic conditions. Simultaneously, gum as a high-viscosity hydrocolloid, may produce a more mechanically firm network structure in the continuous phase, increasing the system viscosity (Huang et al., 2022).

In **Fig. 5.B**, protein concentration and the quantity of oil in the EPBB-2 formulation strongly affected viscosity. The most viscosity of 2,000 cP was detected in both high protein concentration and oil quantity and vice versa. Therefore, coordination between both variables can be optimized to obtain an optimum viscosity value of around 1,500 cP. At the same time, a maximum oil concentration of 10.5 mL and 8 g protein concentration or 7.5 mL oil and 10 g, respectively could also lead to an acceptable emulsion viscosity.

The 3D model of EPBB-3 in **Fig. 5.C** shows the viscosity of emulsion as a function of AH and protein concentration. The simultaneous increase of protein concentration renders a viscous solution reaching almost 1500 cP and vice versa. The optimal is detected in a central point of protein concentration (4 g). Hence, all values were accepted as the viscosity of emulsions did not exceed 2,000 cP for industrial feasibility considerations. Indeed, a high viscosity (more than 2000 cP) can lead to clogging the canals of microfluidization process.

All EPBBs emulsions containing a high concentration of both AH and proteins revealed a high viscosity. This confirms what was stated previously that AH formed a solid structure with all the egg proteins, creating a highly viscous solution.

3.3. Optimization procedure

Numerical and graphical optimization procedures were fitted in the design expert software to predict the exact optimum level of independent variables leading to the desirable response goals. Even though suggested optimal emulsions were generated via RSM data plotting, there had to be a compromise to optimize all the 4 responses (particle size, PDI, zeta potential and viscosity) at the same time. The use of 3D plots of the regression model was highly recommended to understand more of the interactions between the independent variables which, obviously, will lead to determine the optimal model for each EPBB (Mason, Gunst & Hess, 2003).

To optimize the formulations conditions, the dependent responses: particle size, PDI, and zeta potential were set to minimal conditions. In the meanwhile, since an adequate zeta potential value

for good stability should be more than ± 30 mV and all our samples presented a negative value, we set the optimum value to the minimum. The viscosity was set to the range between 500 cP and 1,500 cP since the viscosity in this range could be easily manipulated and comparable to other beverages available on the market. The protein concentration was optimized to the maximum, and AH, oil, and pH were maintained in range. All the parameters were set on the same importance level. Three (3) additional experiments were carried out at the optimum conditions within the experimental range obtained above to validate the optimization results. No significant difference ($P > 0.05$) was found between the experimental and predicted values, indicating the high accuracy of the presented models. Each independent variable was fitted into a quadratic model to express the responses as a function of independent factors. The model **Equation 2** was used for optimization was established as follows:

$$5 \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1+i}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Where Y is the predicted response, β_0 is the constant coefficient, β_i is the linear coefficient, β_{ii} is the quadratic coefficient, and β_{ij} is the interactive coefficient, x_i , and x_j are the independent variables. K introduces the number of variables. The model adequacy and the effect of process variables on the response were determined by employing the coefficient of determination (R^2), lack of fit, and probability value (P-value). The significance of individual and interaction terms was determined by the analysis of the variance (ANOVA) (Begum et al., 2023). The composition of the optimized emulsion for each egg powder type, and their desirability are resumed in **Table 1**. The optimum values show that EPPB-2 requires a larger AH content (13.69 g) and oil volume (10.5 mL) with the least pH value (5.7) for optimal stability conditions. However, EPBB-1 demands a less oil volume (6.87) to reach a better desired stability of 0.8. Nevertheless, EPBB-3 showed the most desired stability of 1 with the least AH content and the highest protein content. These results confirm that protein powders like (egg whites, egg yolk or whole egg) have different protein's structure that reacts in a different way with certain parameters like pH, oil and AH that creates different stability responses.

Tableau 4.1 Optimal variable values and their desirability for optimal stability conditions of each EPBB.

Formulation	Protein content (g)	AH content (g)	Oil volume (mL)	pH	Desirability
EPBB-1	7.70	12.70	6.87	6.44	0.87

EPBB-2	6.83	13.69	10.50	5.70	0.76
EPBB-3	8.00	11.57	9.80	6.44	1.00

3.4. Stability of emulsions during 30 days

Stability parameters (Z-average, PDI and zeta potential) of EPBB-1, EPBB-2 and EPBB-3 were followed during 30 days of storage in 4°C. Measures with 3 repetitions were taken in day1, 3, 5, 9, 15, 21, 26, and 30. The obtained results are presented in **Fig. 6**.

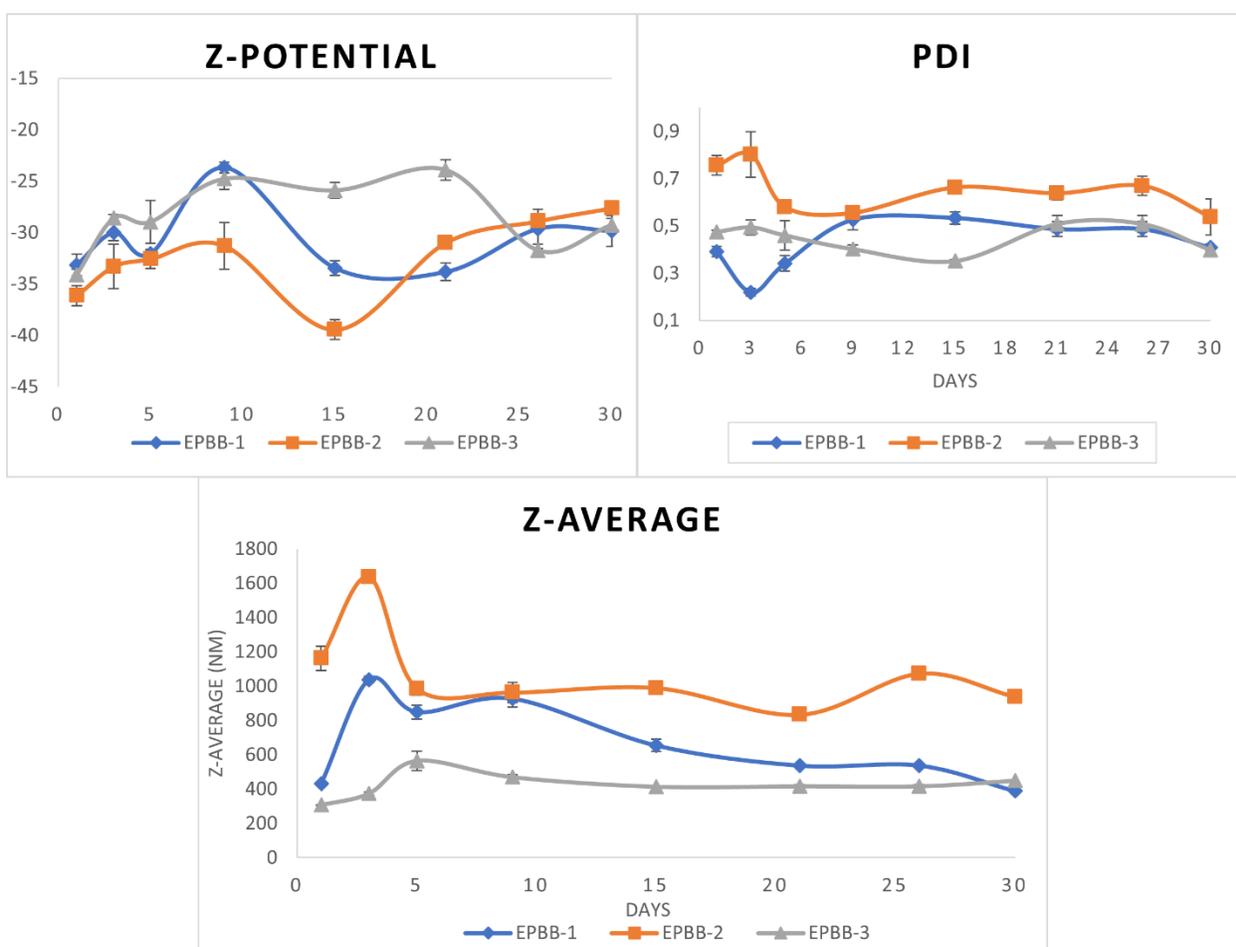


Figure 4.6 Stability parameters (Z-average, PDI and zeta potential) of EPBB-1, EPBB-2 and EPBB-3 during 30 days of storage in 4°C of emulsions prepared by sonication.

The Z-potential of the EPBBs exhibited a dynamic variation during the time but they all tend to stabilize in around -30 mV after 25 days of storage which suggest a consistent particles' charge

stability of EPBBs during 30 days of storage. Regarding the polydispersity index (PDI), both EPBB-1 and EPBB-2 initially displayed a slight variation on day 3 in opposite directions, then they tend to stabilize during the time. However, a noticeable discrepancy emerged between EPBB-2 and EPBB 1 and 3 by the end of the 30-day period, with EPBB-2 stabilizing at a PDI of 0.5, while EPBB-1 and EPBB-3 stabilized at 0.4. This almost uniform variability of particle size in the emulsion could be a characteristic indicator of non-flocculate, stable emulsion.

Furthermore, for Z-average of EPBBs experienced minor variations within the first five days before stabilizing at approximately 400 nm for EPBB-1 and EPBB-3. Nevertheless, EPBB-2 exhibited stability in around 900 nm, indicating a larger particles' size. This variance could potentially be attributed to proteins present in egg white, such as ovalbumin, known to coagulate easier and form larger particles. This observation aligns with the higher PDI detected for EPBB-2 compared to EPBB-1 and EPBB-3, underscoring the influence of protein composition on particle size and distribution within the emulsion.

3.5. Optimization of microfluidization parameters

The results of emulsion stability parameters (Z-average, PDI, zeta potential, viscosity) for the EPBBs are presented in **Table 2**. For EPBB-1, EPBB-2, EPBB-3, 3 cycles were performed with a stable pressure of 10,000 psi. The shear force generated in the interaction chamber during microfluidization process is intended to disrupt the intermolecular disulfure bonds and hydrophobic interaction in order to form a higher stable emulsion (Ozturk & Turasan, 2021).

Tableau 4.2 Evaluation of the effect of different microfluidization cycles on the stability parameters of each EPBB.

Formulation	Number of cycles	Z-Average (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	Viscosity (cP)
EPBB-1	1	748.40±22.05 ^b	0.480±0.01 ^a	-29.00±1.50 ^b	1597.93±42.30 ^b
	2	675.80±1.21 ^a	0.441±0 ^a	-33.00±0.15 ^a	1520.47±13.10 ^{ab}
	3	1433.00±26.56 ^c	0.823±0.04 ^b	-29.50±0.81 ^b	1468.03±9.60 ^a
EPBB-2	1	2324.50±90.75 ^c	0.958±0.02 ^b	-31.17±0.58 ^b	669.73±18.70 ^b
	2	1195.50±38.97 ^a	0.759±0.02 ^a	-41.03±1.41 ^a	648.57±10.36 ^b

	3	1431.50±2.60 ^b	0.933±0.01 ^b	-22.17±1.01 ^c	555.53±28.52 ^a
EPBB-3	1	991.83±54.82 ^c	0.456±0.07 ^a	-27.40±0.44 ^b	1578.57±31.32 ^b
	2	603.57±9.27 ^a	0.466±0.04 ^a	-31.07±0.69 ^a	1504.03±36.84 ^{ab}
	3	813.80±6.95 ^b	0.482±0.05 ^a	-31.47±0.81 ^a	1471.10±21.50 ^a

Generally, emulsions with zeta potential in the internal range of [-30 mV; 30 mV] may be more prone to coalescence, flocculation, or phase separation, a low PDI (in the range of 0.2) is a marker of uniform particle size distribution and may improve the stability and eventually performance of EPBBs. A 100-1,000 nm range for the Z-average is optimal for beverage emulsions. The particle size range should be small enough to provide a smooth and creamy mouthfeel texture for sensory attributes.

Results showed that all developed EPBBs with 2 cycles have a significant zeta potential values of more than -30 mV, especially for EPBB-2 that reached -41 mV, for EPBB-3 there was no significant difference ($P > 0.05$) between 2 and 3 cycles, they both have a good stability index of zeta potential value with -31 mV. The lowest distribution value for the PDI was detected after 2 cycles for EPBB-2. Cycles 1 and 2 remain comparatively low with 0.48 and 0.44 respectively, which is better than cycle 3 with 0.823 for EPBB-1. However, there is no significant difference ($P > 0.05$) between PDI after all cycles for EPBB-3. Despite, all the Z-averages presented a higher value than 100 nm, the minimum Z-average of 675.8, 1195.5, and 603.56 nm subsequently for EPBB-1, EPBB-2 and EPBB-3 was detected after 2 cycles. These high values of Z-average could be explained by the different composition of egg protein. In particular, with EPBB-2 that presented higher particle size than EPBB-1 and -3, which is probably related to the egg white proteins like ovomucin that are glycosylated, meaning they have carbohydrate chains attached. These carbohydrate chains can contribute to the size and shape of protein particles. Concerning viscosity, a significant difference was obtained after 3 cycles for all EPBBs with 1,468 cP for EPBB-1, 555.5 cP for EPBB-2 and almost 1,471 cP for EPBB-3 indicating that more cycles of microfluidization can reduce formulation viscosity. A less viscosity, with a range of 500 cP, was detected with EPBB-2. Primarily, this could be to the egg white protein composition that contains ovalbumin, conalbumin and ovotransferrin which are water-soluble proteins. This can contribute to less viscous emulsions. Moreover, these proteins have the ability to form foam due to their

capacity to denature and unfold upon whipping. In fact, this could lead to a more distributed protein that makes a less thickening effect. Secondly, egg yolk contains phospholipids such as lecithin that can form more complex interaction with oil and water phases, resulting in more viscous and thicker emulsions. Lecithin is also a high-emulsifying agent that helps stabilize the oil-water interface. This emulsifier does not exist in egg white resulting offer to more viscous emulsion. After comparing all results, there is no unique response that can guarantee a good stability, it's the combination of all these responses that can indicate the emulsions' stability. After comparing collected stability responses for all EPBBs, cycle 2 was selected as an optimal microfluidization treatment for better average size, PDI and zeta potential compared to cycles 1 and 3.

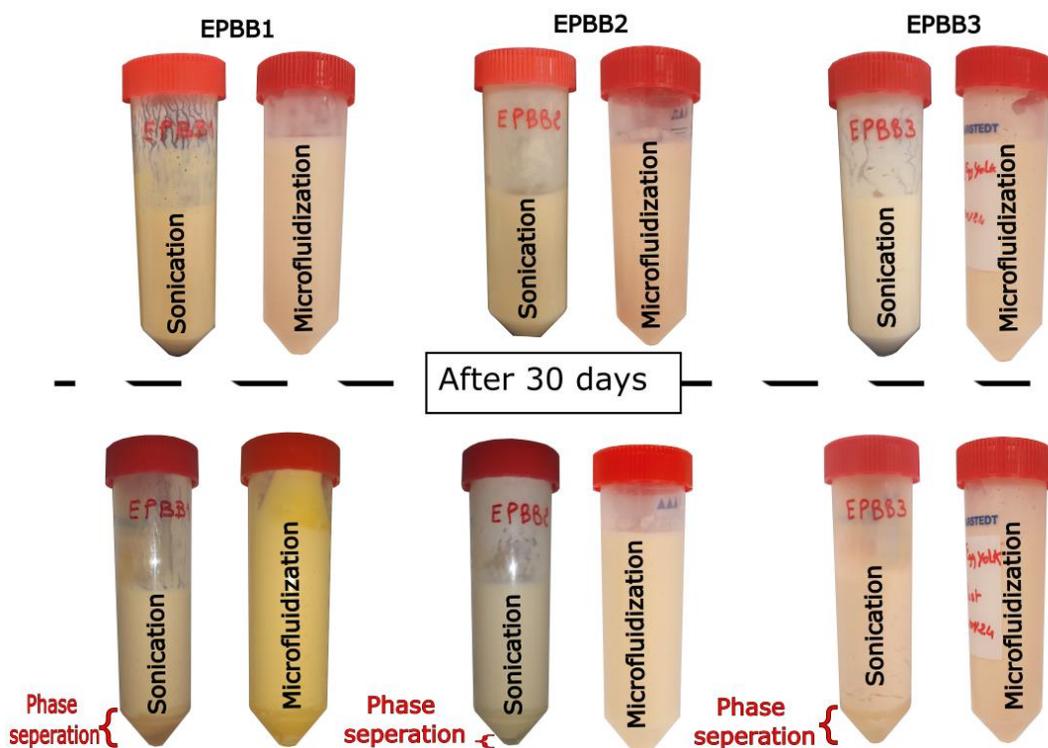


Figure 4.7 The physical aspect of EPBB formulations (EPBB-1, EPBB-2, EPBB-3) with different processes of microfluidization and sonication after 30 days of storage in 4°C. ©Ayman ben Abdeljalil

The physical aspect of formulations after 30 days of storage in 4°C (**Fig. 7**) revealed a clear difference between the process of sonication and microfluidization. In fact, a clear phase separation was detected especially with EPBB-1 and EPBB-3. However, EPBB-2 also showed a slight phase separation compared to EPBB-2 with microfluidization. This could indicate that formulations made through the microfluidization present a better visual stability than sonication. Despite the results obtained for Z-average and PDI doesn't confirm a high stability for the

emulsions but the results obtained for Z-potential align with the visual observation that the most visually stable formulation is EPBB-2. This could be due to the different particles size of egg proteins that created the size variability. In our case, the particles' charge (z-potential) can be considered as a reliable indicator for emulsion stability.

3.6. Microparticles characterization by TEM

To further investigate, TEM micrographs were taken to understand the different appearance of protein dispersion and structure between the optimized formulations using sonication process EPBB-1 (**Fig. 8A**), EPPB-2 (**Fig. 8B**), and EPBB-3 (**Fig. 8C**) and the optimized formulations using microfluidization process EPBB-1 (**Fig. 8D**), EPPB-2 (**Fig. 8E**), and EPBB-3 (**Fig. 8F**). **Table 3** presents average particle size for each EPBB using a different process. The images show clear differences in particle dispersion, structure and size between each EPBB which is probably related to different protein sources (whole egg, egg whites and egg yolk). However, the differences between the same EPBBs with different process are highly related to the shear stress generated by each technique. All images in **Fig. 8** showed a spherical shape of aggregates that is probably related to the basic emulsion O/w ingredients. The intense background colour indicates the interaction between the DMEM solution with the egg white protein contained in EPBB-1 and -2 in **Fig. 8A, B** and **E**. For the sonication process, **Fig. 8A** demonstrated a dispersed particles distribution with an average particle's sizes of 52.7 nm. In the meanwhile, **Fig. 8B** and **C** illustrated a larger size dispersion and larger particle size of about 74 nm. These aggregates show a non-homogenous dispersion that has more tendency to aggregate and form larger particles size through coalescence. These findings confirm the physical aspect of emulsion's separation observed after 30 days of storage. For microfluidization process, **Fig. 8D** and **F**, demonstrate partially homogenous particles with an average particles size from 45 to 50 nm. However, **Fig. 8E** demonstrating the EPBB-2 based on egg whites showed some spherical aggregations and a relatively larger droplet size with an average of 84 nm. The larger droplet size could be related to the high content of ovalbumin in egg white that is more sensitive to aggregate with temperature. Since the high shear stress homogenization could raise the temperature of emulsions that may affect the dispersion of aggregates. This reflects the impact of the microfluidization process on the particle size and dispersion of the droplets in all EPBBs. The shear stress generated by microfluidization was able to break the hydrophobic interaction areas and the intermolecular disulphide bonds, causing a decrease in viscosity resulting from heat-induced protein aggregation. Only spherical aggregates were observed in all the TEM micrographs since the pH used in all optimized EPBBs was between 5.7 and 6.4, confirming that the linear aggregates can only be formed at pH 4, reported by many other research studies. Furthermore, this highlights the importance of electrostatic repulsion at pH 6, which inhibit further particle interactions and, as a result, more accessible SH groups. The particle size obtained with ETM results is different from the Z-average results obtained with DLS machine. In fact, The Z-average present particle size based on their diffusion rates, considering their hydrodynamic size

while the size in ETM image is determined based on their physical size. The difference between results could also be related to sonication treatment that created a smaller particle size due to the shear force generated during acoustic cavitation (Ashokkumar et al., 2009). However, the correlation between sizes is kept the same demonstrating a larger particle size for EPBB-2 with 100 nm compared to DLS method (2 cycles) with 1195 nm and smaller particles' size for EPBB-1 and EPBB-3 with simultaneously 50 and 45 nm compared to DLS with simultaneously 675 and 603 nm. This confirms the currency of our results using different particle size measuring methods.

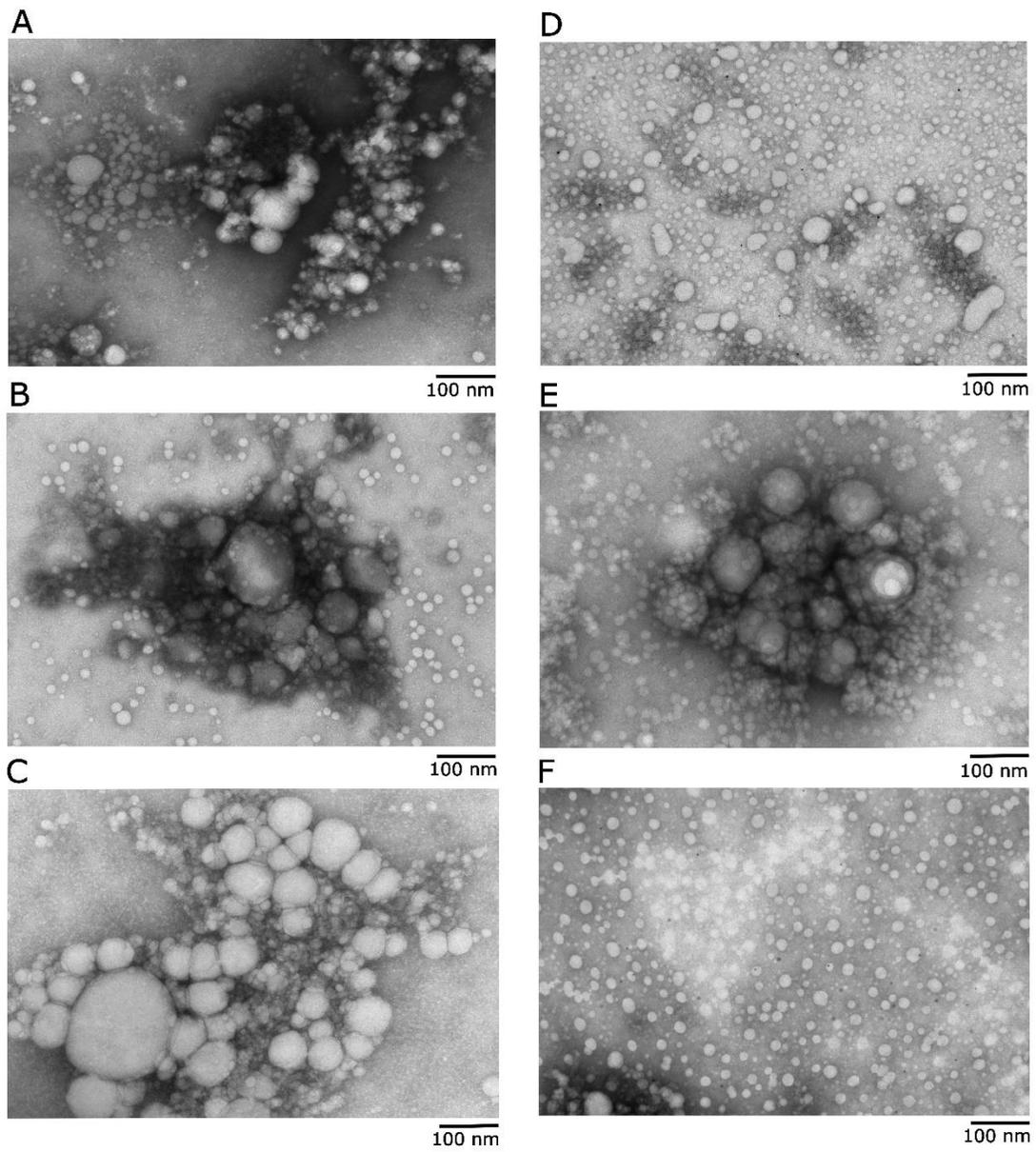


Figure 4.8 Comparison between TEM micrographs of optimized formulations A (EPBB-1), B (EPBB-2) and C (EPBB-3) after sonication and D (EPBB-1), E (EPBB-2) and F (EPBB-3) after microfluidization process, with a resolution of 100 nm. ©Aymen Ben Abdeljalil

Tableau 4.3 Average particle size of optimized emulsions with sonication and microfluidization.

Emulsion	Average particle size (nm)	
	With sonication	With microfluidization
EPBB-1	52.74 ± 5.87 ^a	49.53 ± 3.13 ^a
EPBB-2	74.11 ± 8.72 ^b	84.25 ± 9.72 ^b
EPBB-3	73.75 ± 6.73 ^b	45.43 ± 1.39 ^a

4. Conclusions

The effect of independent parameters (protein content, AH content, oil volume, and pH) was analyzed to develop optimal EPBBs o/w emulsions through CCD and RSM. This study demonstrated that RSM could efficiently predict the optimized value of each variable to form EPBB-1, EPBB-2, and EPBB-3. Optimal dependent parameters were obtained for each EPBB with the highest reliability results for EPBB-3. All EPBBs demonstrated a better physical stability response through microfluidization at 2-cycle process under 10,000 psi compared to only 1 or 3 cycles. The high zeta potential value of EPBB-2 (-41 mV) was confirmed with visual observation indicating a good stability. The obtained images with TEM confirmed the obtained results with DLS machine indicating that the particle size of EPBB-2 was larger than EPBB-1 and 3. Also, TEM results confirmed the better stability of emulsions with microfluidization than those obtained with sonication after analyzing the physical aspect of the EPBBs after 30 days of storage in 4°C. The phase separation obtained with sonication compared to microfluidization indicates a better stability feature and a higher smooth texture for formulations treated with microfluidization. EPBB-3 presented relatively smaller particle size with microfluidization with a range of 45 nm compared to sonication with a range of 74 nm indicating a better stability feature. ETM images revealed that, the structure and particle dispersion of EPBB-1 and 2 show more tendency to form larger aggregates and lead to phase separation during the time using sonication method. This was confirmed with their physical aspect after 30 days of storage at 4°C showing a better homogenous structure using microfluidization. With their high digestibility rate and their rich nutritional profile of essential amino acid, egg protein-based beverages, offer an opportunity for companies seeking to fulfill the needs of health-conscious consumers. Such EPBBs could serve as a stable foundation for further flavour development targeting the growing functional beverage market.

CRedit authorship contribution statement

Aymen Ben Abdeljalil: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Resources, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Lily Jaiswal:** Formal analysis, Validation, Writing-review & editing. **Stephane Salmieri:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Resources, Software, Supervision, Validation, Writing-review & editing. **Monique Lacroix:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing-review & editing.

Data availability

The data that has been used is confidential.

Declaration of competing interest

All authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Fédération des producteurs d'oeufs du Québec (FPOQ) and Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) contract no: ALLRP 555485-20 and to the Consortium for Research and Innovation in Industrial Bioprocesses in Quebec (CRIBIQ) no: 2019 103-C54. Aymen Ben Abdeljalil was a fellowship recipient of the INRS Foundation (Arbour scholarship).

5 REFERENCES ARTICLE

- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review. *Poultry Science*, 92(12), 3292–3299. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03391>
- Allahdad, Z., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2023). Fabrication of heat-stable composite microparticles from egg and whey proteins and their application in emulsion stabilization. *Food Hydrocolloids*, 144, 108943. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108943>
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., & Kentish, S. (2009). Hot topic: Sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5353–5356. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2561>
- Begum, T., Follett, P. A., Shankar, S., Moskovchenko, L., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2023). Evaluation of bioactive low-density polyethylene (LDPE) nanocomposite films in combined treatment with irradiation on strawberry shelves-life extension. *Journal of Food Science*, 88(5), 2141–2161. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16551>
- Bei, D., Marszalek, J. & Youan, B.-B. C. (2009). Formulation of Dacarbazine-loaded Cubosomes—Part II: Influence of Process Parameters. *AAPS PharmSciTech*, 10(3), 1040. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9296-0>
- Buffo, R. A., Reineccius, G. A., & Oehlert, G. W. (2001). Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 53–66. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00050-3)

- Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Naivikul, O., & McClements, D. J. (2011). Influence of Biopolymer Emulsifier Type on Formation and Stability of Rice Bran Oil-in-Water Emulsions: Whey Protein, Gum Arabic, and Modified Starch. *Journal of Food Science*, 76(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01959.x>
- Childs, J. L., Thompson, J. L., Lillard, J. S., Berry, T. K., & Drake, M. (2008). CONSUMER PERCEPTION OF WHEY AND SOY PROTEIN IN MEAL REPLACEMENT PRODUCTS. *Journal of Sensory Studies*, 23(3), 320–339. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2008.00158.x>
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods: Commercial Trends, Research, and Health Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192–1206. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>
- Dickinson, E., Galazka, V. B., & Anderson, D. M. W. (1991). Emulsifying behaviour of gum arabic. Part 1: Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, 14(4), 373–383. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90003-U](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90003-U)
- DiMarco, D. M., Norris, G. H., Millar, C. L., Blesso, C. N., & Fernandez, M. L. (2017). Intake of up to 3 Eggs per Day Is Associated with Changes in HDL Function and Increased Plasma Antioxidants in Healthy, Young Adults. *The Journal of Nutrition*, 147(3), 323–329. <https://doi.org/10.3945/jn.116.241877>
- Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Elsevier Science Ltd.*
- Gharibzahedi, S. M. T., Mousavi, S. M., Hamed, M., & Ghasemlou, M. (2012). Response surface modelling for optimization of formulation variables and physical stability assessment of walnut

- oil-in-water beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.006>
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2007). Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by β -Lactoglobulin–Pectin Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 475–485. <https://doi.org/10.1021/jf062342f>
- Hashtjin, A. M., & Abbasi, S. (2015). Optimization of ultrasonic emulsification conditions for the production of orange peel essential oil nanoemulsions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2679–2689. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1322-x>
- Heurtault, B. (2003). Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23), 4283–4300. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00331-4)
- Hosseini, S., Tarzi, B. G., Gharachorloo, M., Ghavami, M., & Bakhoda, H. (2015). Optimization on the Stability of Linseed Oil-in-Water Nanoemulsions Generated by Ultrasonic Emulsification Using Response Surface Methodology (RSM). *Oriental Journal of Chemistry*, 31(2), 1223–1230. <https://doi.org/10.13005/ojc/310282>
- Huang, X., Kakuda, Y., & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: Particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00091-1)
- Huang, Z., Yang, X., Liang, S., Chen, L., Dong, L., Rahaman, A., He, S., Shen, Y., & Su, D. (2022). Polysaccharides improved the viscoelasticity, microstructure, and physical stability of ovalbumin-ferulic acid complex stabilized emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 211, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.078>

- Jaiswal, L., & Worku, M. (2022). Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(27), 7503–7517. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1915241>
- Juttulapa, M., Piriyaarasarth, S., & Sriamornsak, P. (2013). Effect of pH on Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Pectin-Zein Complexes. *Advanced Materials Research*, 747, 127–130. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.747.127>
- Khan, A., Vu, K. D., Chauve, G., Bouchard, J., Riedl, B., & Lacroix, M. (2014). Optimization of microfluidization for the homogenous distribution of cellulose nanocrystals (CNCs) in biopolymeric matrix. *Cellulose*, 21(5), 3457–3468. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0361-9>
- Leveille, M. (2020). *Protein Beverage Trends and Innovation*. Kerry. <https://www.kerry.com/insights/kerrydigest/2020/protein-beverage-trends-and-innovation.html>
- Mason, R. L., Gunst, R. F., & Hess, J. L. (2003). Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science. In *Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science* (second edition, p. 760). John Wiley & Sons.
- McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Third Edition* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18868>
- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N. S. A., & Yusof, S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1–3), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.07.007>

- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Taherian, A. R., & Boo, H. C. (2009). Modeling the physicochemical properties of orange beverage emulsion as function of main emulsion components using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.022>
- Nielsen, N. S., Horn, A. F., & Jacobsen, C. (2013). Effect of emulsifier type, p H and iron on oxidative stability of 5% fish oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(8), 874–889. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200303>
- Ozturk, O. K., & Turasan, H. (2021). Applications of microfluidization in emulsion-based systems, nanoparticle formation, and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 609–625. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.033>
- Park, S.-J., Jung, J.-H., Choi, S.-W., & Lee, H.-J. (2018). Association between Egg Consumption and Metabolic Disease. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(2), 209–223. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.2.209>
- Pathania, S., Parmar, P., & Tiwari, B. K. (2019). Stability of Proteins During Processing and Storage. In *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* (pp. 295–330). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816695-6.00010-6>
- Qian, S., Chen, L., Zhao, Z., Fan, X., Xu, X., Zhou, G., Zhu, B., Ullah, N., & Feng, X. (2022). Epigallocatechin-3-gallate mediated self-assemble behavior and gelling properties of the ovalbumin with heating treatment. *Food Hydrocolloids*, 131, 107797. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107797>

- Quanhong, L., & Caili, F. (2005). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, *92*(4), 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.042>
- Raikos, V., Duthie, G., & Ranawana, V. (2017). Comparing the efficiency of different food-grade emulsifiers to form and stabilise orange oil-in-water beverage emulsions: Influence of emulsifier concentration and storage time. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(2), 348–358. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13286>
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, *11*(3), 684. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>
- Russell, T. A., Drake, M. A., & Gerard, P. D. (2006). Sensory Properties of Whey and Soy Proteins. *Journal of Food Science*, *71*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00055.x>
- Shams, Z., Allahdad, Z., Jaiswal, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2023). Development of hen egg-based protein beverages with high nutritional value. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05909-7>
- Shi, Y., Li, J., Gu, L., Su, Y., Chen, W., Zhang, M., Chang, C., & Yang, Y. (2023). Synergistic effect of gum arabic and xanthan gum on improving rheological properties of low-fat mayonnaise with egg white protein microparticle as a fat mimetic. *International Journal of Food Science & Technology*, *58*(3), 1037–1048. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16237>
- Sun, C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.06.003>

- Tangsuphoom, N., & Coupland, J. N. (2009). Effect of surface-active stabilizers on the surface properties of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1801–1809. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.002>
- Tome, D. (2012). Criteria and markers for protein quality assessment – a review. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S222–S229. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002565>
- Wu, G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Food & Function*, 7(3), 1251–1265. <https://doi.org/10.1039/C5FO01530H>

6 ANALYSES COMPLÉMENTAIRES

6.1 Analyse sensorielle

Les 4 boissons développées ont été évaluées selon les 6 attributs sensoriels suivants (apparence, arôme, saveur, texture, arrière-goût et appréciation globale) conformément à Tawema et al., (2014), par un test sur une échelle hédonique de 9 points avec 38 panélistes. Les boissons sélectionnées (formulation 1 à base de mélange d'extrait de fruits, formulation 2 à base de jus de canneberge et d'arôme de framboise, formulation 3 à base de jus de carotte et d'arôme de pêche, formulation 4 à base d'eau et d'arôme de framboise) ont été servies fraîches après avoir été pasteurisées et refroidies à 4°C. Les boissons ont été servies dans des gobelets en polystyrène transparents en portions de 100 mL et étiquetées avec des codes sélectionnés au hasard pour chaque échantillon pour ne pas affecter les analyses.

Le test consiste à noter sur une échelle allant de 9 (j'aime beaucoup) à 1 (je n'aime pas du tout) les attributs sensoriels en mettant le chiffre approprié pour chaque échantillon. De l'eau et des biscuits non salés ont également été servis pour aider à neutraliser le goût entre chaque échantillon.

1-Je n'aime pas du tout	4-Je n'aime pas beaucoup	7-J'aime moyennement
2-Je n'aime pas du tout	5-Je n'aime ni n'aime pas	8-J'aime beaucoup
3-Je n'aime pas modérément	6-J'aime légèrement	9-J'aime beaucoup

6.2 Analyse de stabilité de phosvitine

6.2.1 Extraction de la phosvitine

Une méthode simple et efficace de (Ko et al., 2011) a été utilisée avec des modifications pour extraire la phosvitine partiellement purifiée du jaune d'œuf et de la formulation en utilisant de l'éthanol et des sels. Le jaune d'œuf frais a été séparé manuellement du blanc d'œuf et roulé avec précaution sur du papier Wattman afin d'éliminer l'albumine de la membrane vitelline. La membrane a ensuite été ouverte à l'aide d'une aiguille pour extraire tout le contenu du jaune d'œuf. 50 g de jaune d'œuf frais ont été homogénéisés doucement avec 2 volumes d'eau distillée

dans un bécher refroidi avec de la glace. Le pH a été ajusté à 6 et centrifugé à 3200×g pendant 30 minutes, puis le précipitant a été homogénéisé avec 4 volumes d'éthanol (85% final) pendant 2 minutes. Le mélange a été centrifugé à 3200 ×g pendant 10 minutes. La phosvitine est extraite du précipitant à l'aide de 9 volumes de NaCl à 10 %, le pH est ajusté à 4 et la centrifugation se fait à 3200×g pendant 30 minutes. Le NaCl a été retiré du surnageant et concentré pendant la nuit en utilisant une méthode d'ultrafiltration avec une membrane de poids moléculaire de 10 kDa. Les échantillons ont été conservés pendant au moins 24 heures à -80°C, puis lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur Labconco sous une pression de 1,16 mbar. Les échantillons ont été conservés congelés jusqu'à être analysés.

6.2.2 Analyse de la protéine sur gel d'électrophorèse

Les protéines obtenues ont été analysées selon le protocole de Guilmineau et al. (2005) avec modification. L'échantillon de phosvitine a été mélangé avec du tampon d'échantillon 4× Laemmli avec un rapport 2:1. L'échantillon a été porté à ébullition dans un bloc chauffant pendant 5 à 7 minutes. Les protéines ont été chargées après dans le gel SDS-page avec un marqueur de poids moléculaire. Le gel a été mis en place. Les échantillons ont été dilués à 1 % (p/v) avec de l'eau Milli-Q et gardés à 4 °C puis insérés dans le gel avec une concentration de 20 µg dans chaque voie.

Un tampon de migration Tris/glycine/SDS à 10 % dans de l'eau distillée a été utilisé pour le SDS-PAGE. Une tension de 35 mA a été appliquée pendant environ 1 heure. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie. Un mélange de méthanol, d'acide acétique et d'eau (40:10:50) a été utilisé comme solution de décoloration. Les poids moléculaires des protéines ont été comparés à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire commercial (Precision plus protein™, Bio-Rad Ltd, Mississauga, ON, Canada). À l'aide d'un système de documentation Gel Doc EZ (Bio-Rad Ltd, Mississauga, ON, Canada), les bandes de protéines ont été photographiées et analysées.

6.3 Analyse de la teneur en phénol

Le contenu phénolique total de 23 échantillons de jus et extraits a été déterminé selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) avec une absorbance mesurée à 760 nm. Ce réactif est composé d'un mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium qui oxydent les phénols et les réduisent en oxyde bleu de tungstène et de molybdène.

Un échantillon de 1 mL homogénéisé ou 1 mg/mL d'échantillon solide a été mélangé dans un tube à essai contenant 6 mL d'eau, puis 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Ltd, Oakville, ON, Canada) a été ajouté au mélange qui a été bien vortexé. Après 6 min, 2 mL de carbonate de sodium monohydraté ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 20% (w/v) (Sigma-Aldrich Ltd), qui donnent une concentration appréciable d'ions phénolates, ont été ajoutés au mélange. La solution a été chauffée à 40°C pendant 20 minutes dans un bain-marie. L'absorbance des échantillons (qui présentent une couleur bleue) et du blanc (eau + réactif) a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible modèle Cary-8454 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Le phénol total des échantillons ajustés a été calculé en utilisant l'absorbance réelle par rapport à une courbe standard d'acide gallique (Sigma-Aldrich Ltd) (20, 40, 60, 80, 100 µg/ml ; $r^2 = 0,994$) et exprimé en microgrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par mg ou mL d'extrait. Les résultats ont été exprimés en équivalent d'acide gallique (EAG) en g/kg de poids de fruit (g/kg FW).

6.4 Analyse de l'activité antiradicalaire

Les propriétés antiradicalaires des différents échantillons des jus (jus de pomme, betterave, gingembre, jus de carotte, jus de canneberge, jus de sureau, jus de baie sauvage, jus de betterave, jus de légumes) et des extraits (betterave, goji, graines de canneberge, lime, canneberge, açai, ananas, carotte, choux-fleurs, banane, herbe d'orge, herbe de blé, mangue, spiruline et choux-frisé) ont été évaluées selon Salmieri & Lacroix (2006). Cette méthode consiste à mesurer l'effet de la présence d'agents antioxydants contre les radicaux libres oxygénés et leurs sous-produits générés par l'électrolyse d'une solution saline (Tien et al., 2001).

10 mg d'échantillon solide des extraits a été dissout dans 10 mL d'eau purifiés puis 200 µL d'échantillon liquide ont été mélangés à 3 mL de NaCl 0,15 M. Le mélange a ensuite été inséré dans une cellule électrolytique en platine et électrolysé pendant 1 minute à un courant continu de 10 mA et 400 V à l'aide d'un générateur Bio-Rad (modèle 1000/500 ; Life Science Group, Hercules, CA, USA). Une aliquote de 200 µl de la solution obtenue a été mélangée à 2 mL de réactif DPPD (N,N-diéthyl-p-phénylènediamine, 2,5 % (W/V), Sigma-Aldrich Ltd, Oakville, ON, Canada). Les agents oxydants produits par l'électrolyse réagissent instantanément avec la DPPD et créent une couleur rose qui peut être détectée à 515 nm avec un spectrophotomètre UV-visible DMS 100S (Varian Canada Inc.). L'activité antiradicalaire correspond à la capacité de l'échantillon à empêcher la formation d'espèces oxydantes et à limiter l'oxydation de la DPPD.

$$\text{Piégeage (\%)} = [1 - [(A_{\text{sample}} - A(-)) / (A(+) - A(-))]] \cdot 100$$

Où A(échantillon) est l'absorbance de l'échantillon, A(-) représente l'absorbance du contrôle négatif et A(+) représente l'absorbance du contrôle positif. Le niveau de décoloration indique la capacité antiradicalaire des échantillons à piéger les radicaux libres. L'activité antiradicalaire d'une substance est généralement présentée en 3 niveaux : piégeage % $\geq 70\%$ implique une activité élevée, $40\% < \text{piégeage \%} < 70\%$ implique une activité normale, piégeage % $\leq 40\%$: activité faible ou inexistante.

Une courbe d'étalonnage a été créée (avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9916$) en mesurant le % de piégeage par rapport à des solutions connues de Trolox® ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique, Sigma-Aldrich Ltd, Oakville, ON, Canada), 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 et 4,0 mM pour déterminer l'activité antiradicalaire des échantillons. L'activité antiradicalaire a donc été mesurée en mM d'équivalent Trolox® par mL de jus et par 1g de poudre.

6.5 Analyse de la valeur nutritive

Le logiciel d'étiquetage alimentaire Genesis R&D (ESHA Research, Salem, OR) a été utilisé pour déterminer le contenu en nutriments des boissons selon les ingrédients utilisés dans chaque formulation développée. Ceci selon une base de données déjà enregistrée dans le logiciel (Shams et al., 2023).

6.6 Analyse de l'activité antibactérienne des extraits

Deux souches bactériennes Gram négatifs (*Escherichia coli* O157:H7 et *Salmonella Typhimurium* SL 1344 et deux bactéries Gram positifs (*Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 et *Listeria monocytogenes* 280323) (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada) ont été utilisées comme bactéries cibles dans les tests antimicrobiens. Avant chaque expérience, les cultures bactériennes ont été multipliées par deux cycles de croissance consécutifs de 24 heures dans un bouillon TSB ou BHI à 37°C (10^9 CFU/mL). Les cultures ont été diluées dans de l'eau peptonée à 0,1 % (Alpha Biosciences, Inc., Baltimore, MD, USA) pour obtenir une culture de travail de 10^6 UFC/mL.

Tous les extraits de fruits utilisés dans les formulations ont été testés pour leur éventuelle activité antibactérienne. Les poudres de fruits ont été traitées par irradiation UV-C à l'aide d'un système de lampes ultraviolettes F300S (Fusion UV System Inc., Gaithersburg, MD, USA), équipé d'un système de convoyage. 180 mg de chaque poudre de fruit ont été placés dans de grandes boîtes

de Pétri en verre et introduits dans la zone d'irradiation. Chaque passage dans la zone d'irradiation correspond à une dose de 5 kJ/m², avec un temps d'exposition de 30 secondes. Une concentration de 20 mg sur 100µL a été utilisée pour dissoudre les poudres d'extraits de fruits dans de l'eau distillée. Les jus liquides ont été utilisés avec 100 µL également pour chaque puits.

Le Deep-agar-Test a été employé comme méthode qualitative pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits naturels contre les 4 bactéries déjà mentionnées comme décrit par Bi et al. (2011) avec quelques modifications. La solution de bouillon Trypto Soy avec 0,75 % d'Agar a été préparée et autoclavée pendant 20 minutes à 121 °C. À 37°C, chacune des solutions a été inoculée avec 1,0 % (v/v) de bouillon TS (Trypto Soy Broth) contenant 10⁶ UFC/mL. 24 mL de bouillon inoculés ont été ajoutés à chaque boîte de pétri (95 mm x 15 mm) et ont été laissés à solidifier. Ensuite, trois puits (de la surface du gel vers le fond) ont été réalisés à l'aide d'une pipette de 7,0 mm et 100-µl de préparation d'extrait naturel ont été ajoutés à chaque puits d'Agar. Les plaques ont été incubées pendant 24 h à 37 °C et la zone d'inhibition a été mesurée en mm pour déterminer l'activité antimicrobienne contre les bactéries testées.

6.7 Analyse de la durée de vie des boissons

Les formulations préparées ont été pasteurisées à 63°C pendant 3 minutes et analysées pendant 50 jours de stockage à 4°C. Les analyses microbiennes ont été effectuées aux jours 1, 3, 6, 9, 14, 16, 30 et 50. Un millilitre de chaque échantillon a été prélevé aseptiquement et homogénéisé avec 9 mL d'eau peptonée pendant 1 min dans un tube stérile à l'aide d'un vortex. Chaque jour d'analyse, 100 µl de la dilution ont été incubés dans des boîtes de Trypto Soy Agar (TSA).

Le TSA a été utilisé pour le dénombrement de la microflore totale. Les plaques inoculées de TSA ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Le nombre des colonies (UFC) par millilitre a été compté et enregistré chaque jour de test de durée de conservation pendant toute la période de stockage à 4°C.

7 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

7.1 Analyse sensorielle

L'aspect, l'arôme, la saveur, la texture, l'arrière-goût et l'appréciation globale des boissons F1, F2, F3 et F4 ont été évalués avec une échelle hédonique de 1 à 9. Les moyennes de tous les résultats obtenus pour chaque attribut sont présentées dans le tableau 7.1. Le graphique radar ci-dessous (**Fig 7.1**) présente plus clairement les variations de chaque attribut en comparant entre les formulations. Plus la note est proche de 9, plus la boisson est appréciée par les panélistes.

Tableau 7.1 Attributs sensoriels de chaque boisson

	Aspect	Odeur	Goût	Texture	Arrière-goût	Appréciation globale
Formulation 1	7.24 ^{ab}	7.76 ^a	7.10 ^a	6.86 ^a	6.81 ^a	7.05 ^a
Formulation 2	6.71 ^b	6.21 ^b	5.26 ^b	7.16 ^a	5.74 ^b	5.95 ^{bc}
Formulation 3	7.39 ^a	7.13 ^a	6.42 ^a	7.42 ^a	6.50 ^{ab}	6.58 ^{ab}
Formulation 4	6.63 ^b	5.53 ^b	5.39 ^b	6.97 ^a	5.61 ^b	5.58 ^c

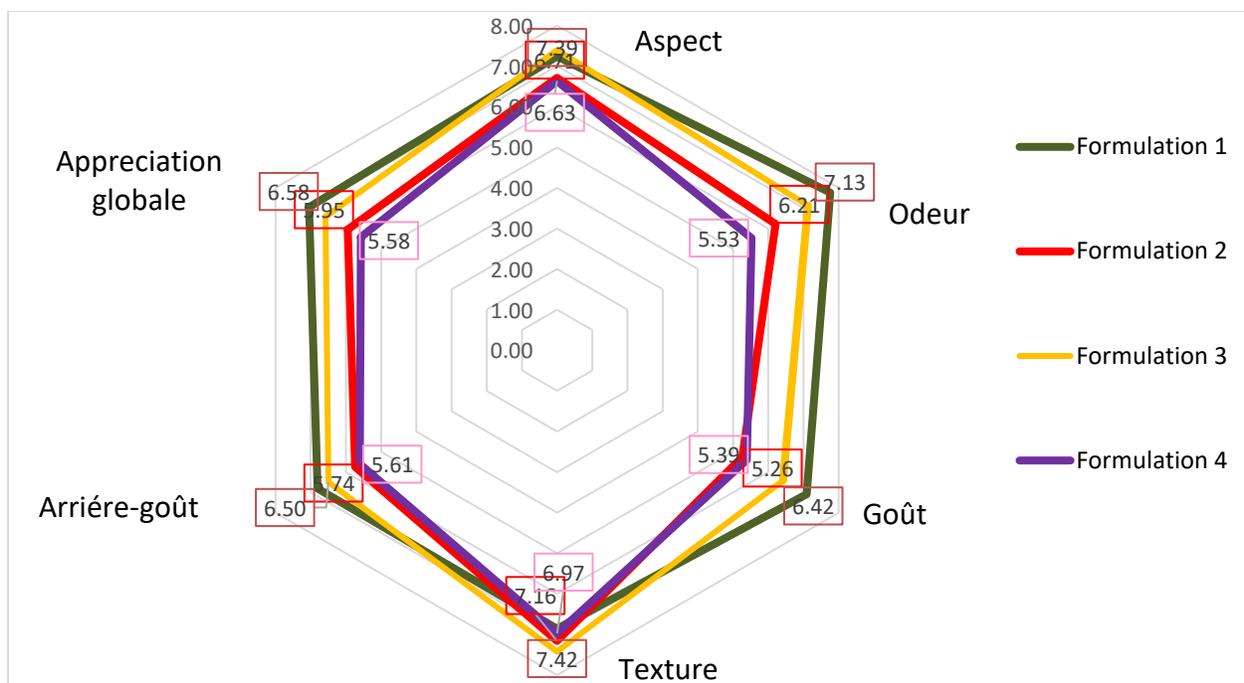


Figure 7.1 Graphique radar pour l'évaluation sensorielle des 4 boissons développées

Les résultats montrent qu'à l'exception de la formulation 4, les analyses sensorielles des formulations F1, F2 et F3 ont toutes montré une moyenne supérieure à 5,5/9 pour tous les attributs évalués (aspect, odeur, goût, texture, arrière-goût et appréciation globale). Il n'y a pas de différence significative entre les textures des 4 formulations. Cela est dû à l'utilisation de la même formule de base pour toutes les boissons. L'attribut le plus apprécié est l'arôme, avec plus que 7,7/9 pour la 1^{re} formulation, et le critère le moins apprécié est le goût de la formulation 4, avec 5,26 sur 9. L'aspect et la texture de toutes les préparations ont été évalués à plus de 6,6 sur 9. Pourtant, qu'il n'existe pas une différence significative entre les attributs (aspect, odeur, goût, texture, arrière-goût) de la formulation 2 et la formulation 4, la formulation 2 a été mieux souhaitée globalement que la formulation 4. Ceci s'explique par les mêmes ingrédients utilisés pour les deux boissons sauf que les composants de la 2^e formulation ont été dissous dans le jus de canneberge au lieu de l'eau. D'où le jus présente une meilleure solubilisation que l'eau. La formulation 1 à base d'extraits de fruits a été la plus appréciée pour tous ces attributs surtout avec l'odeur le plus appréciée (7,76). Cela peut être dû à sa couleur verte qui n'est pas appréciée pour tous les consommateurs alors que l'arôme fruité a été fortement apprécié. En outre, cette préparation se distingue nettement des autres boissons par l'arrière-goût le plus apprécié (6,81) et l'appréciation globale la plus élevée de 7,05/9. La deuxième formulation la plus appréciée est la formulation 3, à base de jus de carotte, avec un meilleur aspect par rapport à F1, avec 7,39.

L'aspect, l'odeur, le goût et la texture ont été tous appréciés avec plus que 6,4 et appréciés également comme la 1^{re} formulation. Seulement, l'arrière-goût et l'appréciation globale ont été moins appréciés que F1. La dernière boisson appréciée est la formulation 4 avec une moyenne d'appréciation globale de 5,58, ce qui ne se traduit par "ni j'aime ni je n'aime pas".

7.2 Analyse de stabilité de phosvitine

La phosvitine est une phosphoprotéine particulièrement intéressante en raison de ses propriétés fonctionnelles et biologiques ayant un poids moléculaire compris entre 37 et 45 kDa (Duffuler et al., 2020). Afin de pouvoir évaluer l'effet des traitements, y compris la sonication, la microfluidisation et la pasteurisation, sur la stabilité de la phosvitine, une analyse SDS-PAGE a été réalisée. Quatre échantillons différents ont été ajoutés dans le gel; la première ligne présente les standards moléculaires, la deuxième ligne le contrôle de la phosvitine, la troisième ligne la phosvitine après sonication, la quatrième ligne de la phosvitine après microfluidisation, la cinquième ligne la phosvitine extraite de la formulation après la pasteurisation. Les résultats sont présentés dans la **Fig 7.2**. L'absorbance des bandes et leurs poids moléculaires sont présentés dans le **tableau 6.1**.

La principale bande protéique détectée dans les quatre échantillons analysés a été identifiée comme étant la phosvitine. Cette phosphoprotéine se trouve dans les micelles des granules de jaune d'œuf, sans contact direct avec l'eau. La dilution de la solution de jaune d'œuf à un pH de 4,0 ou 5,0 entraîne la déformation des granules, la solubilisation des protéines des micelles et la libération de la phosvitine (Ko et al., 2011). Les 3 bandes; phosvitine contrôle, phosvitine après sonication et phosvitine après microfluidisation ont été détectées avec un poids moléculaire de 34 kDa, 35 kDa et 36 kDa respectivement. Cette augmentation pourrait s'expliquer par les traitements qui ont légèrement affecté le poids moléculaire de la protéine, mais elle reste encore stable dans la même gamme de poids moléculaire entre 37 et 45 kDa. Seule la bande de phosvitine après extraction de la formulation a eu un poids moléculaire d'environ 40 kDa.

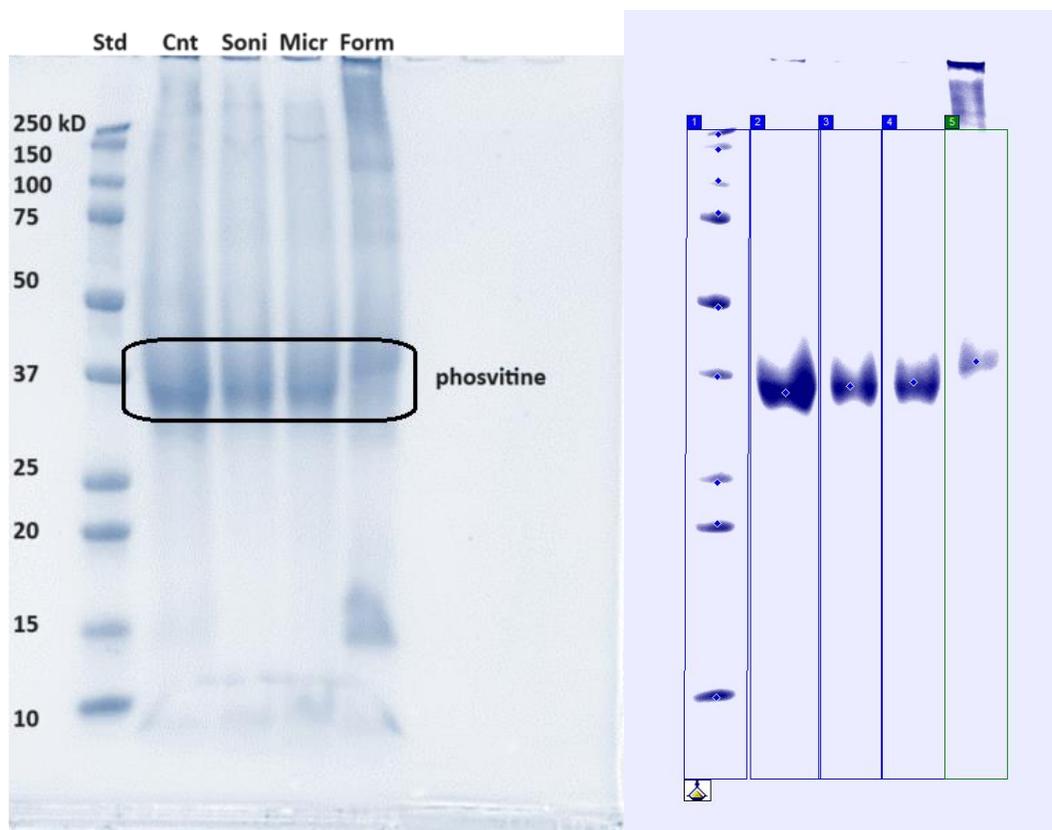


Figure 7.2 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE de la phosvitine (1. Standard moléculaire 2. Phosvitine control 3. Phosvitine avec sonication 4. Phosvitine avec la microfluidisation 5. Phosvitine extraite de formulation)

Tableau 7.7.2 Absorbance des bandes dans le gel électrophorèse et leur poids moléculaire

	Calib Vol(mg)	Bande %	PM
Ligne2	1	100	34.326
Ligne 3	0.8	100	35.354
Ligne 4	0.74	100	35.986
Ligne 5	0.6	100	40.05

7.3 Analyse de teneur en phénols

La teneur phénolique totale (TP) de chaque échantillon des extraits a été déterminée avec la méthode Folin – Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) avec une absorbance mesurée à 760 nm.

Ce réactif est composé d'un mélange de phosphomolybdate et d'un tungstate de sodium qui oxydent les phénols et le réduisent en bleu oxyde de tungstène et de molybdène. La teneur totale en composés phénoliques dans chaque échantillon est présentée dans la **Fig 7.3**. La teneur en phénols de chaque formulation a été évaluée aussi **Fig 7.4**.

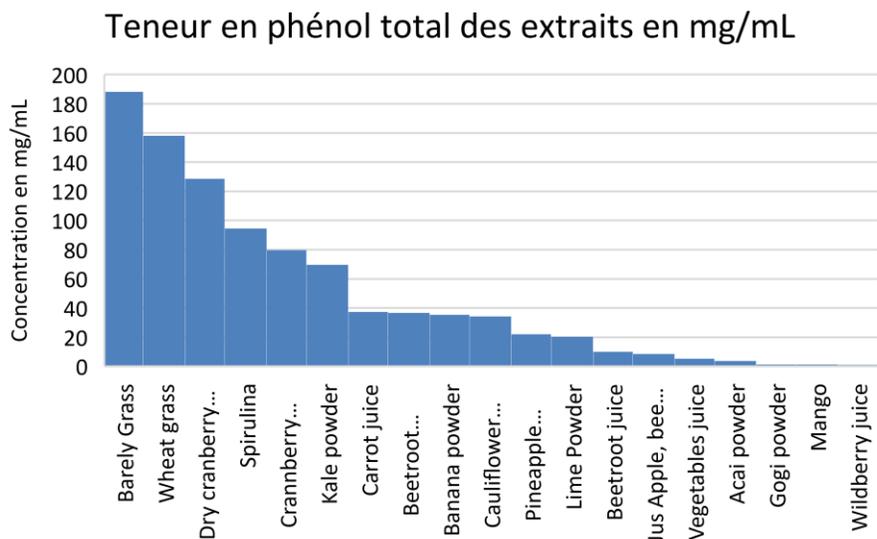


Figure 7.3 Teneur en phénols totaux des extraits en mg par mL

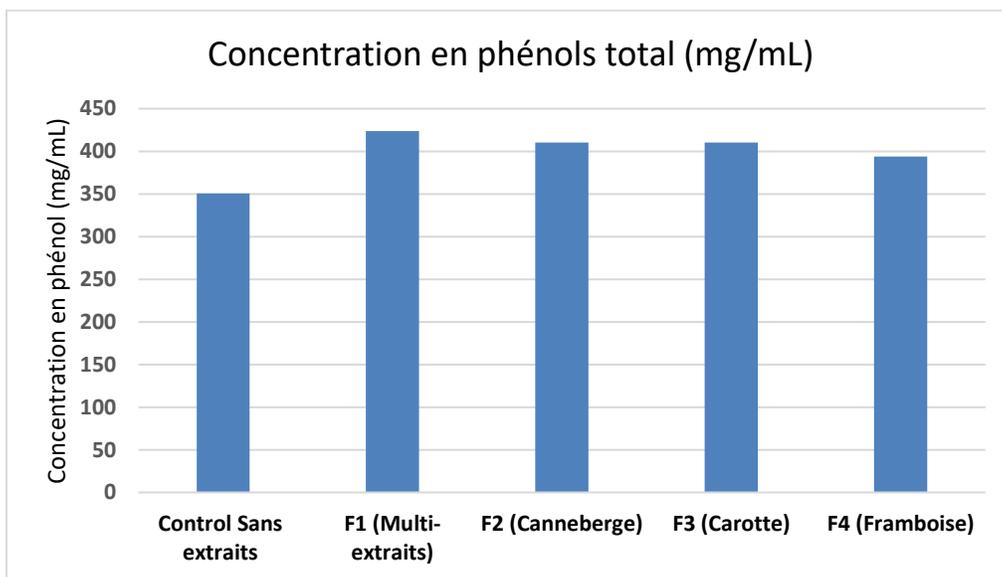


Figure 7.4 Histogramme des teneurs en phénol des formulations développées

La poudre d'herbe d'orge et la poudre d'herbe de blé sont extrêmement riches en phénols avec une concentration entre 160 et 185 mg GAE/mL. La spiruline, la poudre de graines de canneberge

sont également très concentrées avec plus de 90 mg GAE/mL. La poudre de canneberge et de choux frisée est dans l'ordre de 70 à 80 mg GAE/mL. Le jus de carotte, la poudre de betterave, la poudre de banane et la poudre de chou-fleur ont une concentration supérieure à 35 mg GAE/mL. La teneur de poudre de lime et la poudre d'ananas sont également concentrées en composés phénoliques avec environ 20 mg GAE/mL. Le jus de betterave, le jus de légumes, le jus de pomme-betterave-gingembre ont été détectés avec une concentration entre 5 et 10 mg GAE/mL. Enfin, la poudre d'açaï, la poudre de goji, la poudre de mangue, la poudre de baies sauvages avec une concentration entre 1,17 et 3,67 µg GAE/mL

Les concentrations en phénols des formulations ont montré des teneurs légèrement différentes entre la formulation contrôle, les formulations 1, 2, 3 et 4. La formulation contrôle a révélé une valeur élevée de 330 mg GAE/mL. La formulation 1 à base d'extrait de fruits et légumes avec sa composition en ananas, banane, spiruline, herbe de blé, herbe d'orge, chou frisé, et mangue a montré une forte teneur en polyphénols avec environ 410 mg GAE/mL. La formulation 2 avec sa teneur en jus de canneberge, chou-fleur, carotte, poudre de canneberge, betterave et lime a révélé une teneur en polyphénols de 386 mg GAE/mL similaire à la formulation 3 avec sa teneur en jus de carotte, chou-fleur, poudre de carotte et lime. La formulation 4 avec sa composition en chou-fleur, carotte, canneberge, betterave et lime a montré une concentration en phénols totaux d'environ 394 mg GAE/mL.

7.4 Analyse de l'activité antioxydante

Les résultats obtenus sont présentés dans la **Fig 6.5** ci-dessous. Les propriétés antioxydantes présentes dans les extraits naturels en poudre et en jus ont montré des propriétés antioxydantes importantes avec des concentrations variant de 3,4 à 23,6 mM eq Trolox. Une activité antioxydante élevée qui dépasse 70 % a été observée dans le jus de baies sauvages, le jus de canneberge, la poudre de baies sauvage et la poudre de graines de canneberge avec respectivement 23,58; 21,89; 17,8 et 17.2 mM eq Trolox. Une activité moyenne entre 40 % et 70 % a été observée avec la poudre de chou-fleur, la poudre de banane, la poudre de betterave, le jus de légumes, le jus de sureau, la poudre de lime, la poudre de chou frisé, le jus de carotte et le jus de pomme, betterave et gingembre qui présentent une concentration comprise entre 11,2 et 16,5 mM eq Trolox. Cependant, le jus de betterave, la poudre d'açaï, la spiruline, la poudre d'herbe d'orge, de canneberge, d'herbe, de blé, goji, carotte, mangue et ananas présente une activité faible (inférieure à 40 %) avec des concentrations variant de 3.6 à 8.9 mM eq Trolox.

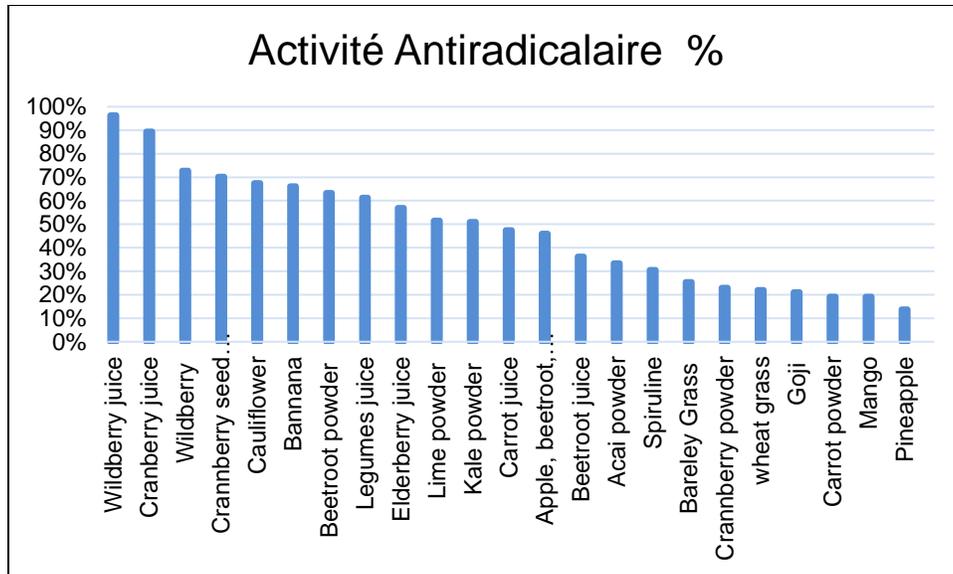


Figure 7.5 Activité antiradicalaire des extraits en poudre et des jus en pourcentage

7.5 Analyse de la valeur nutritive

L'analyse des valeurs nutritives des quatre formulations développées a été déterminée par le logiciel Genesis. À travers une base de données, ce logiciel a pu générer les tableaux nutritifs suivants **Tableaux (2, 3, 4 et 5)**.

Toutes les formulations proposées ont atteint l'objectif d'être une boisson riche en protéines avec des teneurs en protéines variant de 10 à 14 g de protéines par 150 mL. La teneur en protéines la plus élevée a été observée avec la formulation 1 à base d'extraits de fruits avec une teneur en protéines de 14g. Simultanément, dans un ordre décroissant, la formulation 2 et 3 avec 11 g et enfin la formulation 4 avec 10 g de protéines par 150 mL. Les formulations ont montré des teneurs variables en minéraux et vitamines. La valeur énergétique des boissons varie entre 190 et 280 calories.

Tableau 7.3 Valeur nutritive de la Formulation 1 (à base de multiextraits végétaux et de saveur de mangue).

Valeur nutritive – Formulation 1 pour (150 mL)		
Teneur en		% valeur quotidienne*
Calories	230	
Lipides	13 g	17 %

Saturés	3.5 g	18 %
Sodium	130 mg	6 %
Potassium	327 mg	9.5 %
Glucides totaux	26 g	9 %
Protéines	14 g	
Vitamines et minéraux*		
Vitamine A 20 %	Vitamine B ₆ 6 %	Vitamine D ₃ 20 %
Riboflavine 8 %	Choline 15 %	Fer 10 %
Molybdène 10 %	Acide folique 4 %	Calcium 10 %
Vitamine B ₁₂ 15 %	Biotine 20 %	Vitamine K 8 %
Phosphore 6 %	Vitamine C 4 %	Sélénium 20 %

Tableau 7.4 Valeur nutritive de la Formulation 2 (à base de jus de canneberge et de saveur de framboise).

Valeur nutritive – Formulation 2 pour (150 mL)		
Teneur en		% valeur quotidienne*
Calories	280	
Lipides	10 g	13 %
Saturés	1.5 g	8 %
Sodium	210 mg	9 %
Potassium	327 mg	9.5 %
Glucides totaux	45 g	16 %
Protéines	11 g	
Vitamines et minéraux*		

Vitamine A 120 %	Vitamine B ₆ 25 %	Vitamine D 6 %
Riboflavine 30 %	Choline 20 %	Thiamine 15 %
Niacine 25 %	Acide folique 8 %	Calcium 10 %
Zinc 10 %	Cuivre 10 %	Vitamin K 30 %
Phosphore 15 %	Magnésium 10 %	Sélénium 35 %
Fer 10 %	Potassium 20 %	Vitamine C 25 %

Tableau 7.5 Valeur nutritive de la Formulation 3 (à base de jus de carotte et de saveur de pêche).

Valeur nutritive – Formulation 3 pour (150 mL)		
Teneur		% valeur quotidienne*
Calories	220	
Lipides	12 g	15 %
Saturés	2 g	10 %
Sodium	190 mg	8 %
Potassium	327 mg	9.5 %
Glucides totaux	24 g	9 %
Protéines	11 g	
Vitamines et minéraux*		
Vitamine A 60 %	Vitamine B ₆ 6 %	Vitamine D 6 %
Riboflavine 25 %	Choline 20 %	Vitamine B ₁₂ 15 %
Niacine 20 %	Acide folique 4 %	Calcium 6 %
Acide panthoténique 20 %	Biotine 25 %	Molybdène 15 %
Phosphore 8 %	Magnésium 4 %	Sélénium 35 %

Fer 6 %	Potassium 8 %	Vitamine C 2 %
---------	---------------	----------------

Tableau 7.6 Valeur nutritive de la Formulation 4 (saveur Framboise).

Valeur nutritive – Formulation 4 pour (150 mL)		
Teneur		% valeur quotidienne*
Calories	190	
Lipides	12 g	15 %
Saturés	2 g	10 %
Sodium	140 mg	6 %
Potassium	191 mg	4 %
Glucides totaux	17 g	6 %
Protéines	10 g	
Vitamines et minéraux*		
Vitamine A 6 %	Vitamine B ₆ 6 %	Vitamine D 6 %
Riboflavine 25 %	Choline 20 %	Vitamine B ₁₂ 15 %
Fer 6 %	Acide folique 4 %	Calcium 6 %
Acide panthoténique 20 %	Biotine 25 %	Molybdène 15 %
Phosphore 6 %	Magnésium 6 %	Sélénium 35 %
Vitamine C 2 %	Potassium 8 %	

7.6 Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits

De nombreuses plantes contiennent des composés ayant une activité antimicrobienne et présentent un bon potentiel de conservation naturelle. Ces bios préservateurs ont la capacité d'améliorer la sécurité alimentaire, prolonger la durée de conservation et améliorer la qualité globale des produits alimentaires (Rahman, 2007).

Pour cela, 23 extraits ont été analysés; 16 en poudre (extrait d'acérola, poudre de jus d'açaï, extrait d'aronia, carotte, chou-fleur, banane, banane bio, acide L-Tartrique, poudre de jus de mangue bio, chou frisé, herbe de blé, spiruline, poudre de jus d'ananas, poudre de jus de betterave, poudre de bleuet, poudre de bleuet sauvage naturelle) et 7 jus (jus de baies sauvages, jus de betterave, jus de sureau, jus de canneberge, jus de carotte, jus de pomme de terre, betterave et gingembre, jus de légumineuses) avec Deep Agar Test. Seul l'acide L tartrique extrait des raisins a montré une activité antimicrobienne importante. Les photos du test de gélose en puits profond ont montré la présence d'une zone antibactérienne autour de l'acide L tartrique contre toutes les bactéries testées *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus Aureus*, *Listeria Monocytogenes* avec des zones d'inhibition de 21,28 mm; 32,87 mm; 30,56 mm; 30,64 mm respectivement **Fig 7.7**. Cet extrait est utilisé comme conservateur et régulateur de pH dans la formulation des boissons.

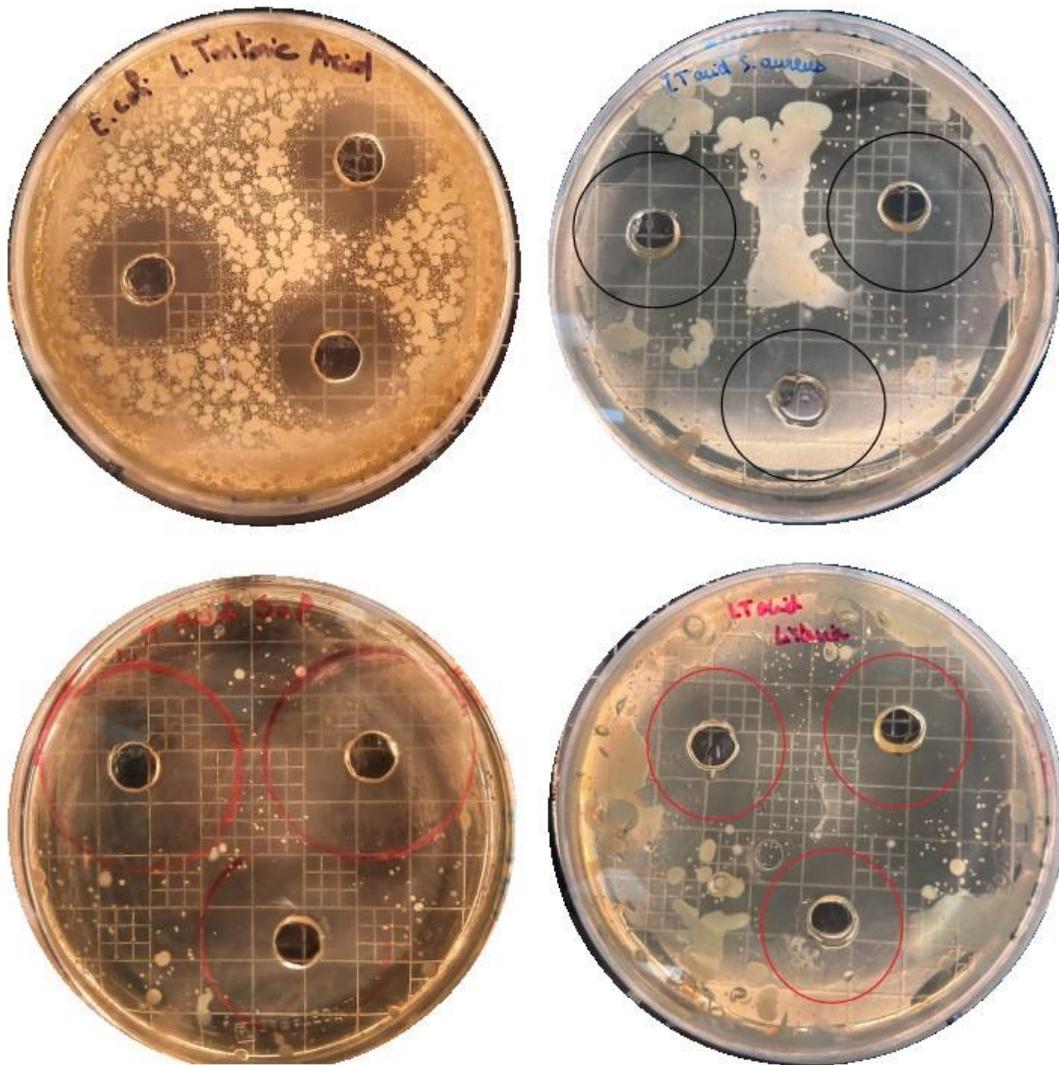


Figure 7.6 Activité antibactérienne de l'acide tartrique par le Deep Agar Test contre 4 bactéries (*Escherichia Coli*, *Staphylococcus. Aureus*, *Salmonella Typhimurium* et *Listeria Monocytogènes*)

7.7 Évaluation de la durée de vie de boisson

La stabilité microbiologique de la boisson contrôle et les quatre formulations développées avec des saveurs différentes ont été analysées pendant 50 jours de stockage à 4 °C (Fig 7.8). Les analyses microbiennes ont été effectuées aux jours 0, 3, 6, 9, 14, 16, 24, 30, 35, 37, 40, 43, 46 et 50.

La gélose TSA (Trypto Soy Agar) a été utilisée pour le dénombrement de la microflore totale pour chaque prélèvement. Les plaques inoculées ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Le taux de croissance de la microflore totale a été calculé sur l'ensemble de la période de stockage.

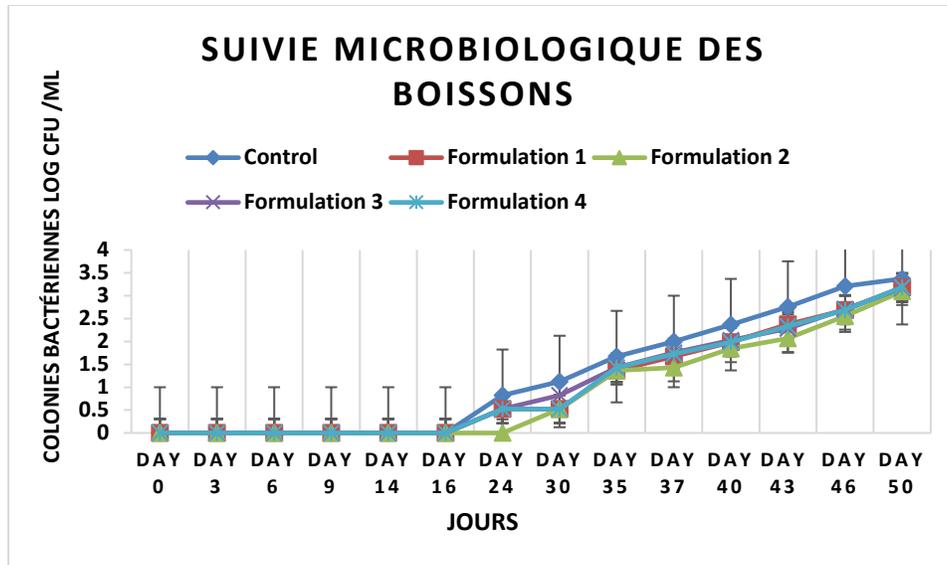


Figure 7.7 Durée de conservation de contrôle et des 4 formulations testées par rapport au contrôle pendant 50 jours de stockage à 4°C

Toutes les formulations y incluant le contrôle ont pu dépasser 16 jours de stockage à 4°C sans présence d'aucune colonie bactérienne. La formulation contrôle se différencie légèrement d'autres formulations avec un profil plus susceptible aux développements bactériens. De légères variations ont été enregistrées entre les jours 24 et 30. La formulation 2 se démarque par un profil plus résistant au développement bactérien avec un maximum de 3,01 log CFU/mL au 50^e jour alors que les formulations 1, 3 et 4 présentent presque le même profil microbiologique au cours des 50 jours de suivi avec un log CFU entre 3,16 et 3,18.

8 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

8.1 Analyses des paramètres de réponse de stabilité pour optimiser la composition des émulsions

L'analyse par la méthodologie de réponse de surface (RSM) a permis de contrôler les effets des paramètres indépendants (concentration en protéines d'œuf, volume d'huile, concentration en hydrocolloïdes et pH) sur les réponses de stabilité des émulsions (taille des particules, potentiel zêta, indice de polydispersité et viscosité). Trente expériences ont été réalisées pour les formulations à base de protéines de blanc et jaune d'œuf, tandis que 25 expériences ont été réalisées pour les formulations à base de protéines d'œuf entier. Un plan composite central à trois niveaux a été utilisé pour préparer les trois types d'émulsions de base (EPBB-1, EPBB-2, EPBB-3) dans un volume final de 150 mL.

Un modèle quadratique, suggéré par le logiciel, a été utilisé pour analyser et ajuster les données expérimentales. Cela a été fait par le biais d'une analyse de régression multiple. Les niveaux de signification pour EPBB-1 et EPBB-2 sont fournis en termes de leurs modèles de régression quadratique respectifs. Les résultats montrent que les valeurs d'inadéquation pour le PDI et la viscosité n'ont pas d'impact significatif sur les émulsions stabilisées ($p > 0,05$). Cela indique une fiabilité adéquate du modèle pour la prédiction des réponses des 3 émulsions. Selon Bei et al. (2009), une inadéquation non significative montre l'adéquation du modèle, car une inadéquation significative implique que le modèle ne prend pas en compte certains facteurs liés à la corrélation entre la régression et les variables de réponse.

En comparaison avec le potentiel zêta, PDI, z-average et viscosité pour les différentes émulsions présentes un manque notable de valeur d'ajustement. Néanmoins, les paramètres statistiques tels que R^2 , R^2 ajusté et le coefficient de variation indiquent un modèle acceptable (Rosa et al., 2007). Le coefficient de détermination multiple R^2 des modèles pour les variables dépendantes (Z-average, PDI, potentiel zêta et viscosité) a montré des valeurs satisfaisantes pour toutes les émulsions (0.96, 0.96, 0.88, 0.97), (0.9, 0.76, 0.7, and 0.89) et (0.97, 0.96, 0.88, 0.96) pour EPBB1, EPBB-2 et EPBB-3 respectivement. Ce qui a finalement confirmé que les résultats s'adaptent suffisamment bien au modèle.

Des valeurs R^2 ajusté acceptables pour le z-average, PDI, le potentiel zêta et la viscosité ont été enregistrés. Entre 0,7 et 0,9 pour EPBB-1 et EPBB-2, alors que c'est entre 0,4 et 0,8 pour EPBB-3, ce qui démontre la pertinence des modèles ajustés et la forte corrélation entre les données

prédites et les données réelles surtout pour EPBB 1 et 2. En outre, EPBB-1 a présenté des modèles précis et reproductibles, comme en témoigne un coefficient de variation (CV) de zêta potentiel de EPBB-3 ne dépassant pas 11,71 %.

8.2 Effet des variables sur la taille moyenne des particules

L'étude de la taille des particules est cruciale pour la stabilité physique et les propriétés organoleptiques de la formulation de l'émulsion, car la taille des particules est inversement proportionnelle à la stabilité de l'émulsion. En effet, des particules de plus petite taille conduisent à une meilleure stabilité de l'émulsion, ce qui présente en effet un facteur crucial (McClements, 2015). Plusieurs travaux de recherche antérieurs ont montré que le contrôle de la taille des particules permet non seulement d'améliorer la stabilité, mais minimise également la séparation gravitationnelle des émulsions (Huang et al., 2001; Hunter et al., 2008; Mirhosseini et al., 2008).

L'étude a utilisé l'analyse statistique pour déterminer l'impact des variables indépendantes sur la taille des particules dans les différentes EPBBs. Les résultats indiquent que la corrélation entre la concentration de AH et la concentration des protéines a un effet significatif qui affecte la taille des particules. Par conséquent, la taille des gouttelettes a diminué de manière significative dans les conditions extrêmes de teneur élevée ou faible en AH et en protéines.

Les résultats montrent aussi que le type de protéines d'œuf contribue différemment à la taille des particules. L'ajout de AH à des concentrations élevées dans les émulsions H/E a un effet différent selon le type de protéines d'œuf ajoutées. En effet, une forte concentration de AH avec une faible teneur en protéine de blanc d'œuf peut entraîner une diminution de la taille des gouttelettes. Alors qu'une augmentation de teneur en AH avec une augmentation de teneur en protéines d'œuf entier peut aussi entraîner une diminution de taille des particules. Ce phénomène est attribué à la liaison efficace entre les émulsifiants et l'interface de polysaccharides, ce qui réduit la taille des gouttelettes. La charge portée par l'AH rend les émulsions sensibles aux changements de pH.

L'AH est composé de groupes arabino-galactaniques ramifiés qui s'attachent au squelette polypeptidique hydrophobe. Les groupes d'arabino-galactane hydrophiles empêchent l'agrégation des gouttelettes par répulsion électrostatique et stérique en se fixant à la solution, tandis que la contrepartie hydrophobe se fixe à la surface des gouttelettes (Buffo et al., 2001; Gharibzahedi et al., 2012). Des études ont suggéré que l'hydrocoloïde tensioactif interagit avec les protéines d'œuf chargé négativement, ce qui affecte la taille des particules, car ils sont en concurrence pour l'adsorption à l'interface pendant l'émulsification (Garti, 1999). Les

polysaccharides ont tendance à s'adsorber plus lentement que les protéines globulaires pendant l'homogénéisation, de sorte de former des plus petites gouttelettes (McClements, 2015).

Cependant, l'émulsion à base de protéines de jaune d'œuf a montré une plus large gamme de taille de gouttelettes allant de 250 nm dans un pH neutre jusqu'à 1,6 micromètre dans un pH acide. Cela montre que les fluctuations du pH peuvent compromettre la stabilité des émulsions, qui pourrait être due à l'agrégation des protéines d'œuf dans un pH autour de leur point isoélectrique. En effet, dans des pH 3 à 4, la protéine perd sa forme globulaire compacte et se déploie en une structure plus étendue. Ce dépliage expose les régions hydrophobes de la protéine, ce qui conduit à la formation des particules de plus grande taille et l'agrégation en raison de la diminution de la répulsion électrostatique (Strixner & Kulozik, 2011).

En outre, l'interaction entre le pH et le volume d'huile a eu aussi un effet quadratique sur la taille des particules de EPBB-1. La grande taille des particules peut être attribuée au faible pH, qui a provoqué l'adhésion des gouttelettes d'huile à la surface des particules de l'émulsion, formant une émulsion grossière de particules d'huile dans la solution. En conséquence, la répulsion électrostatique entre les gouttelettes d'huile diminue et la floculation peut se produire en raison de la variation du pH qui affecte l'émulsion stabilisée autour de son point isoélectrique (pI). Ces résultats ont également été rapportés par de nombreuses études (Charoen et al., 2011; Dickinson et al., 1991; McClements, 2015).

8.3 Effet des variables sur l'indice de polydispersité

L'effet du pH sur l'indice de polydispersité a été plus clair avec EPBB-1, en effet un pH plus neutre peut réduire la polydispersité des particules alors qu'un pH plus acide conduit inversement à une valeur de PDI plus élevée allant jusqu'à 1. En outre, le PDI a été légèrement réduit en présence d'une forte concentration d'AH à un pH faible. La combinaison entre pH et volume d'huile a montré un effet significatif sur la dispersion des gouttelettes de EPBB-2. En effet, une teneur en huile moyenne de 7,5 jusqu'à 9 mL avec un pH entre 5 et 6 peut conduire à une valeur optimale de PDI d'environ 0.2. Alors qu'en faible pH et faible teneur en huile, le PDI augmente jusqu'à 1.1. Le PDI était largement affecté par les variations de pH en EPBB-1 et 2, cela peut être lié à la nature chargée et hydrophile, non seulement de la surface de polysaccharide, mais aussi, les charges portées par les différentes protéines d'œuf.

Quoique, la combinaison entre AH et sa teneur en protéine a montré un effet pertinent sur l'indice de polydispersité de EPBB-3. Ainsi, une valeur optimale de PDI (0,2) a été obtenue avec une teneur moyenne de AH de 11,25 g avec une teneur maximale en protéine jusqu'à 8 g.

L'effet positif de l'AH sur la réduction du PDI a été discutée par (Gharibzahedi et al., 2012), ce qui pourrait être le résultat de l'activité émulsifiante de l'hydrocolloïde. En raison de l'activité de surface plus élevée des protéines par rapport aux émulsifiants à base de polysaccharides, l'effet de la concentration en protéines sur l'homogénéité des gouttelettes peut être abordé. De telles interactions basées sur les conditions conduisent à une compétition entre la protéine de jaune d'œuf et l'AH pour s'adsorber sur la surface des gouttelettes en tant qu'émulsifiant. Par conséquent, l'effet linéaire de la concentration en poudre d'œuf et l'effet de son interaction avec l'AH sur le PDI de EPBB-3 peuvent être expliqués (Raikos et al., 2017).

8.4 Effet des variables sur la charge des particules (zêta-potentiel)

Bien que des recherches antérieures aient rapporté que la charge électrique (potentiel zêta) des gouttelettes d'émulsion était fortement affectée par la concentration d'AH (Mirhosseini et al., 2008), les résultats obtenus ne montrent pas d'interaction claire entre l'AH et les protéines pour créer un effet remarquable sur la déviation du potentiel zêta. Cependant, il y'a un effet direct de la concentration en protéines sur la charge des particules.

La teneur en AH a augmenté la charge de surface négative des gouttelettes, ce qui conduit par la suite à l'augmentation de la charge négative du potentiel zêta. Ce phénomène a été fortement observé surtout avec EPBB-1. En l'absence de protéines d'œuf, des valeurs fortement négatives du zêta sont observées en raison de la charge négative inhérente à l'AH (Akhtar et al., 2006; Charoen et al., 2011; Shams et al., 2023). Cependant, une augmentation de la concentration en protéines d'œuf conduit à une négativité moindre des valeurs zêta parce qu'il y a plus de protéines chargées positivement, ce qui corrobore avec les conclusions de Nielsen et al. (2013).

Le potentiel zêta des émulsions peut être influencé aussi par l'interaction entre l'AH et le pH, car les changements de pH modifient la charge de la protéine. Lorsque les concentrations de H⁺ sont faibles (pH >> pI), les groupes carboxyles se chargent négativement (-COO⁻), tandis que les groupes aminés restent neutres (-NH₂), ce qui crée une charge protéique nette négative et vice versa. Au point isoélectrique (pI), il existe un équilibre entre les groupes chargés positivement et négativement sur les protéines, de sorte qu'aucune charge nette n'existe (Charoen et al., 2011).

8.5 Effet des variables sur la viscosité des émulsions

La viscosité a été significativement affectée par les teneurs en protéines et la concentration en AH. Avec l'augmentation simultanée des concentrations en protéines et en AH, la viscosité de l'émulsion a augmenté pour atteindre 3 000 CP. Cela pourrait s'expliquer par la teneur élevée en protéines d'œuf et d'AH, qui a saturé la solution et sa capacité à dissoudre les particules. Cela est probablement lié à la formation d'une connexion solide de carbone entre l'AH et les protéines de l'œuf, créant ainsi une structure complexe. Ce phénomène a également été confirmé par Shi et al. (2023) selon laquelle l'ajout de polysaccharide tel que la gomme xanthane a augmenté la viscosité des échantillons. Mirhosseini et al. (2008) ont également signalé que des concentrations élevées de gomme xanthane et de gomme arabique présentaient une viscosité apparente élevée. Cela pourrait être dû aux charges opposées entre la protéine de l'œuf et la gomme xanthane, qui créent des interactions électrostatiques élevées et génèrent des agrégats de particules qui remplissent la structure du réseau. Simultanément, un polysaccharide, à forte concentration, peut produire une structure de réseau plus ferme mécaniquement dans la phase continue, augmentant ainsi la viscosité du système (Z. Huang et al., 2022).

En plus de la concentration en protéines, la quantité d'huile dans la formulation EPBB-2, a également fortement influencé la viscosité. La viscosité la plus élevée (2000 CP) a été détectée lorsque la concentration en protéines et la quantité d'huile étaient élevées. Par conséquent, il convient d'optimiser la coordination entre les deux variables afin d'obtenir une valeur de viscosité optimale.

L'augmentation simultanée de la concentration en protéines rend une solution visqueuse atteignant presque 1500 cP ce qui est encore dans la norme acceptable. Ainsi, une viscosité élevée (plus de 2000cP) peut conduire à l'obstruction des canaux du processus de microfluidisation.

Toutes les EPBB contenant une forte concentration d'AH et de protéines ont révélé une viscosité élevée. Cela confirme que l'AH a formé une structure solide avec toutes les protéines de l'œuf, créant ainsi une solution visqueuse.

8.6 Compositions optimales des émulsions

Des procédures d'optimisation numérique et graphique ont été adaptées dans le logiciel Design Expert pour obtenir une composition optimale des ingrédients pour les trois EPBB. Même si les émulsions optimales suggérées ont été générées via le tracé des données RSM, il a fallu trouver

un compromis pour optimiser les 4 réponses (taille des particules, PDI, potentiel zêta et viscosité) en même temps. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les valeurs expérimentales et prédites ($p > 0.05$), ce qui indique la bonne adéquation des modèles présentés.

Les valeurs optimales montrent que EPPB-2 nécessite une teneur en AH de 13,69 g et un volume d'huile de 10,5 mL avec un pH de 5,7 pour des conditions de stabilité optimales. Cependant, EPBB-1 nécessite un volume d'huile moins important 6,87 pour atteindre une meilleure stabilité souhaitée de 0,8. Néanmoins, l'EPBB-3 a montré la stabilité la plus souhaitée avec une teneur en AH la plus faible (11,57g) et la teneur en protéines la plus élevée (8g). Ces résultats confirment que les poudres de protéines comme le blanc d'œuf, le jaune d'œuf ou l'œuf entier ont une structure protéique différente qui réagit différemment avec certains paramètres comme le pH, l'huile et l'AH, ce qui crée des réponses différentes en termes de stabilité.

Ce résultat impressionnant peut être attribué principalement aux hydrocolloïdes adsorbant qui agissent comme des émulsifiants fiables en présentant une charge négative et en formant des films autour des gouttelettes (Dickinson et al., 1991a). Ces actions se conjuguent pour retarder la séparation des phases, ce qui conduit à une émulsion plus stable, assurant ainsi une conservation durable, ce qui est vital dans les applications de l'industrie alimentaire où la durée de conservation est un facteur important.

Les recherches futures pourront explorer l'effet de différentes méthodes de pasteurisation sur la stabilité et les propriétés sensorielles de la boisson. Une analyse plus approfondie pourrait être menée pour trouver des extraits de fruits ayant des propriétés antimicrobiennes plus élevées, ce qui aurait également un impact favorable sur les propriétés sensorielles de la boisson.

8.7 Suivre de stabilité des émulsions durant 50 jours

La charge des particules des EPBB a présenté une variation dynamique au cours du temps, mais ils ont tous tendance à se stabiliser autour de -30mV après 25 jours de stockage, ce qui suggère une stabilité constante de la charge des particules des EPBB pendant 30 jours de stockage. En ce qui concerne l'indice de polydispersité (PDI), EPBB-1 et EPBB-2 ont d'abord présenté une légère variation le troisième jour dans des directions opposées, puis ils ont eu tendance à se stabiliser au cours du temps. Cependant, une différence notable est apparue entre EPBB-2 et EPBB 1 et 3 à la fin de la période de 30 jours, EPBB-2 se stabilisant à un PDI de 0,5, tandis que EPBB-1 et EPBB-3 se stabilisaient à 0,4. Cette variabilité presque uniforme de la taille des

particules dans l'émulsion pourrait être un indicateur caractéristique d'une émulsion stable et non floculé.

En outre, la taille moyenne des particules des EPBBs a connu des variations mineures au cours des cinq premiers jours avant de se stabiliser à environ 400 nm pour EPBB-1 et EPBB-3. Néanmoins, EPBB-2 a montré une stabilité autour de 900 nm, indiquant une taille de particules plus importante. Cette variance pourrait potentiellement être attribuée aux protéines présentes dans le blanc d'œuf, telles que l'ovalbumine, connue pour coaguler plus facilement et former des particules plus grosses. Cette observation s'aligne avec le PDI plus élevé détecté pour EPBB-2 par rapport à EPBB-1 et EPBB-3, soulignant l'influence de la composition protéique sur la taille et la distribution des particules au sein de l'émulsion.

8.8 Optimisation de processus de microfluidisation

La force de cisaillement générée dans la chambre d'interaction pendant le processus de microfluidisation a pour but de rompre les liaisons intermoléculaires de dissolution et l'interaction hydrophobe afin de former des émulsions plus stables (Ozturk & Turasan, 2021). En général, les émulsions dont le potentiel zêta se situent dans la plage interne de [-30 mV ; 30 mV] peuvent être plus sujettes à la coalescence, à la floculation ou à la séparation des phases ; un faible PDI (de l'ordre de 0,2) est un marqueur d'une distribution uniforme de la taille des particules et peut améliorer la stabilité et, en fin de compte, les performances des EPBB. Une fourchette de 100 à 1 000 nm pour la moyenne Z est optimale pour les émulsions de boissons. La taille des particules doit être suffisamment petite pour donner une texture lisse et crémeuse à la bouche pour les attributs sensoriels.

Les résultats ont montré que tous les EPBB développés avec 2 cycles ont des valeurs de potentiel zêta plus négatif (< -30mV), en particulier pour EPBB-2 qui a atteint -41 mV. EPBB-3 il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) entre 2 et 3 cycles, avec une valeur de potentiel zêta moyenne de -31mV. La valeur de distribution la plus basse de PDI a été détectée après 2 cycles pour EPBB-1 et EPBB-2 avec 0.44 et 0.76 respectivement. Cependant, il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre le PDI des 3 cycles pour l'EPBB-3.

Bien que toutes les tailles moyennes aient présenté une valeur supérieure à 100 nm, les valeurs minimales de 675,8, 1195,5 et 603,56 nm pour les EPBB-1, EPBB-2 et EPBB-3 ont été détectées après 2 cycles. Ces valeurs élevées de la moyenne zêta pourraient s'expliquer par les différentes compositions des protéines d'œuf. En particulier, EPBB-2 a présenté une taille de particule plus

élevée que les EPBB-1 et -3, ce qui est probablement lié aux protéines du blanc d'œuf comme l'ovomucine qui sont glycosylées, ce qui signifie qu'elles ont des chaînes d'hydrates de carbone attachées. Ces chaînes d'hydrates de carbone peuvent contribuer à la taille et à la forme des particules de protéines.

En ce qui concerne la viscosité, une différence significative a été obtenue après 3 cycles pour tous les EPBBs avec 1 468 CP pour EPBB-1, 555,5 CP pour EPBB-2 et presque 1 471 CP pour EPBB-3. On remarque que la viscosité diminue avec le nombre de cycles, ceci indique que le nombre de cycles est inversement proportionnel à la viscosité des émulsions. La valeur de viscosité minimale a été obtenue avec EPBB-2. Cela pourrait être dû à la composition des protéines du blanc d'œuf qui contiennent de l'ovalbumine, de la conalbumine et de l'ovotransferrine qui sont des protéines solubles dans l'eau (Strixner & Kulozik, 2011). Cela peut contribuer à rendre les émulsions moins visqueuses. En outre, ces protéines ont la capacité de former des mousses grâce à leur capacité à se dénaturer et à se déplier lors du fouettage. En fait, cela pourrait conduire à une plus grande distribution des protéines, ce qui réduirait l'effet épaississant. Alors que le jaune d'œuf contient des phospholipides tels que la lécithine qui peuvent former une interaction plus complexe avec les phases huile et eau, ce qui donne des émulsions plus visqueuses et plus épaisses. La lécithine est également un agent fortement émulsifiant qui aide à stabiliser l'interface entre l'huile et l'eau. Cet émulsifiant n'existe pas dans le blanc d'œuf, ce qui donne une émulsion plus visqueuse.

Après avoir comparé les résultats, il faudrait avoir un compromis entre toutes les réponses obtenues pour garantir une bonne stabilité. Après avoir comparé les réponses de stabilité collectées pour tous les EPBB, le cycle 2 a été sélectionné comme traitement de microfluidisation optimal pour une meilleure taille moyenne, PDI et potentiel zêta par rapport aux cycles 1 et 3.

L'analyse de l'aspect physique des formulations après 30 jours de stockage à 4°C a révélé une différence entre les processus de sonication et de microfluidisation. En fait, une séparation de phase a été détectée en particulier avec EPBB-1 et EPBB-3. Cependant, l'EPBB-2 a également montré une légère séparation de phase par rapport à l'EPBB-2 avec la microfluidisation. Cela pourrait indiquer que les formulations obtenues par microfluidisation présentent une meilleure stabilité visuelle que la sonication. Bien que les résultats obtenus avec la DLS ne contredisent pas les observations obtenues, l'aspect physique de EPBB-2 montre une bonne homogénéité ce qui coïncide avec les résultats obtenus de zêta-potentiel (-41 mV) qui implique une bonne stabilité de l'émulsion.

8.9 Caractérisation des microparticules par TEM

Les images montrent des différences évidentes dans la dispersion, la structure et la taille des particules entre chaque EPBB. Les différences entre les EPBB sont principalement dues aux différentes sources de protéines (œuf entier, blanc d'œuf et jaune d'œuf). Cependant, les différences entre les deux procédés de sonication et la microfluidisation sont fortement liées à la contrainte de cisaillement générée par chaque technique.

Le processus de sonication a montré une distribution dispersée de particules de EPBB-1 avec une taille moyenne de particules de 52,7 nm. Alors que, EPBB-2 et EPBB-3 illustrent une dispersion de taille plus importante et des particules de taille plus grande d'environ 74 nm. Ces agrégats présentent une dispersion qui a plus tendance à s'agréger et à former des particules de plus grande taille par coalescence. Ceci a été confirmé avec l'aspect physique des émulsions observé après 30 jours de stockage. Pour le procédé de microfluidisation, EPBB-1 et EPBB-3 montrent des particules plus au moins homogènes avec une taille moyenne de 45 à 50 nm. Cependant, l'EPBB-2 à base de blanc d'œuf présente quelques agrégations sphériques et une taille moyenne de gouttelettes de 84 nm relativement plus importante. La taille plus importante des gouttelettes pourrait être liée à la teneur élevée en ovalbumine du blanc d'œuf, qui est plus sensible d'être agrégée en fonction de la température. Ceci peut être dû aussi à l'augmentation de température au cours de l'homogénéisation avec la forte contrainte de cisaillement. En effet, la contrainte de cisaillement générée par la microfluidisation a pu rompre les zones d'interaction hydrophobes et les liaisons disulfures intermoléculaires, provoquant une diminution de la viscosité résultant de l'agrégation des protéines induite par la chaleur (Allahdad et al., 2023).

Seuls des agrégats sphériques ont été observés dans toutes les micrographies TEM, car le pH utilisé dans tous les EPBB optimisés était compris entre 5,7 et 6,4, ce qui confirme que les agrégats linéaires ne peuvent être formés qu'à pH 4, comme l'ont montré de nombreuses autres études (Allahdad et al., 2023; Qian et al., 2022; Ashokkumar et al., 2009). En outre, cela souligne l'importance des répulsions électrostatiques à pH 6, qui inhibent d'autres interactions entre les particules et, par conséquent, des groupes SH plus accessibles.

La taille des particules obtenue avec les résultats de TEM est différente des résultats de la taille moyenne obtenus avec la machine DLS. En effet, la taille moyenne obtenue par DLS présente la taille des particules sur la base de leur taux de diffusion, en considérant leur taille hydrodynamique, alors que la taille dans l'image TEM est déterminée sur la base de leur taille physique mesurée par un logiciel. Le traitement par sonication a créé une taille de particule plus

petite en raison de la force de cisaillement générée lors de la cavitation acoustique (Ashokkumar et al., 2009). Cependant, la corrélation entre les tailles reste la même entre la DLS et la TEM, démontrant un ratio de ½ pour EPBB-1 et EPBB-3 par rapport à EPBB-2. Ceci confirme la fiabilité de nos résultats en utilisant différentes méthodes de mesure de taille des particules.

8.10 Analyse de l'effet des différents traitements sur la stabilité de la phosvitine

Les 3 premières bandes détectées (phosvitine contrôle, phosvitine avec sonication, phosvitine avec microfluidisation,) apparaissent presque au même niveau avec un poids moléculaire respectif de 34 ; 35; 36 kDa. Ceci indique que la protéine est toujours intacte et n'a pas été dégradée. Cette phosphoprotéine demeure stable après des traitements de haute contrainte de cisaillement comme la sonication et la microfluidisation. Ces résultats confirment ce qui a été trouvé dans la recherche de Matsudomi et al. (2006), que la phosvitine native est relativement stable face à la pression, l'action enzymatique et la chaleur. La phosvitine comprend du phosphore sous forme d'acide phosphorique lié à des phosphosérines, créant une grande région centrale hydrophile entourée de deux petites extrémités hydrophobes (Anton et al., 2007). La structure non ordonnée de la phosvitine empêche l'agrégation et assure la stabilité à haute pression (Naderi et al., 2017).

En outre, la phosvitine extraite de la formulation a montré une bande un peu plus élevée avec un poids moléculaire de 40 kDa. La migration de la phosvitine vers une bande de poids moléculaire différente (40 KDa) pourrait s'expliquer par le pH de la formulation ajustée à 5,7. En effet, en raison de l'absence de sa structure secondaire, la phosvitine libérée en solution apparaît comme une bobine aléatoire à pH neutre. Cependant, les charges négatives sur les phosphosérines sont neutralisées à un pH acide ou dans des solvants moins polaires, ce qui fait que les molécules de phosvitine se transforment en structure feuillet β (Ko et al., 2011; Samaraweera et al., 2011). Cela pourrait présenter un poids moléculaire légèrement plus élevé que la solution de phosvitine extraite du jaune d'œuf, car le pH initial du jaune d'œuf dilué était de 6,5 (pH proche de la neutralité). Cependant, d'autres bandes de protéines de faible intensité ont été détectées dans le gel à 150 kDa, 75 kDa et 20 kDa, ce qui pourrait être dû à d'autres résidus de protéines d'œuf.

8.11 Analyse de teneur en phénols

Les résultats montrent que tous les extraits de fruits et légumes utilisés sous forme de poudre ou de jus sont riches en composés phénoliques. Les différences considérables dans la teneur en

phénol total entre les extraits en poudre et en jus s'expliquent par la concentration des extraits en poudre par rapport au jus qui sont dilués avec de l'eau. Les teneurs en phénols de poudre de graines de canneberge de 129 mg GAE/mL sont plus élevées que ceux de fruits de canneberge avec 80 mg GAE/mL. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Caillet et al. (2006) qui a constaté que la concentration en phénols était plus élevée dans les pépins que dans le raisin entier. Les extraits analysés se divisent sur plusieurs groupes selon leurs teneurs en polyphénols en effet, leurs teneurs dépendent forcément de la présence des métabolites secondaires comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins. Macheix et al. (2018) a montré aussi que la distribution des constituants des différentes classes n'est pas homogène dans tous les fruits comme c'est souvent le cas pour tous les métabolites secondaires. Certains composés, comme les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes, sont très largement représentés alors que d'autres ne se retrouvent que dans les fruits d'un genre et d'une espèce particuliers.

Les concentrations en phénols des formulations ont montré des teneurs légèrement différentes entre la formulation contrôle, les formulations 1, 2, 3 et 4. Malgré l'absence des extraits dans la formulation contrôle, une valeur élevée de 33 µg GAE/mL a été observée indiquant la richesse des protéines d'œufs en polyphénols. Cela est dû aux composants des œufs qui peuvent agir comme antioxydants. Les protéines de jaune d'œuf, plus spécifiquement la phosvitine, pourraient constituer un puissant antioxydant naturel grâce à ces nombreux résidus de phosphosérine qui sont regroupés dans sa séquence d'acides aminés (Bhat et al., 2015). La formulation 1 à base d'extrait de fruits et légumes a montré la plus haute teneur en polyphénols avec environ 40 µg GAE/mL. Ceci confirme les résultats obtenus des composants de cette formulation hautement élevée en polyphénols comme les extraits d'herbe d'orge, de l'herbe de blé, spiruline et chou frisés. Malgré leurs différents ingrédients, les formulations 2 et 3 ont révélé une teneur similaire en polyphénols de 38,6 µg GAE/mL. Ceci confirme aussi les résultats obtenus pour les extraits moins riches en phénols comme le jus de carotte, poudre de betterave et poudre de chou-fleur. Finalement, la formulation 4 avec la plus faible teneur de 37 qui confirme l'importance d'utilisation des jus de fruits comme solvant au lieu de l'eau, ce qui augmente la teneur en composés phénoliques.

8.12 Évaluation de l'activité antioxydante des extraits

Les résultats de l'activité antiradicalaire montrent que la plupart des extraits qui ont été rapportés comme riches en phénols ont été rapportés aussi avec une valeur antioxydante élevée comme le jus de canneberge, la poudre de graines de canneberge et le jus de sureau ce qui explique leurs

teneurs élevées en phénols. Cela prouve que la teneur en phénols est proportionnelle à l'activité antioxydante, comme l'a démontré l'expérience de Thériault et al. (2006) avec le sirop d'érable. La composition en acides aminés de l'hydrolysate enzymatique et sa capacité à piéger les radicaux libres sont étroitement corrélées. Il a été démontré que les acides aminés tyrosine, méthionine, histidine, lysine et tryptophane présents dans les extraits de fruits possèdent des propriétés antioxydantes exceptionnelles (Ling et al., 2020). Par conséquent, les aliments fonctionnels, enrichis avec ces antioxydants, seront efficaces pour bonifier les fonctions des systèmes cardiovasculaires, digestifs, immunitaires et nerveux (Ren et al., 2015).

8.13 Analyse de l'activité antimicrobienne des extraits

Le deep Agar test a révélé que seul l'acide L tartrique possède une activité antibactérienne contre quatre bactéries *E. coli*, *Sal. Typhimurium*, *S. aureus* et *L. monocytogenes*. L'activité inhibitrice de l'acide tartrique semble plus importante contre *Sal. Typhimurium*, *S. aureus* et *L. monocytogenes* avec une zone inhibitrice entre 30 et 32 mm. Malgré la virulence microbienne d'*E. coli*, l'extrait de raisin a montré une zone d'inhibition de 21 mm.

En plus de leurs utilisations comme acidifiant ou antioxydant, les acides organiques comme l'acide tartrique possèdent des propriétés antimicrobiennes qui apportent un avantage supplémentaire dans les aliments (Rahman, 2007). De nombreux acides organiques ou leurs dérivés sont déjà utilisés comme conservateurs alimentaires (Tiwari et al., 2009; Eswaranandam et al., 2004). L'activité antimicrobienne des acides est largement étudiée. Ils ciblent les parois cellulaires, les membranes cellulaires, les enzymes métaboliques, les systèmes de synthèse des protéines et le matériel génétique bactérien. Ils sont donc actifs contre un large éventail de micro-organismes. L'acide tartrique pourrait bien contribuer à la résistance naturelle contre les bactéries lorsqu'il est ajouté dans la formulation (Eswaranandam et al., 2004).

8.14 Analyse sensorielle

Malgré l'utilisation de presque les mêmes ingrédients de la formulation 2 (arôme de framboise, poudre de canneberge, poudre de betterave), la formulation 4 a seulement atteint 5/9 pour l'arôme et 6,37/9 pour l'aspect. Cela peut s'expliquer par l'utilisation d'eau comme solution de base pour la solubilisation des ingrédients. De ce fait, l'eau ne permet pas de garder l'arôme et le goût de la boisson, mais au contraire ça ne fait que les disperser. L'apparence a été appréciée grâce à la couleur rose formée par le sirop de framboise et la poudre de betterave. La formulation 1 à base

d'extraits de fruits a été la plus appréciée pour tous ces attributs. Son arôme était la plus appréciée avec 7,8, ce qui pourrait être dû à l'odeur de mangue qui a bien réagi avec les extraits de fruits. En outre, cette formulation présente un aspect créatif des extraits de fruits mélangés avec une saveur et un arôme avec des extraits naturels différents des produits commercialisés ordinaires développés avec arôme de chocolat ou vanille. La deuxième formulation la plus appréciée est la formulation 3, développée à partir de jus de carotte, avec une meilleure texture et un meilleur aspect par rapport à F1, avec des valeurs approximatives de 7,4 et 7,3 respectivement. Ceci peut être grâce au jus de carotte qui a permis de donner une bonne texture et saveur à la boisson.

La formulation 4 était la moins appréciée parmi toutes les boissons testées avec une appréciation globale qui ne dépasse pas 5. Certains panélistes ont considéré cette saveur comme "discrète" avec un arrière-goût non apprécié. Ceci peut être dû à l'eau qui ne présente pas une bonne solubilité et homogénéisation des ingrédients et ne permet pas assez de cacher le goût des œufs.

Les saveurs et les arômes naturels utilisés comme la saveur de framboise, de mangue et de pêche ont bien réussi à masquer le goût et la saveur des œufs. L'utilisation de sirop d'érable comme édulcorant a permis d'améliorer le goût naturel sans avoir recours aux additifs transformés qui engendrent un produit plus calorique comme le saccharose.

La formulation 2, à base de jus de canneberge, est également intéressante avec une appréciation globale de 7,13. Ceci peut être dû au jus de canneberge qui a été fortement apprécié par plusieurs panélistes.

8.15 Évaluation de la stabilité microbiologique des formulations

Étant donné que la viabilité des boissons peut être affectée pendant le stockage, il est important de respecter ce paramètre pour garantir un nombre acceptable de bactéries pendant toute la période de stockage. Selon le (MAPAQ (2019), la limite de la durée de conservation a été considérée à la limite de l'acceptabilité lorsque le nombre de bactéries coliformes totales atteint le niveau réglementaire des autorités actuelles de 1×10^2 UFC g^{-1} , *Salmonella* et les micro-organismes pathogènes doivent être complètement absents et pour les bactéries aérobies mésophiles, la limite est de 5×10^5 UFC g^{-1} .

Toutes les formulations ont passé les 16 jours de stockage sans aucune contamination et présentent presque le même profil de développement bactérien. Cela est dû à l'existence d'antibactériens naturels à base d'œuf déjà dans toutes les formulations, comme la phosvitine,

lysozyme et l'ovotransferrine, qui préservent les fonctions microbiennes des boissons. Sattar Khan et al. (2000), ont prouvé que la phosvitine, seule ou en combinaison avec un stress thermique, peut être utilisée comme agent antibactérien. La lactoferrine liant le fer dans la phosvitine a été également étudiée pour la production de peptides bioactifs antimicrobiens contre *E.coli*. Le lysozyme lui aussi possède des capacités antimicrobiennes, avec une haute stabilité thermique, pour prévenir ou retarder le développement des bactéries dans plusieurs variétés d'aliments comme le tofu, la viande, le fromage et les vins (Khorshidian et al., 2022). Cela pourrait être expliqué aussi par le même traitement subi pour toutes les formulations au cours du processus de préparation. En effet, la microfluidization peut avec sa forte pression prévenir le développement des bactéries (Ling et al., 2023). Aussi, dans cette étude, le traitement de pasteurisation de 63°C pendant 3 minutes a permis de créer des boissons microbiologiquement stables durant 30 jours. La formulation contrôle, sans ajouts d'extraits, a montré une légère augmentation des colonies bactériennes après 24 jours plus que les formulations développées avec des extraits de fruits. Cette différence peut être due à l'existence d'une activité microbienne par la combinaison de certains extraits ou bien la présence de l'acide tartrique qui a déjà présenté une activité antibactérienne contre les coliformes totaux. En outre, la formulation 2 à base de jus de canneberge montre une légère différence positive entre les autres formulations, en ayant un profil plus résistant au développement microbien. Cela peut être expliqué par la présence de jus de canneberge et l'extrait de canneberge qui inhibe ou retarde la croissance microbienne altérant la boisson protéinée. Ces résultats concordent avec ceux qui ont été prouvés par Caillet et al. (2012), que les extraits de canneberge possèdent une activité antibactérienne à une concentration de 10 µg de phénol/mL contre certains micro-organismes pathogènes comme *Escherichia coli*, *Listeria monocytogènes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* et *Staphylococcus aureus* et que les propriétés antimicrobiennes sont dues plus à la présence de polyphénols qu'à la présence des acides organiques. Par ailleurs, les formulations 1, 3 et 4 n'ont pas présenté une différence significative ($p > 0.05$). Les phénols et les caroténoïdes des sous-produits de fruits pourraient fonctionner comme des conservateurs naturels des boissons, car ils prolongent la durée de conservation du produit en retardant la formation de mauvais goût et le rancissement ; en outre, ils ont des effets bénéfiques bien connus sur la santé (Corbo et al., 2014).

8.16 Analyse de valeur nutritionnelle

Seulement le blanc d'œuf a été utilisé comme source de protéine, en raison de la teneur élevée en cholestérol d'œuf entier et du jaune d'œuf. Malgré l'importance de la présence de ce corps gras, sa présence en excès peut présenter des risques cardio-vasculaires. La deuxième formule à base de jus de canneberge présente le taux de calories le plus élevé (260 calories). Cependant, les teneurs en calories des formulations développées sont acceptables par rapport à des boissons commercialisées qui contiennent entre 220 et 260 calories. Lessard-Lord et al. (2024), ont montré que la consommation des extraits de canneberge riche en polyphénols et en oligosaccharides bonifie le microbiote intestinal en stimulant le genre bactérien *bifidobacterium*, qui est associé à une diminution du risque de diabète et de maladies cardiométaboliques. La bactérie *Akkermansia muciniphila* a également été stimulée par l'extrait de canneberge, qui joue un rôle crucial dans le traitement des muqueuses intestinales en contribuant à réduire l'inflammation et à renforcer la barrière de l'intestin. Les profils plasmatiques et fécaux des acides gras à chaîne courte ont également été altérés par l'extrait de canneberge.

Les formulations développées ont révélé un profil riche en vitamines et éléments minéraux, qui peut bien prendre en considération les besoins des enfants, des personnes âgées et des athlètes. L'existence de vitamines D et le calcium présent dans les protéines d'œufs sont cruciaux pour la fortification osseuse et dentaire (Morley et al., 2010). La présence de certains extraits de fruits comme la mangue, le canneberge, carotte, chou-fleur, racine de betterave enrichit, les boissons avec plusieurs sortes de vitamines (E, D, A, C, B12, B6) et de plusieurs minéraux comme zinc, fer, magnésium, manganèse, sélénium, calcium, cuivre, phosphore, molybdène, folate, choline, chrome. Ces vitamines et minéraux jouent un rôle important dans le maintien de la santé humaine, comblent les besoins nutritionnels journaliers et préviennent le développement de plusieurs maladies (Galanakis, 2021; Corbo et al., 2014; Day et al., 2009).

8.17 Conclusion générale

L'effet des paramètres indépendants (teneur en protéines, teneur en AH, volume d'huile et pH) a été analysé pour développer des émulsions EPBBs optimales par CCD et RSM. Cette étude a démontré que la méthode RSM pouvait prédire efficacement la valeur optimisée de chaque variable pour former les EPBB-1, EPBB-2 et EPBB-3. Des paramètres dépendants optimaux ont été obtenus pour chaque EPBB, avec la teneur en protéines la plus élevée et la plus grande capacité à reproduire les résultats pour l'EPBB-3. Tous les EPBB ont démontré une meilleure

stabilité physique par microfluidisation à 2 cycles de traitement sous 10 000 psi par rapport à 1 ou 3 cycles. La valeur élevée du potentiel zêta de l'EPBB-2 (-41 mV) a été confirmée par une observation visuelle indiquant une bonne stabilité. La taille des particules de cette émulsion était supérieure à celle des émulsions EPBB-1 et EPBB-3, ce qui a été confirmé par les résultats de l'ETM. Par rapport aux résultats de l'aspect physique obtenus avec la sonication et la microfluidisation, la microfluidisation présentait une meilleure caractéristique de stabilité et une texture plus lisse. Les images de TEM ont confirmé la présence d'agrégats sphériques avec une dispersion homogène des particules et une taille comprise entre 50 et 100 nm. EPBB-1 et EPBB-3 présentaient une taille de particule plus petite, de l'ordre de 50 nm, indiquant également de bonnes caractéristiques de stabilité. Grâce au taux élevé de digestibilité des protéines d'œuf et à leur profil nutritionnel riche en acides aminés essentiels, les boissons à base de protéines d'œuf offrent une opportunité aux entreprises qui cherchent à répondre aux besoins des consommateurs soucieux de leur santé.

L'analyse de la phosvitine avec gel d'électrophorèse a montré une bonne stabilité de cette phosphoprotéine à l'égard de fortes forces de cisaillement générées par les techniques d'homogénéisation et face à des traitements de pasteurisation à haute température. Ce qui prouve la fonctionnalité de cette protéine lors du processus de production.

Cette étude a permis la création de 4 breuvages à base de protéines d'œuf ayant des teneurs en protéines de 17 g à 22 g, ce qui est plus élevé que les produits commerciaux (entre 12 à 15g) pour la même base de 237 mL. Trois formulations à base de jus de carotte, de jus de canneberge, multi-extraits ont été fortement appréciées par les panélistes. Ces formulations en plus d'être formulées avec des composants 100% naturels comme le sirop d'érable et de proposer de nouvelles saveurs fruitées (framboise, pêche, mangue) ont de hautes valeurs nutritives et sont riches en minéraux et vitamines. Leurs teneurs en extraits naturels enrichissent les boissons avec des antioxydants et phénols et augmentent leurs vertus et bienfaits pour la santé. Ces formulations sont stables jusqu'à 30 jours de stockage à 4°C. Ce produit local présente un fort potentiel pour rivaliser les boissons commerciales présent sur le marché à base de protéines de soja. Ceci avec une forte teneur en protéines hautement digestibles, teneurs élevées en vitamines, minéraux et antioxydants naturels répondant aux besoins des personnes âgées, athlètes, enfants et éventuellement tout autre personne en manque de nutriments.

- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents—A review. *Poultry Science*, 92(12), 3292–3299. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03391>
- Achouri, A., Zamani, Y., & Boye, J. I. (2012). Stability and Physical Properties of Emulsions Prepared with and without Soy Proteins. *Journal of Food Research*, 1(1), p254. <https://doi.org/10.5539/jfr.v1n1p254>
- Agarwal, S., Beausire, R. L. W., Patel, S., & Patel, H. (2015). Innovative Uses of Milk Protein Concentrates in Product Development. *Journal of Food Science*, 80(S1). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12807>
- Akhtar, M., Murray, B. S., & Dickinson, E. (2006). Perception of creaminess of model oil-in-water dairy emulsions: Influence of the shear-thinning nature of a viscosity-controlling hydrocolloid. *Food Hydrocolloids*, 20(6), 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.08.006>
- Alais, C. 19. -. . . ., Linden, G. 1941-. . . ., & Miclo, L. 1966-. . . . (2020). *Biochimie alimentaire* (6e éd.). Dunod; WorldCat.org.
- Allahdad, Z., Manus, J., Aguilar-Uscanga, B. R., Salmieri, S., Millette, M., & Lacroix, M. (2022). Physicochemical Properties and Sensorial Appreciation of a New Fermented Probiotic Beverage Enriched with Pea and Rice Proteins. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(1), 112–120. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00944-1>
- Allahdad, Z., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2023). Fabrication of heat-stable composite microparticles from egg and whey proteins and their application in emulsion stabilization. *Food Hydrocolloids*, 144, 108943. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108943>
- Anese, M., Bot, F., Panozzo, A., Mirolo, G., & Lippe, G. (2015). Effect of ultrasound treatment, oil addition and storage time on lycopene stability and in vitro bioaccessibility of tomato pulp. *Food Chemistry*, 172, 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.140>
- Anton, M., Castellani, O., & Guérin-Dubiard, C. (2007). Phosvitin. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 17–24). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_4

- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., & Kentish, S. (2009). Hot topic: Sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, *92*(11), 5353–5356. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2561>
- Bagheri, L., Khelifi, M., Maherani, B., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2020). Thermosensitization enhancement of *A. niger*, *S. cerevisiae*, and *L. fructivorans* using combination of mild heat treatment with nanoemulsion-based mediterranean formulation to fabricate wholesome orange juice. *LWT*, *123*, 109094. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109094>
- Begum, T., Follett, P. A., Mahmud, J., Moskovchenko, L., Salmieri, S., Allahdad, Z., & Lacroix, M. (2022). Silver nanoparticles-essential oils combined treatments to enhance the antibacterial and antifungal properties against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. *Microbial Pathogenesis*, *164*, 105411. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105411>
- Begum, T., Follett, P. A., Shankar, S., Mahmud, J., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2022). Mixture design methodology and predictive modelling for developing active formulations using essential oils and citrus extract against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in rice. *Journal of Food Science*, *87*(1), 353–369. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15988>
- Begum, T., Follett, P. A., Shankar, S., Moskovchenko, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2023). Evaluation of bioactive low-density polyethylene (LDPE) nanocomposite films in combined treatment with irradiation on strawberry shelf-life extension. *Journal of Food Science*, *88*(5), 2141–2161. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16551>
- Bei, D., Marszalek, J., & Youan, B.-B. C. (2009). Formulation of Dacarbazine-loaded Cubosomes—Part II: Influence of Process Parameters. *AAPS PharmSciTech*, *10*(3), 1040. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9296-0>
- Ben-Fadhel, Y., Aragonés, M., Martínez, C., Salmieri, S., Allahdad, Z., & Lacroix, M. (2023). Food grade nanoemulsion development to control food spoilage microorganisms on bread surface. *Journal of Food Science and Technology*, *60*(2), 742–751. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05660-5>
- Benita, S. (Ed.). (2019). *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780367810528>

- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides from egg: A review. *Nutrition & Food Science*, 45(2), 190–212. <https://doi.org/10.1108/NFS-10-2014-0088>
- Bigard, A. (1996). Apport en protéines et masse musculaire. *Science & Sports*, 11(4), 195–204. [https://doi.org/10.1016/S0765-1597\(97\)82278-2](https://doi.org/10.1016/S0765-1597(97)82278-2)
- Binks, B. P. (Ed.). (1998). *Modern Aspects of Emulsion Science*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551474>
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
- Botella-Martínez, C., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J. A., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2022). Development of plant-based burgers using gelled emulsions as fat source and beetroot juice as colorant: Effects on chemical, physicochemical, appearance and sensory characteristics. *LWT*, 172, 114193. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114193>
- Bouayed, J. (Ed.). (2012). *Nutrition, Well-Being and Health*. InTech. <https://doi.org/10.5772/1864>
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate, J. (2001). *Food Additives*. CRC Press. <https://books.google.ca/books?id=87XK5Uwvs94C>
- Buffo, R. A., Reineccius, G. A., & Oehlert, G. W. (2001). Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 53–66. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00050-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00050-3)
- Burgos-Morón, Abad-Jiménez, Marañón, Iannantuoni, Escribano-López, López-Domènech, Salom, Jover, Mora, Roldan, Solá, Rocha, & Víctor. (2019). Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1385. <https://doi.org/10.3390/jcm8091385>
- Caillet, S., Côté, J., Sylvain, J.-F., & Lacroix, M. (2012). Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. *Food Control*, 23(2), 419–428. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.010>
- Caillet, S., Salmiéri, S., & Lacroix, M. (2006). Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry*, 95(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.011>

- Campelo, P. H., Junqueira, L. A., Resende, J. V. D., Zacarias, R. D., Fernandes, R. V. D. B., Botrel, D. A., & Borges, S. V. (2017). Stability of lime essential oil emulsion prepared using biopolymers and ultrasound treatment. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S564–S579. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1303707>
- Capek, I. (2004). Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 107(2–3), 125–155. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(03\)00115-5](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(03)00115-5)
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, Ana. (2014). Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>
- Charles, A., Guy, L., & Laurent, M. (2008). *Biochimie alimentaire*. Dunod.
- Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Naivikul, O., & McClements, D. J. (2011). Influence of Biopolymer Emulsifier Type on Formation and Stability of Rice Bran Oil-in-Water Emulsions: Whey Protein, Gum Arabic, and Modified Starch. *Journal of Food Science*, 76(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01959.x>
- Chevalier, L. (2018). Étude des interactions entre les protéines de lactosérum et les fibres du bleuet dans la formulation d'aliments enrichis en fibres et en protéines.
- Childs, J. L., Thompson, J. L., Lillard, J. S., Berry, T. K., & Drake, M. (2008). CONSUMER PERCEPTION OF WHEY AND SOY PROTEIN IN MEAL REPLACEMENT PRODUCTS. *Journal of Sensory Studies*, 23(3), 320–339. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2008.00158.x>
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods: Commercial Trends, Research, and Health Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192–1206. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>

- Davies, R. W., & Jakeman, P. M. (2020). Separating the Wheat from the Chaff: Nutritional Value of Plant Proteins and Their Potential Contribution to Human Health. *Nutrients*, *12*(8), 2410. <https://doi.org/10.3390/nu12082410>
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(9), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.05.002>
- Dickinson, E., Galazka, V. B., & Anderson, D. M. W. (1991). Emulsifying behaviour of gum arabic. Part 1: Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, *14*(4), 373–383. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90003-U](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90003-U)
- DiMarco, D. M., Norris, G. H., Millar, C. L., Blesso, C. N., & Fernandez, M. L. (2017). Intake of up to 3 Eggs per Day Is Associated with Changes in HDL Function and Increased Plasma Antioxidants in Healthy, Young Adults. *The Journal of Nutrition*, *147*(3), 323–329. <https://doi.org/10.3945/jn.116.241877>
- Doublier, J.-L., Garnier, C., Renard, D., & Sanchez, C. (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Elsevier Science Ltd.*
- Drelich, A., Gomez, F., Clause, D., & Pezron, I. (2010). Evolution of water-in-oil emulsions stabilized with solid particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *365*(1–3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.01.042>
- Dridi, C., Millette, M., Uscanga, B. R. A., Salmieri, S., Allahdad, Z., & Lacroix, M. (2023). Evaluation of the Nutritional Quality and In Vivo Digestibility of Probiotic Beverages Enriched with Cricket Proteins. *Food and Bioprocess Technology*, *16*(9), 1992–2000. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03043-y>
- Duffuler, P., Giarratano, M., Naderi, N., Suwal, S., Marciniak, A., Perreault, V., Offret, C., Brisson, G., House, J. D., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2020). High hydrostatic pressure induced extraction and selective transfer of β -phosvitin from the egg yolk granule to plasma fractions. *Food Chemistry*, *321*, 126696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126696>
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2004). Antimicrobial Activity of Citric, Lactic, Malic, or Tartaric Acids and Nisin-incorporated Soy Protein Film Against *Listeria*

- monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, 69(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13375.x>
- Florence, I. O., Godwin, I. A., Abubakar, N. S., & Kudirat, O. S. (2014). Nutritional composition of *Detarium microcarpum* fruit. *African Journal of Food Science*, 8(6), 342–350. <https://doi.org/10.5897/AJFS2014.1161>
- Galanakis, C. M. (2021). Functionality of Food Components and Emerging Technologies. *Foods*, 10(1), 128. <https://doi.org/10.3390/foods10010128>
- Galanakis, C. M., Aldawoud, T. M. S., Rizou, M., Rowan, N. J., & Ibrahim, S. A. (2020). Food Ingredients and Active Compounds against the Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic: A Comprehensive Review. *Foods*, 9(11), 1701. <https://doi.org/10.3390/foods9111701>
- Galanakis, I., Mavropoulos, P., & Dederichs, P. H. (2006). Electronic structure and Slater–Pauling behaviour in half-metallic Heusler alloys calculated from first principles. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39(5), 765–775. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/39/5/S01>
- Garti, N. (1999). HYDROCOLLOIDS AS EMULSIFYING AGENTS FOR OIL-IN-WATER EMULSIONS. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20(1–2), 327–355. <https://doi.org/10.1080/01932699908943795>
- Gharibzahedi, S. M. T., Mousavi, S. M., Hamed, M., & Ghasemlou, M. (2012). Response surface modelling for optimization of formulation variables and physical stability assessment of walnut oil-in-water beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.006>
- Guilmineau, F., Krause, I., & Kulozik, U. (2005). Efficient Analysis of Egg Yolk Proteins and Their Thermal Sensitivity Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis under Reducing and Nonreducing Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9329–9336. <https://doi.org/10.1021/jf050475f>
- Guzey, D., & McClements, D. J. (2007). Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Containing Oil Droplets Coated by β -Lactoglobulin–Pectin Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 475–485. <https://doi.org/10.1021/jf062342f>
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. In *Annual Reviews* (Vol. 16, p. 50). Pharmacology group, King's college.

- Hammerby, J. (2015). *Development of a whey protein beverage* [Master thesis]. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Harwood, W. S., & Drake, M. (2019). Understanding implicit and explicit consumer desires for protein bars, powders, and beverages. *Journal of Sensory Studies*, 34(3), e12493. <https://doi.org/10.1111/joss.12493>
- Hashtjin, A. M., & Abbasi, S. (2015). Optimization of ultrasonic emulsification conditions for the production of orange peel essential oil nanoemulsions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2679–2689. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1322-x>
- Henry, C. J. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(7), 657–659. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.101>
- Hertzler, S. R., Lieblein-Boff, J. C., Weiler, M., & Allgeier, C. (2020). Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function. *Nutrients*, 12(12), 3704. <https://doi.org/10.3390/nu12123704>
- Heurtault, B. (2003). Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23), 4283–4300. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00331-4)
- Hosseini, S., Tarzi, B. G., Gharachorloo, M., Ghavami, M., & Bakhoda, H. (2015). Optimization on the Stability of Linseed Oil-in-Water Nanoemulsions Generated by Ultrasonic Emulsification Using Response Surface Methodology (RSM). *Oriental Journal of Chemistry*, 31(2), 1223–1230. <https://doi.org/10.13005/ojc/310282>
- Huang, X., Kakuda, Y., & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: Particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00091-1)
- Huang, Z., Yang, X., Liang, S., Chen, L., Dong, L., Rahaman, A., He, S., Shen, Y., & Su, D. (2022). Polysaccharides improved the viscoelasticity, microstructure, and physical stability of ovalbumin-ferulic acid complex stabilized emulsion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 211, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.078>
- Hunter, T. N., Pugh, R. J., Franks, G. V., & Jameson, G. J. (2008). The role of particles in stabilising foams and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 137(2), 57–81. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.07.007>

- Ingersent, K., Klein, J., & Pincus, P. (1990). Forces between surfaces with adsorbed polymers. 3. Θ solvent. Calculations and comparison with experiment. *Macromolecules*, 23(2), 548–560. <https://doi.org/10.1021/ma00204a031>
- Jaiswal, L., & Worku, M. (2022). Recent perspective on cow's milk allergy and dairy nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(27), 7503–7517. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1915241>
- Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1–3), 245–256. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00153-0)
- Juttulapa, M., Piriyaarasath, S., & Sriamornsak, P. (2013). Effect of pH on Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Pectin-Zein Complexes. *Advanced Materials Research*, 747, 127–130. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.747.127>
- Karacam, C. H., Sahin, S., & Oztop, M. H. (2015). Effect of high pressure homogenization (microfluidization) on the quality of Ottoman Strawberry (F. Ananassa) juice. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 932–937. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.064>
- Khan, A., Vu, K. D., Chauve, G., Bouchard, J., Riedl, B., & Lacroix, M. (2014). Optimization of microfluidization for the homogenous distribution of cellulose nanocrystals (CNCs) in biopolymeric matrix. *Cellulose*, 21(5), 3457–3468. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0361-9>
- Khorshidian, N., Khanniri, E., Koushki, M. R., Sohrabvandi, S., & Yousefi, M. (2022). An Overview of Antimicrobial Activity of Lysozyme and Its Functionality in Cheese. *Frontiers in Nutrition*, 9, 833618. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.833618>
- Ko, K. Y., Nam, K. C., Jo, C., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2011). A simple and efficient method for preparing partially purified phosvitin from egg yolk using ethanol and salts. *Poultry Science*, 90(5), 1096–1104. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01138>

- Lacroix, N., Fliss, I., & Makhlouf, J. (2005). Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. *Food Research International*, 38(5), 569–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.11.010>
- Lessard-Lord, J., Roussel, C., Lupien-Meilleur, J., Généreux, P., Richard, V., Guay, V., Roy, D., & Desjardins, Y. (2024). Short term supplementation with cranberry extract modulates gut microbiota in human and displays a bifidogenic effect. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), 18. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00493-w>
- Leveille, M. (2020). *Protein Beverage Trends and Innovation*. Kerry. <https://www.kerry.com/insights/kerrydigest/2020/protein-beverage-trends-and-innovation.html>
- Ling, Y., Cheng, L., Bai, X., Li, Z., Dai, J., & Ren, D. (2023). Effects of Microfluidization on the Physical and Storage Stability of Walnut Protein Emulsion and Beverages. *Plant Foods for Human Nutrition*, 78(2), 467–475. <https://doi.org/10.1007/s11130-023-01073-7>
- Ling, Z., Ai, M., Zhou, Q., Guo, S., Zhou, L., Fan, H., Cao, Y., & Jiang, A. (2020). Fabrication egg white gel hydrolysates-stabilized oil-in-water emulsion and characterization of its stability and digestibility. *Food Hydrocolloids*, 102, 105621. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105621>
- Lonnie, M., Laurie, I., Myers, M., Horgan, G., Russell, W., & Johnstone, A. (2020). Exploring Health-Promoting Attributes of Plant Proteins as a Functional Ingredient for the Food Sector: A Systematic Review of Human Interventional Studies. *Nutrients*, 12(8), 2291. <https://doi.org/10.3390/nu12082291>
- Loveday, S. M. (2023). Protein digestion and absorption: The influence of food processing. *Nutrition Research Reviews*, 36(2), 544–559. <https://doi.org/10.1017/S0954422422000245>
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Billot, J. (2018). *Fruit phenolics* (Reissued). CRC Press.
- Malatesta, M. (2021). Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12789. <https://doi.org/10.3390/ijms222312789>
- Manus, J., Millette, M., Uscanga, B. R. A., Salmieri, S., Maherani, B., & Lacroix, M. (2021). In vitro protein digestibility and physico-chemical properties of lactic acid bacteria fermented beverages

- enriched with plant proteins. *Journal of Food Science*, 86(9), 4172–4182. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15859>
- MAPAQ. (2019). *Lignes Directrices Et Normes Pour L'interprétation Des Résultats Analytiques En Microbiologie Alimentaire*. Bibliothèque nationale du Québec. <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/recueil.pdf>
- Mason, R. L., Gunst, R. F., & Hess, J. L. (2003). Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science. In *Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science* (second edition, p. 760). John Wiley & Sons.
- Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (1988). *Sonochemistry: Theory, applications and uses of ultrasound in chemistry*. Ellis Horwood. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282273117164288>
- Matsudomi, N., Ito, K., & Yoshika, Y. (2006). Preventive Effect of Egg Yolk Phosvitin on Heat-Insolubilization of Egg White Protein and Its Application to Heat-Induced Egg White Gel. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(4), 836–842. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.836>
- McClements, D. J. (2000). Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14(2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00065-X)
- McClements, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420039436>
- McClements, D. J. (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Third Edition* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18868>
- Mehinagic, E., Bourles, E., & Jourjon, F. (2011). Composés des fruits d'intérêt nutritionnel: Impact des procédés de transformation sur les polyphénols. In *Arboriculture* (Vol. 6, pp. 364–368). Revue suisse viticulture.
- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N. S. A., & Yusof, S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1–3), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.07.007>

- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Taherian, A. R., & Boo, H. C. (2009). Modeling the physicochemical properties of orange beverage emulsion as function of main emulsion components using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.022>
- Monsen, T., Lövgren, E., Widerström, M., & Wallinder, L. (2009). In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), 2496–2501. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-08>
- Morach, B., Witte, B., Walker, D., Von Koeller, E., Grosse-Holz, F., Rogg, J., Brigl, M., Dehnert, N., Obloj, P., Koktenturk, S., & Schulze, U. (2021). Food for Thought: The Protein Transformation. *Industrial Biotechnology*, 17(3), 125–133. <https://doi.org/10.1089/ind.2021.29245.bwi>
- Moraru, C., Huang, Q., Takhistov, P., Dogan, H., & Kokini, J. (2009). Food Nanotechnology. In *Global Issues in Food Science and Technology* (pp. 369–399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374124-0.00021-1>
- Morley, J. E., Argiles, J. M., Evans, W. J., Bhasin, S., Cella, D., Deutz, N. E. P., Doehner, W., Fearon, K. C. H., Ferrucci, L., Hellerstein, M. K., Kalantar-Zadeh, K., Lochs, H., MacDonald, N., Mulligan, K., Muscaritoli, M., Ponikowski, P., Posthauer, M. E., Fanelli, F. R., Schambelan, M., ... Anker, S. D. (2010). Nutritional Recommendations for the Management of Sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association*, 11(6), 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2010.04.014>
- Naderi, N., Doyen, A., House, J. D., & Pouliot, Y. (2017). The use of high hydrostatic pressure to generate folate-enriched extracts from the granule fraction of hen's egg yolk. *Food Chemistry*, 232, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.144>
- Ndong, L. (2012). MALNUTRITION PROTEINO-ENERGETIQUE ET ENSEIGNEMENT DE LA NUTRITION ET DE L'ALIMENTATION1 AU GABON. *Statistical Implicative Analysis*.
- Nielsen, N. S., Horn, A. F., & Jacobsen, C. (2013). Effect of emulsifier type, p H and iron on oxidative stability of 5% fish oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(8), 874–889. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200303>

- Nowik, W. (1995). Acides amines et acides gras sur un même chromatogramme—Un autre regard sur l'analyse des liants en peinture. *Studies in Conservation*, 40(2), 120–126. <https://doi.org/10.1179/sic.1995.40.2.120>
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5598–5605. <https://doi.org/10.1021/jf049389q>
- Ozturk, O. K., & Turasan, H. (2021). Applications of microfluidization in emulsion-based systems, nanoparticle formation, and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 609–625. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.033>
- Paddon-Jones, D., Campbell, W. W., Jacques, P. F., Kritchevsky, S. B., Moore, L. L., Rodriguez, N. R., & Van Loon, L. J. (2015). Protein and healthy aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1339S–1345S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.084061>
- Park, S.-J., Jung, J.-H., Choi, S.-W., & Lee, H.-J. (2018). Association between Egg Consumption and Metabolic Disease. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(2), 209–223. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.2.209>
- Pathania, S., Parmar, P., & Tiwari, B. K. (2019). Stability of Proteins During Processing and Storage. In *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* (pp. 295–330). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816695-6.00010-6>
- Petrut, R. F., Danthine, S., & Blecker, C. (2016). Assessment of partial coalescence in whippable oil-in-water food emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 229, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.12.004>
- Qian, S., Chen, L., Zhao, Z., Fan, X., Xu, X., Zhou, G., Zhu, B., Ullah, N., & Feng, X. (2022). Epigallocatechin-3-gallate mediated self-assemble behavior and gelling properties of the ovalbumin with heating treatment. *Food Hydrocolloids*, 131, 107797. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107797>
- Quanhong, L., & Caili, F. (2005). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92(4), 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.042>

- Rahman, S. (Ed.). (2007). *Handbook of food preservation* (2nd ed). CRC Press.
- Raikos, V., Duthie, G., & Ranawana, V. (2017). Comparing the efficiency of different food-grade emulsifiers to form and stabilise orange oil-in-water beverage emulsions: Influence of emulsifier concentration and storage time. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(2), 348–358. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13286>
- Rand, W. M., Pellett, P. L., & Young, V. R. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(1), 109–127. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.1.109>
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, *11*(3), 684. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>
- Ren, J., Li, Q., Offengenden, M., & Wu, J. (2015). Preparation and characterization of phosphopeptides from egg yolk phosvitin. *Journal of Functional Foods*, *18*, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.007>
- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(7), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.011>
- Rosa, L. A. de la., Alvarez-Parrilla, Emilio., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2010). *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value, and stability*. Wiley-Blackwell; WorldCat.org.
- Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., & Aires-Barros, M. R. (2007). Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. *Journal of Chromatography A*, *1141*(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.075>
- Russell, T. A., Drake, M. A., & Gerard, P. D. (2006). Sensory Properties of Whey and Soy Proteins. *Journal of Food Science*, *71*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00055.x>
- Salmieri, S., & Lacroix, M. (2006). Physicochemical Properties of Alginate/Polycaprolactone-Based Films Containing Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(26), 10205–10214. <https://doi.org/10.1021/jf062127z>
- Salmieri, S., & Lacroix, M. (2023). *FICHE 2 Les protéines végétales: Bienfaits, limites et tendances*.

- Samaraweera, H., Zhang, W., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2011). Egg Yolk Phosvitin and Functional Phosphopeptides—Review. *Journal of Food Science*, 76(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02291.x>
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9031-3>
- Sattar Khan, M. A., Nakamura, S., Ogawa, M., Akita, E., Azakami, H., & Kato, A. (2000). Bactericidal Action of Egg Yolk Phosvitin against *Escherichia coli* under Thermal Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1503–1506. <https://doi.org/10.1021/jf990700r>
- Severino, R., Vu, K. D., Donsì, F., Salmieri, S., Ferrari, G., & Lacroix, M. (2014a). Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.007>
- Severino, R., Vu, K. D., Donsì, F., Salmieri, S., Ferrari, G., & Lacroix, M. (2014b). Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. *Journal of Food Engineering*, 124, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.09.026>
- Shams, Z., Allahdad, Z., Jaiswal, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2023). Development of hen egg-based protein beverages with high nutritional value. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05909-7>
- Shi, Y., Li, J., Gu, L., Su, Y., Chen, W., Zhang, M., Chang, C., & Yang, Y. (2023). Synergistic effect of gum arabic and xanthan gum on improving rheological properties of low-fat mayonnaise with egg white protein microparticle as a fat mimetic. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(3), 1037–1048. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16237>
- Simpson, B. K., & Nollet, L. M. L. (Eds.). (2012). *Food biochemistry and food processing* (2. ed). Wiley-Blackwell.
- Singh, H. (2016). Nanotechnology Applications in Functional Foods; Opportunities and Challenges. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(1), 1–8. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.1.1>

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965a). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *The American Society for Enology and Viticulture*.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965b). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Stagos, D. (2019). Antioxidant Activity of Polyphenolic Plant Extracts. *Antioxidants*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.3390/antiox9010019>
- Stratford, M. (2006). Food and Beverage Spoilage Yeasts. In A. Querol & G. Fleet (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages* (pp. 335–379). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_11
- Strixner, T., & Kulozik, U. (2011). Egg proteins. In *Handbook of Food Proteins* (pp. 150–209). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.150>
- Sun, C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.06.003>
- Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 227–258. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.025>
- Tadros, T. F. (Ed.). (2009). *Emulsion Science and Technology* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527626564>
- Tangsuphoom, N., & Coupland, J. N. (2009). Effect of surface-active stabilizers on the surface properties of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1801–1809. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.002>
- Tavernier, I., Wijaya, W., Van Der Meeren, P., Dewettinck, K., & Patel, A. R. (2016). Food-grade particles for emulsion stabilization. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 159–174. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.023>
- Tawema, P., Han, J., Salmieri, S., Vu, K. D., & Lacroix, M. (2014). *Application of Selected Natural Antimicrobial Formulations for the Control of Food Pathogens in Fresh-Cut Cauliflower*.

- Thériault, M., Caillet, S., Kermasha, S., & Lacroix, M. (2006). Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry*, 98(3), 490–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.079>
- Tien, C., Vachon, C., Mateescu, M.-A., & Lacroix, M. (2001). Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes. *Journal of Food Science*, 66(4), 512–516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04594.x>
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O' Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987–6000. <https://doi.org/10.1021/jf900668n>
- Tomé, D. (2008). *Besoins en protéines et en acides aminés & qualité des protéines alimentaires*.
- Tome, D. (2012). Criteria and markers for protein quality assessment – a review. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S222–S229. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002565>
- Tomotake, H., Katagiri, M., & Yamato, M. (2010). Silkworm Pupae (*Bombyx mori*) Are New Sources of High Quality Protein and Lipid. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 56(6), 446–448. <https://doi.org/10.3177/jnsv.56.446>
- Torchilin, V. (Ed.). (2020). *Handbook of Materials for Nanomedicine: Lipid-Based and Inorganic Nanomaterials* (1st ed.). Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/9781003045076>
- Vanapalli, S. A., Palanuwech, J., & Coupland, J. N. (2002). Stability of emulsions to dispersed phase crystallization: Effect of oil type, dispersed phase volume fraction, and cooling rate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204(1–3), 227–237. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)01135-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)01135-9)
- Verger, R., & Pattus, F. (1976). Spreading of membranes at the air/water interface. *Chemistry and Physics of Lipids*, 16(4), 285–291. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(76\)90023-2](https://doi.org/10.1016/0009-3084(76)90023-2)
- Wadhwa, A. A., Jadhav, A. I., & Arsul, V. A. (2014). PLANT PROTEINS APPLICATIONS: A REVIEW. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3).
- Wu, G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Food & Function*, 7(3), 1251–1265. <https://doi.org/10.1039/C5FO01530H>

- Yang, C., Zhi, X., & Xu, H. (2016). Advances on Semisynthesis, Total Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Honokiol and Magnolol Derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(5), 404–426. <https://doi.org/10.2174/1389557516666151120115558>
- Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M., Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M. J., Saraiva, J. A., Patras, A., Tiwari, B., & Barba, F. J. (2015). Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. *Food Research International*, 77, 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.032>