

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand-Frappier

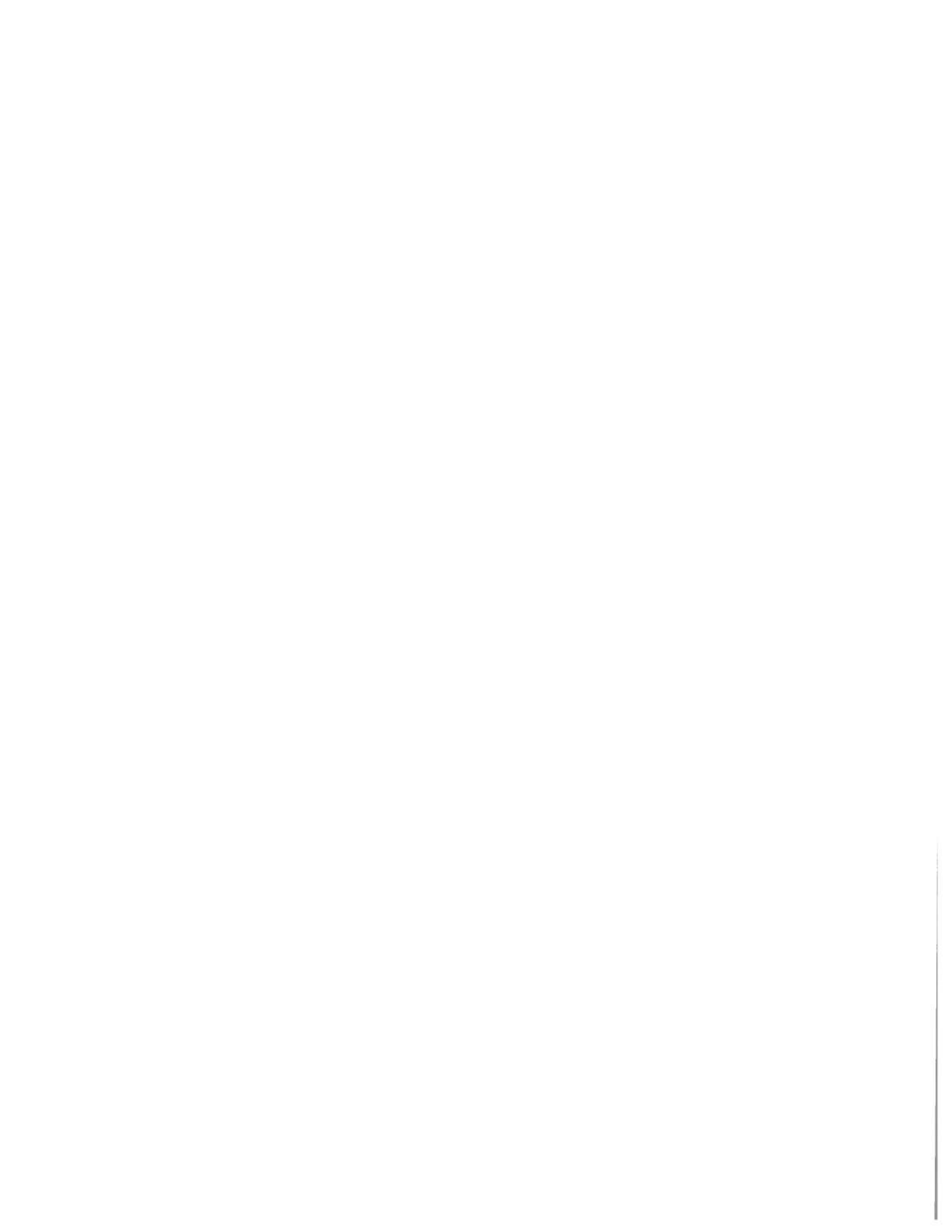
**ENCAPSULATION  
DE COMPOSÉS LIPOPHILES  
SOUS FORME D'ÉMULSIONS SIMPLES  
DANS LA MATRICE FROMAGÈRE**

Par  
Iulia Stratulat

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie Appliquée

**Jury d'évaluation**

Examineur externe	Pr. Inteaz Alli Département des Sciences Alimentaires et de Chimie Agricole Université McGill
Examineur interne	Pr. François Shareck INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Pr. Monique Lacroix INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Ph.D. Michel Britten Agriculture et Agroalimentaire Canada, CRDA



## RÉSUMÉ

Actuellement, les aliments fonctionnels sont de plus en plus appréciés chez les consommateurs. Ils regardent au-delà des valeurs nutritionnelles des aliments et cherchent à trouver des composés pouvant améliorer leur santé et prévenir différentes maladies. Comme les produits laitiers ont une forte valeur nutritionnelle, le fromage enrichi en agents bioactifs lipophiles offre un nouveau choix d'aliments fonctionnels et permet de satisfaire les exigences des consommateurs. Cependant, l'ajout de composés bioactifs au fromage pose un défi important en raison des pertes élevées dans le lactosérum. Afin de prévenir ce problème, dans cette étude, des agents bioactifs lipophiles ont été encapsulés dans deux types d'émulsions simples. Ces émulsions ont été constituées d'une solution de caséinate de calcium et d'huile de lin dans laquelle ont été dispersées les composantes bioactives (vitamine E, A et CoQ<sub>10</sub>) en présence ou en absence de lécithine. Les vitamines A, E et la CoQ<sub>10</sub> ont été ajoutées séparément ou tous ensemble dans la même émulsion. Ces émulsions ont été utilisées en qualité de crèmes fonctionnelles pour standardiser le lait fromager.

Le rendement fromager, le taux de rétention des protéines, des gras et des agents actifs ont été déterminés. Une évaluation quantitative des vitamines et de leur activité biologique a été réalisée à 0, 30, 60 et 90 jours d'entreposage. L'enrichissement du caillé en acides gras omega-3 a été évalué par le calcul de l'indice d'insaturation des lipides selon la spectroscopie infrarouge. Les crèmes fonctionnelles développées ont permis l'incorporation d'huile de lin sous forme d'émulsions simples et d'enrichir ainsi le fromage en acides omega-3. Le fromage fortifié avec l'huile de lin a montré un indice d'insaturation des lipides 36 fois plus élevé que le fromage témoin, préparé avec la crème laitière.

L'utilisation des conditions optimales d'encapsulation nous a permis de récupérer une importante quantité (90-93%) d'agents bioactifs dans le caillé et de maintenir leur bioactivité durant au moins 3 mois. L'ajout de la lécithine de soya a permis d'augmenter fortement la stabilité des émulsions, la rétention et la préservation des composantes bioactives lipophiles dans le fromage au cours de l'entreposage. Les agents bioactifs ont également amélioré la stabilité des émulsions et la résistance des fromages contre l'oxydation, la composition et le rendement fromager. L'encapsulation des molécules bioactives dans la même matrice fromagère a révélé une bonne compatibilité entre les agents incorporés. La vitamine E a été régénérée après 3 mois d'entreposage probablement due à la CoQ<sub>10</sub> qui est connue pour

recycler la vitamine E. La nouvelle approche développée dans cette étude pourrait être utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour accroître la valeur nutritionnelle du fromage et satisfaire l'exigence des consommateurs.

## ABSTRACT

Functional foods are becoming increasingly popular among consumers who look beyond the nutritional value of foods and try to find compounds that can improve their health and prevent various diseases. Dairy products have a high nutritional value and cheese enriched in lipophilic bioactive agents offer a new range of functional foods that can fulfill consumers' requirements. However, the addition of bioactive compounds in cheese poses a significant challenge due to high losses in the whey. To prevent this problem, in this study, the lipophilic bioactive agents were encapsulated in two types of simple emulsions. These emulsions were made from a solution of calcium caseinate and flaxseed oil in which were dispersed the bioactive compounds (vitamin E, A and CoQ<sub>10</sub>) in presence or absence of lecithin. Vitamins A, E and CoQ<sub>10</sub> were added individually or together in same emulsions. These emulsions were used as functional creams to standardize cheese milk. Cheese yield and the retention of protein, fat and active components were determined. A quantitative assessment of vitamins and their biological activity was performed at 0, 30, 60 and 90 days of storage. The enrichment of curd in omega-3 fatty acids was evaluated by calculating the index of lipid unsaturation by using infrared spectroscopy. Developed emulsions allowed the incorporating flaxseed oil in the form of emulsified particles and enriching the cheese in omega-3 fatty acids. Fortified cheese in flaxseed oil presented an index of unsaturation of lipids 36 times higher than control, prepared with dairy cream. The determination of optimal conditions for encapsulation enabled recovering a significant amount (90-93%) of bioactive agents in curd and maintaining their bioactivity for at least 3 months. The addition of soy lecithin increased strongly emulsion stability, retention and preservation of lipophilic bioactive components in cheese during storage. Bioactive agents also improved emulsion stability and cheese resistance against oxidation, cheese composition and yield. The encapsulation of bioactive molecules in same cheese matrix showed a good compatibility between embedded agents. Vitamin E was regenerated after 3 months of storage probably due to CoQ<sub>10</sub> which is known to contribute recycling vitamin E. This new approach developed in this study could be used in food industry to improve the nutritional value of cheese in view of satisfying consumer demands.



## REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Recherche en Sciences appliquées à l'Alimentation de Laval (RESALA), rattaché à l'INRS-Institut Armand-Frappier et s'inscrit dans le cadre d'un projet subventionné par Novalait Inc., Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT).

J'exprime mes remerciements et ma gratitude à ma directrice de recherche, Prof. Monique Lacroix, pour m'avoir guidé et encouragé pendant toute la durée de mon travail, pour la confiance et les conseils scientifiques qu'elle m'a apportés.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, Dr Michel Britten et tous les membres du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments (CRDA) qui ont contribué à la réalisation de ce projet pour leur aide, nombreux conseils et leur disponibilité.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'assistant de recherche Stéphane Salmieri pour sa patience, sa disponibilité et son appui au cours de cette étude. Également, je ne peux pas passer sous silence la contribution du Dr Tien Canh Le, du Dr Dang Khanh Vu, de mon collègue Dominique Dussault et du bibliothécaire M. Michel Courcelles pour leur aide et leur gentillesse. Un grand merci à ma famille et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

Finalement, j'adresse mes remerciements à la Fondation Armand-Frappier pour la bourse financière octroyée.





# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>vii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>xv</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hypothèse et objectifs .....	2
1.2. Présentation du mémoire .....	2
<b>2. REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>5</b>
2.1. Émulsions alimentaires .....	5
2.1.1. Aspect générale .....	5
2.1.2. Déstabilisation des émulsions .....	6
2.1.3. Formulation d'émulsions .....	8
2.1.4. Procédés d'opération. ....	15
2.2. Oxydation des lipides .....	17
2.3. Vitamine A .....	19
2.4. Vitamine E .....	21
2.5. Coenzyme Q <sub>10</sub> .....	24
2.6. Fabrication du fromage. Impact de la fortification sur la composition du fromage	27
2.6.1. Fabrication du fromage .....	27
2.6.2. Rendement fromager .....	33
<b>3. MÉTHODOLOGIE</b> .....	<b>35</b>
3.1. Formulation et caractérisation des émulsions .....	35
3.1.1. Effet d'agents bioactifs sur la stabilité des émulsions développées .....	35
3.1.2. Tests de stabilité des émulsions .....	35
3.1.3. Caractérisation des émulsions .....	37
3.2. Fabrication du fromage .....	38

3.2.1. Évaluation d'enrichissement du fromage en acide gras oméga-3.....	39
3.2.2. Rétenion des vitamines E, A et CoQ <sub>10</sub> dans le fromage. ....	39
3.2.3. Propriétés antioxydantes.....	39
3.2.4. Stabilité chimique de fromage. ....	40
3.2.5. Analyse statistique. ....	40
<b>4. DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>41</b>
4.1. Formulation et caractérisation des émulsions .....	41
4.1.1. Variables de composition. ....	41
4.1.2. La microfluidisation .....	43
4.1.3. Le comportement rhéologique des émulsions développées .....	45
4.1.4. Effet des agents bioactifs sur la stabilité des émulsions .....	46
4.1.5. Caractérisation des émulsions .....	48
4.2. Encapsulation d'agents lipophiles dans la matrice fromagère .....	49
4.3. Conclusion.....	50
<b>5. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1 .....</b>	<b>53</b>
5.1. Contributions de l'étudiante à l'article 1 .....	53
5.2. Article 1: Encapsulation of coenzyme Q <sub>10</sub> in a simple emulsion-based nutraceutical formulation and application in cheese manufacturing.....	54
5.3. Résumé.....	55
5.4. Abstract .....	56
5.5. Introduction.....	57
5.6. Materials and methods .....	58
5.6.1. Materials .....	58
5.6.2. Preparation of emulsions.....	59
5.6.3. Particle size analysis and physical stability of emulsions.....	59
5.6.4. Optical microscopy.....	60
5.6.5. Viscosity measurements.....	60
5.6.6. Evaluation of chemical stability of emulsions.....	60
5.6.6.1. FTIR measurements.....	60
5.6.7. Cheese making procedure and compositional analysis of cheese.....	61
5.6.8. Determination of the retention rate of CoQ <sub>10</sub> in cheese by HPLC .....	61
5.6.8.1. Sample preparation.....	62
5.6.8.2. HPLC analysis and rate of encapsulation of CoQ <sub>10</sub> .....	62
5.6.9. Statistical analysis.....	62

5.7. Results and discussion .....	62
5.7.1. Particle size analysis and physical stability of the emulsions .....	62
5.7.2. Chemical stability of the emulsion .....	63
5.7.3. Retention rate of CoQ <sub>10</sub> and cheese yield .....	66
5.8. Conclusion.....	67
5.9. Acknowledgments .....	68
<b>6. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2.....</b>	<b>69</b>
6.1. Contributions de l'étudiante à l'article 2. ....	69
6.2. Article 2: Enrichment of cheese in bioactive lipophilic compounds.....	70
6.3. Résumé .....	71
6.4. Abstract .....	72
6.5. Introduction.....	73
6.6. Materials and methods .....	74
6.6.1. Materials .....	74
6.6.2. Preparation of emulsions.....	75
6.6.3. Particle size analysis and physical stability of emulsions.....	76
6.6.4. Cheese making procedure and compositional analysis of cheese.....	77
6.6.5. Determination of recovery level of bioactives by HPLC analysis.....	77
6.6.6. Antioxidant properties of cheese .....	78
6.6.6.1 Antiradical properties .....	78
6.6.6.2. Lipid oxidation .....	78
6.6.7. Determination of chemical stability of cheese.....	78
6.6.8. Statistical analysis.....	79
6.7. Results and discussion .....	79
6.7.1. Particle size analysis and physical stability of the emulsions.....	79
6.7.2. Retention and stability of lipophilic agents in cheese.....	81
6.7.2.1. Recovery level of vitamins E, A and CoQ <sub>10</sub> individually in cheese matrix..	81
6.7.2.2. Co-encapsulation of vitamin A, E and CoQ <sub>10</sub> and recovery yield in the cheese matrix.....	83
6.7.3. Antiradical properties of cheese .....	84
6.7.4. Lipid oxidation .....	85
6.7.5. Analysis of the chemical stability of cheese by ATR-FTIR.....	86
6.7.6. Effect of fortification on cheese composition and cheese yield .....	90
6.8. Conclusion.....	91

6.9. Acknowledgments .....	92
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>93</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 3.1.</b> Émulsions analysées au cours de l'optimisation de la formulation.....	37
<b>Tableau 4.1.</b> Effet des conditions d'homogénéisation sur la stabilité des émulsions.....	44
<b>Tableau 4.2.</b> Effets combinés d'homogénéisation et de différents types de lécithine sur la stabilité des émulsions.....	45
<b>Tableau 4.3.</b> Évolution de la viscosité sous l'effet d'optimisation de l'émulsion.....	47
<b>Table 6.1.</b> Types and composition of developed emulsions.....	75
<b>Table 6.2.</b> Concentration of MDA in cheeses fortified with omega-3 fatty acid in the presence or absence of antioxidant during manufacture and storage .....	86
<b>Table 6.3.</b> Assessment of the typical vibrational bands to functional groups of cheese according to FTIR analysis .....	87
<b>Table 6.4</b> Retention of lipids, proteins and corrected yield of fortified cheeses with developed emulsions (ECL and EC) compared to control.....	90



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 2.1.</b>	Phénomènes d'instabilité des émulsions.....	7
<b>Figure 2.2.</b>	Structure chimique de la molécule de phosphatidylcholine.....	11
<b>Figure 2.3.</b>	Structure chimique des acides gras $\alpha$ -linoléique (ALA) et linoléique (LA).....	13
<b>Figure 2.4.</b>	Structure chimique et dénomination des différents types de vitamine A.....	20
<b>Figure 2.5.</b>	Structure chimique et dénomination de quatre isoformes de tocophérols.....	22
<b>Figure 2.6.</b>	Réaction de transformation de l'ubiquinone en ubiquinol.....	24
<b>Figure 4.1.</b>	Modification de la viscosité de l'émulsion optimisée en fonction du taux de cisaillement.....	46
<b>Figure 4.2.</b>	Effet des agents bioactifs sur la stabilité d'émulsion.....	48
<b>Figure 5.1.</b>	Physical stability of emulsions with and without CoQ <sub>10</sub> , expressed as a percentage of syneresis.....	63
<b>Figure 5.2.</b>	Microscopic views of emulsions formulated with flaxseed oil at different storage times during accelerated aging measurements at 40°C.....	64
<b>Figure 5.3.</b>	FTIR spectrum of developed emulsion and band assignments related to its components, in the region 4000-650 cm <sup>-1</sup> .....	65
<b>Figure 5.4.</b>	Evolution of emulsions stability under the effect of heat stress at 40°C.....	66
<b>Figure 5.5.</b>	Effect of the fortification by CoQ <sub>10</sub> on cheese composition and cheese yield.....	67
<b>Figure 6.1.</b>	Physical stability of emulsions with and without CoQ <sub>10</sub> , expressed as a ratio in percentage of serum height to total simple height from transmission profiles at different time.....	81
<b>Figure 6.2.</b>	Recovery level (RL) and stability of vitamins E (a), A (b) and CoQ <sub>10</sub> (c) in cheese during manufacture and storage.....	82
<b>Figure 6.3.</b>	Antiradical activity of fortified cheeses during manufacture and storage compared to control.....	84
<b>Figure 6.4.</b>	FTIR spectrum of enriched cheese with omega-3 compared to control.....	87

**Figure 6.5.** Chemical stability of fortified cheeses during manufacture and storage compared to control.....89



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : Acide arachidonique

ADH : Docosa-hexainoïque acide

AEP : Eicosapentanoïque acide

AGPI : Acides gras polyinsaturés

ALA : Alpha-linolénique acide

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ATR-FTIR : Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy

CMP : Caséinomacropeptide

CoQ<sub>10</sub> : Coenzyme Q<sub>10</sub> (ubiquinon)

CoQH<sub>2</sub> : Coenzyme Q<sub>10</sub> (ubiquinol)

CY: Cheese yield

e<sup>-</sup>: Electron

E/H : Émulsion eau-dans-huile

E/H/E : Émulsion eau-dans-huile-dans-eau

EAI : Indice d'activité d'émulsifiante (*Emulsifying activity index*)

ECL : Émulsion stabilisée par le caséinate de calcium en présence de la lécithine

ECLA : ECL contenant de la vitamine A

ECLCoQ : ECL contenant de la CoQ<sub>10</sub>

ECLE : ECL contenant de la vitamine E

ECLV : ECL contenant les vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub>

ESI : Indice de stabilité d'émulsifiante (*Emulsifying stability index*)

EC : Émulsion stabilisée par le caséinate de calcium

ECA : EC contenant de la vitamine A

ECCoQ : EC contenant de la CoQ<sub>10</sub>

ECE : EC contenant de la vitamine E

ECV: EC contenant les vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub>

FRS : Free radical scavenging

H/E : Émulsion huile-dans-eau

H/E/H : Émulsion huile-dans-eau-dans-huile

LA : Linoléique acide

LDL : Lipoprotéines de basse densité (*Low-density lipoprotein*)

MDA : Malondialdéhyde

OW: Oil-in-water emulsion

PC: Phosphatidylcholine

RL: Recovery level

RP- HPLC: Reversed phase high-performance liquid chromatography

TE: Trolox equivalent

# 1. INTRODUCTION

L'incorporation des molécules bioactives dans des systèmes alimentaires présente beaucoup d'intérêt pour le développement d'aliments fonctionnels. Le fromage Cheddar, très populaire au Canada et en Amérique du Nord est reconnu pour sa densité nutritionnelle. Son enrichissement en agents bioactifs lipophiles pourrait avoir non seulement des avantages potentiels sur la santé humaine, mais aussi pourrait permettre de développer un fromage fonctionnel et d'accroître la consommation des produits laitiers au Canada. Cependant, la prestation des composés bioactifs par voie alimentaire est un défi majeur. Beaucoup de composés bioactifs sont inactivés ou exposés à la dégradation au cours de la fabrication et de l'entreposage du fromage. Un problème particulier est la rétention des agents bioactifs dans le caillé, étant donné que les pertes dans le lactosérum sont élevées, jusqu'à 95% (Law, 2001). En outre, l'impact de la fortification sur la saveur, l'apparence et la texture des produits doit être négligeable. Le développement de véhicules protecteurs susceptibles de maintenir l'activité et d'accroître l'incorporation de ces molécules bioactives permet de pallier ces problèmes. Les émulsions classiques huile dans l'eau (H/E) sont des systèmes spécifiquement conçus pour l'encapsulation et la délivrance des lipides bioactifs (McClements *et al.*, 2000). Ces émulsions peuvent être fabriquées à partir d'émulsifiants et de phases huileuses de grade alimentaire en utilisant des techniques simples et non dispendieuses, applicables au niveau industriel (McClements *et al.*, 2007).

Le présent programme de recherche a été entrepris dans le but d'enrichir le fromage Cheddar en composés bioactifs lipophiles, tels que des acides gras omega-3, des vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub>. Ces lipides bioactifs ont été choisis car ils jouent un rôle très important dans le métabolisme humain et dans la prévention et le traitement de nombreuses pathologies. Selon Santé Canada (2008) les acides omega-3 jouent un rôle central dans la prévention des maladies cardiovasculaires, maladies les plus mortelles au Canada. Ce ministère fédéral recommande de limiter le taux des acides gras *trans* à 2 - 5% dans les produits alimentaires (Santé Canada, 2009). La substitution de matières grasses du lait par l'huile de lin serait une opportunité de diminuer le rapport oméga-6/oméga-3 et la quantité d'acides gras *trans* dans le fromage et en résultat, de contribuer à l'amélioration de la santé humaine. L'incorporation de l'huile de lin dans les produits alimentaires est un moyen efficace d'augmenter l'apport d'acides gras omega-3 (Herchi *et*

*al.*, 2012; Oomah, 2001). Cette huile qui contient environ 58% d'acide  $\alpha$ -linoléique est reconnue comme l'une des plus grandes sources d'oméga-3 dans la nature (Zhao *et al.*, 2007). Parmi ses effets positifs sur la santé humaine, la réduction du risque de maladies cardiovasculaires est de plus en plus reconnu (Zhao *et al.*, 2007). L'association originale d'huile de lin et des vitamines ayant des propriétés antioxydantes pourrait conduire à une synergie d'action et à une meilleure efficacité grâce à leurs mécanismes d'action complémentaires. L'huile de lin riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) est un milieu excellent de solubilisation des vitamines A, E et CoQ<sub>10</sub>, tandis que ces derniers étant des antioxydants véritables protègent les gras contre la peroxydation. De plus, des recherches récentes ont montré que l'incorporation des agents bioactifs lipophiles sous forme de particules émulsifiées améliore la biodisponibilité des nutriments lipidiques lors du transit gastro-intestinal (Couedelo *et al.*, 2011; Nik *et al.*, 2011).

### **1.1. Hypothèse et objectifs**

**Hypothèse.** L'encapsulation de composés bioactifs dans des particules émulsifiées permettrait d'augmenter significativement leur rétention dans le fromage et de maintenir leur fonctionnalité au cours de la fabrication et de l'entreposage.

Les **objectifs** de recherche proposés étaient:

1. Développer une crème fonctionnelle d'encapsulation adaptée à la fois aux caractéristiques des composés bioactifs lipophiles et aux exigences des procédés de transformation fromagère.
2. Évaluer la rétention et la conservation de l'activité des composés immobilisés pendant la fabrication et l'entreposage du fromage.
3. Évaluer l'effet de l'encapsulation des agents lipophiles sur la composition et le rendement du fromage.

### **1.2. Présentation du mémoire**

Ce mémoire est présenté sous forme d'articles scientifiques conformément aux exigences de l'INRS et du programme de maîtrise en Microbiologie Appliquée. La première partie de ce document, commence par l'étude bibliographique sur les émulsions simples avec la description de leur stabilité sous l'aspect d'optimisation de

leur formulation en présence du caséinate de calcium, l'huile de lin et de la lécithine. Puis la revue continue avec la description des agents bioactifs (omega-3, vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub>), leur importance métabolique et leur compatibilité ; la fabrication de fromage et le rendement fromager. Cette partie poursuit avec une description succincte des méthodes utilisées au cours de cette étude. La discussion sur l'ensemble des résultats est axée avant tout sur la formulation et la stabilité des émulsions développées en présence ou absence de la lécithine et de la CoQ<sub>10</sub> et en relation avec les résultats exposés sous forme d'articles. Des conclusions générales ainsi que des perspectives pour de futures études sont énoncées à la fin de cette partie du manuscrit. Les résultats présentés par articles forment la deuxième partie de ce mémoire.



## 2. REVUE DE LITTÉRATURE

### 2.1. Émulsions alimentaires

#### 2.1.1 Aspect général

Les émulsions sont des systèmes hétérogènes largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour l'encapsulation et la délivrance des molécules bioactives (Husain *et al.*, 1986). Elles sont formées de deux liquides immiscibles dispersés l'une dans l'autre sous forme de fines gouttelettes (Brochette, 1999; Dickinson *et al.*, 1982; McClements, 2007a). La substance qui forme des gouttelettes dans une émulsion est dénommée la phase dispersée, tandis que le liquide qui entoure les particules dispersées est appelé la phase continue. Le diamètre des gouttelettes peut varier entre 0.1  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$  (McClements, 2007a).

Il existe plusieurs types d'émulsions. Une émulsion simple huile-dans-l'eau (H/E) consiste en une huile dispersée dans de l'eau, tandis qu'une émulsion eau-dans-l'huile (E/H) correspond à de l'eau qui est dispersée dans de l'huile (Brochette, 1999; McClements, 2007a). Le lait et la mayonnaise sont deux exemples d'émulsions H/E et le beurre, la margarine sont des émulsions E/H (Coupland *et al.*, 1996; Genot, 2010). Plus récemment, les émulsions doubles ou multiples commencent à être appliquées dans le domaine agroalimentaire pour l'encapsulation de vitamines ou de probiotiques (Fustier *et al.*, 2010; Pimentel-González *et al.*, 2009). Ces sont des émulsions dans des émulsions. La dispersion d'une émulsion E/H dans une phase aqueuse (H) donne une émulsion E/H/E et à l'inverse, la dispersion d'une émulsion H/E dans une phase huileuse (H) donne une émulsion H/E/H (De Luca *et al.*, 1991; Garti *et al.*, 1998; McClements, 2007a). Cependant, peu de produits à base d'émulsions doubles sont commercialisés à ce jour.

Les émulsions sont thermodynamiquement instables, mais il est possible de former des émulsions stables cinétiquement pour une période de temps raisonnable, en utilisant des forces mécaniques intensives et/ou molécules amphiphiles appelées tensioactifs ou émulsifiants (Coupland *et al.*, 1996; McClements, 2007a). Les parties hydrophiles et hydrophobes des composés tensioactifs possèdent de l'affinité respectivement pour la

phase hydrophile ou lipophile de l'émulsion (McClements, 2004). Grâce à leur structure chimique, les composés tensioactifs ont tendance à s'adsorber aux interfaces huile/eau et diminuer l'énergie libre du système (Genot, 2010). Ils permettent de diminuer la tension interfaciale afin de faciliter l'augmentation de l'aire interfaciale lors du processus d'homogénéisation des émulsions (Walstra, 1993). Les gouttes dispersées vont interagir via la phase continue. Les molécules tensioactives tendent de réduire les interactions attractives de van der Waals et de déplétion entre les gouttelettes et stabilisent les interactions répulsives, de types électrostatiques ou stériques qui maintiennent les gouttes dans un état dispersé en limitant leur rapprochement (Tcholakova *et al.*, 2006).

En agroalimentaire, deux groupes de composés tensioactifs sont utilisés: émulsifiants à faible poids moléculaire et les émulsifiants macromoléculaires, qui sont des polymères naturels (p. ex. protéines) ou synthétiques (p. ex. polyricinoléate de polyglycérol). Le premier groupe rassemble les émulsifiants ioniques, non ioniques et amphotères dont font partie les phospholipides (Charalambous *et al.*, 1989; Coupland *et al.*, 1996; Myers, 2005).

### **2.1.2. Déstabilisation des émulsions**

Les émulsions sont des systèmes métastables. Leur équilibre thermodynamique correspond à la séparation macroscopique des phases huileuse et aqueuse. Les principaux mécanismes de déstabilisation des émulsions sont le crémage, la sédimentation, la floculation, la coalescence, le mûrissement d'Ostwald et inversion de phase (McClements, 2005; Walstra, 1993) (**Figure 2.1**).

Les phénomènes de crémage ou de sédimentation sont entraînés par la différence de densité entre les phases huileuse et aqueuse. Les gouttelettes d'huile ayant une densité plus faible que la phase aqueuse remontent lentement à la surface et favorisent le crémage alors que la sédimentation mène les gouttelettes à se déposer dans le fond par leur plus forte densité (McClements, 2007a; Robins, 2000). La vitesse du crémage ou de sédimentation des particules de gras est exprimée par la loi de Stokes (Robins, 2000). Cette vitesse peut être diminuée en réduisant la taille des gouttes, en diminuant la différence de masse volumique entre les deux phases ou en augmentant la viscosité de la phase continue (McClements, 2004).



La floculation est un phénomène d'agrégation entre deux ou plusieurs gouttelettes de gras, due aux interactions attractives et suppression des charges de surface des gouttelettes (McClements, 2007a). Ce phénomène peut être limité par une augmentation des répulsions stériques et électrostatiques ou par la limitation du crémage et de la sédimentation. Les agents tensioactifs ioniques sont capables de diminuer les interactions attractives et prévenir la floculation (Dickinson *et al.*, 1997)

La fusion irréversible de deux gouttes adjacentes de phase dispersée conduit à la coalescence. Ce phénomène résulte de la rupture du film interfacial entre les gouttes fusionnées et entraîne une augmentation du crémage et une séparation de phase (McClements, 2007a; Tcholakova *et al.*, 2006).

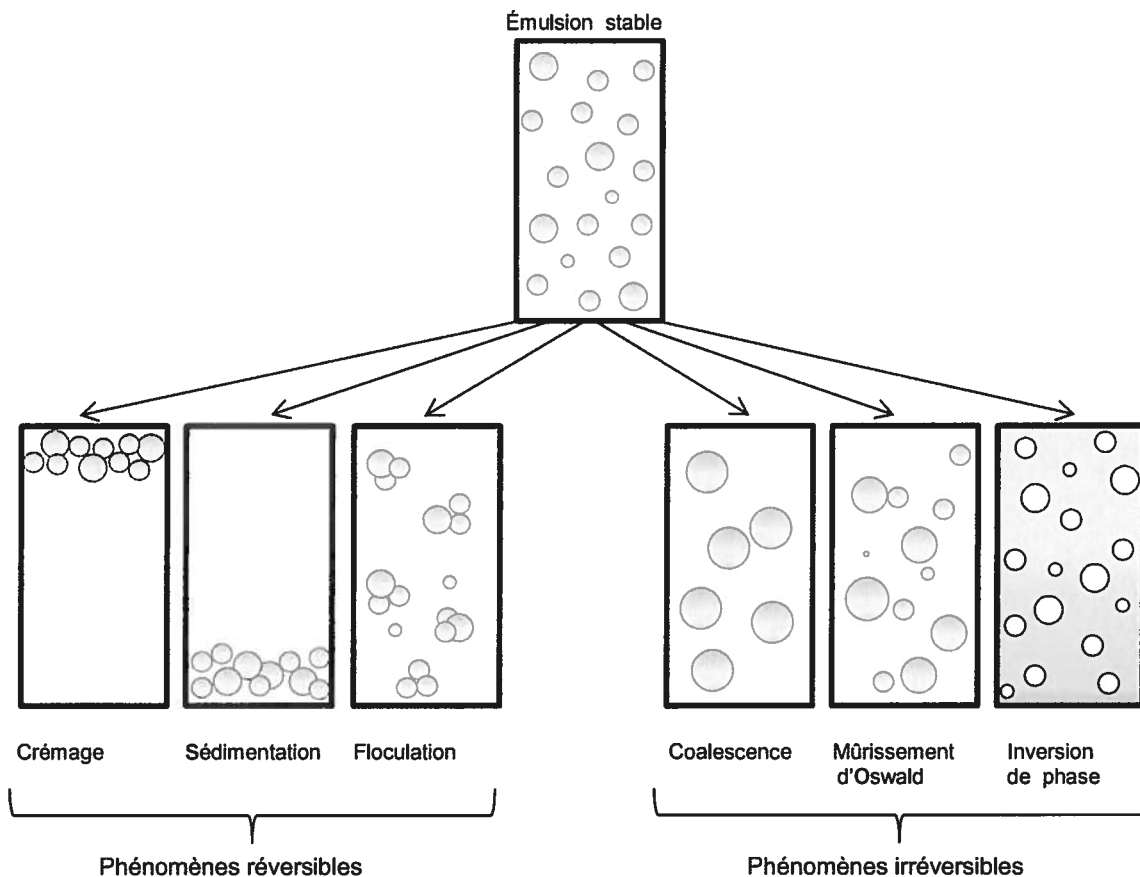


Figure 2.1: Phénomènes d'Instabilité des émulsions.

Le mûrissement d'Ostwald est un phénomène irréversible et représente un flux de matière des petites gouttelettes vers les grosses, au travers de la phase continue. La granulométrie se modifie, car les petites gouttes disparaissent au profit des grosses. Ce phénomène est négligeable dans les émulsions alimentaires, car la solubilité des

triglycérides dans l'eau est si faible que les taux de transport de masse sont insignifiants (Dickinson *et al.*, 1999b; Hemar *et al.*, 1999; McClements, 2007a).

Une inversion de phase a lieu quand la phase continue d'une émulsion devient la phase dispersée, et inversement (McClements, 2007a).

### 2.1.3. Formulation d'émulsions

La formation d'une émulsion stable est un processus assez compliqué. Dans ce but, il faut prendre en compte les variables de composition du milieu, les variables de procédé et les conditions dans lesquelles sont fabriquées ces émulsions (p. ex. température, pH) (Salager *et al.*, 2006). Les variables de composition correspondent à la nature et aux pourcentages relatifs des trois principales composantes du système: la phase aqueuse, la phase huileuse et les agents tensioactifs. Les variables de processus répondent à tous les paramètres qui peuvent influencer sur le système: l'ordre d'incorporation des constituants, le type, la vitesse et la pression d'homogénéisation (Salager *et al.*, 2001). Tous ces variables déterminent la qualité et la stabilité de l'émulsion.

L'émulsion huile-dans-eau constitue le système modèle retenu pour notre projet. Ce système, largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire, a été spécifiquement conçu pour l'encapsulation et la préservation des bioactifs lipophiles (McClements *et al.*, 2000). On va décrire ci-dessous comment les variables mentionnés peuvent influencer la stabilité des émulsions via les composées que nous serons amenés à utiliser dans cette étude.

**Protéines laitières.** Les protéines laitières en particulier les caséinates sont utilisées dans la fabrication des émulsions en tant qu'agents tensioactifs efficaces (Dickinson, 1999; Dickinson, 2006). Elles se sont aussi révélées être des protecteurs véritables contre l'oxydation et vecteurs potentiels pour les substances nutraceutiques lipophiles (Hu *et al.*, 2003; McClements *et al.*, 2000; Semo *et al.*, 2007).

Les protéines de caséine forment un complexe renfermant quatre phosphoprotéines: les caséines  $\alpha_{S1}$  /  $\alpha_{S2}$  /  $\beta$  et  $\kappa$  (Fox, 2001; Ye *et al.*, 2000). Ces protéines riches en acides aminés apolaires ont des zones prédominantes hydrophobes qui sont séparées par des zones plutôt hydrophiles. Cette organisation structurelle leur permet de s'adsorber rapidement à l'interface huile-eau pendant l'émulsification et de stabiliser les émulsions H/E à long terme (Dickinson, 1999). Elles, par le jeu d'interactions entre différentes

molécules, participent à la formation d'une couche homogène, résistante à la coalescence et préviennent la floculation des gouttelettes d'huile grâce à un encombrement stérique et à la répulsion électrostatique (Dickinson *et al.*, 1990; Tcholakova *et al.*, 2002).

La composition et la teneur en protéines adsorbées à la surface des gouttelettes d'huile jouent un rôle important dans la stabilité des émulsions (Kentaro *et al.*, 2010). Selon Dickinson (2006), la quantité de protéines adsorbées à la surface des gouttelettes et la qualité du solvant utilisé déterminent les forces répulsives et jouent un rôle sur la stabilité des émulsions. L'ajout d'une quantité insuffisante de caséinate ne permettra pas la saturation de l'interface huile-eau pendant l'émulsification (Dickinson, 1997a). L'émulsion résultante sera instable à la floculation et sera accompagnée d'une coalescence partielle (Dickinson, 1997a). Dans ce cas, les chaînes polypeptidiques seront isolées les unes des autres et prendront une conformation de type "champignon". Lorsque la quantité de protéines adsorbées est élevée, les interactions latérales changent l'extension des chaînes et elles se compénètrent en adoptant une conformation de type "brosse". Par conséquent, un excès en caséinate conduit à une diminution de la stabilité vis-à-vis du crémage. Il existe donc une concentration optimale de protéines qui permet d'obtenir la plus grande stabilité (Dickinson, 1999; Dickinson *et al.*, 1999a; Dickinson, 2003; Philip *et al.*, 2003).

Selon Dickinson (1999), la caséine  $\alpha$ -contribue faiblement à la stabilisation stérique, car elle forme une couche mince (<3 nm) à interface huile-eau. En revanche, la  $\beta$ - et la  $\kappa$ -caséine pourront déployer une partie de leur chaîne dans la phase aqueuse, et engendrera une couche externe d'environ 10 nm conduisant à une stabilisation stérique efficace.

La qualité de solvant affecte également les interactions répulsives. Un bon solvant favorise les contacts polymère-solvant (Dickinson, 2006). Quand deux surfaces sont proches, les chaînes de polymères sont compressées et perdent en partie leur liberté de mouvement. Il en résulte une répulsion d'origine entropique (Dickinson, 2006). Par contre, l'utilisation d'un mauvais solvant des polymères engendre des interactions plus attractives, les chaînes protéiques s'enchevêtrent et favorise la floculation des gouttelettes (Dickinson, 1997a).

Lorsque les émulsions sont stabilisées par les protéines laitières, une augmentation de la concentration protéique conduit également à une diminution de l'oxydation des lipides

(Ries *et al.*, 2010). De plus, selon Semo *et al.* (2007) le caséinate peut agir comme chélateur du fer en réduisant le taux de l'oxydation de plusieurs fois, même en présence de fer ajoutée dans le système.

Le caséinate sous forme des sels de sodium et de calcium est souvent utilisé dans la préparation des émulsions alimentaires. Bien que le caséinate de sodium soit un des meilleurs émulsifiants, le caséinate de calcium a été retenu pour cette étude. Les émulsions développées ont été conçues pour être utilisées dans la fabrication du fromage. Selon Gaygadhiev *et al.* (2011), les émulsions à base de caséinate de sodium inhibent le processus de coagulation présure du lait fromager. On suppose que l'utilisation de caséinate de calcium pourrait améliorer la coagulation du lait et l'équilibre ionique lors de la fabrication du fromage tout en ayant un effet positif sur le produit final.

**Lécithine.** La lécithine est la molécule émulsifiante la plus répandue dans la fabrication de produits alimentaires. La plus connue sous le nom lécithine est la phosphatidylcholine. La lécithine de soja est un mélange plus ou moins purifié de phospholipides : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylinositol (Joshi *et al.*, 2006). En général, les composés principaux de la lécithine sont les phosphatidylcholines, car il ne s'agit pas d'une seule molécule mais d'un groupe dont la composition en acides gras varie d'une molécule à l'autre. Du point de vue chimique, la PC comporte une partie hydrophobe constituée par les deux chaînes d'acides gras, et une partie polaire ou hydrophile constituée par la choline et le groupe phosphate (**Figure 2.2**). Grâce à cette structure, les lécithines vont stabiliser les émulsions en se positionnant à l'interface des émulsions H/E ou E/H (Joshi *et al.*, 2006). Selon Frankel (1998), cet arrangement des phospholipides détermine leur effet protecteur pour les huiles contre l'oxydation en présence d'oxygène. Judde *et al.* (2003) indiquent qu'un taux de 1% (p/p) de lécithine de soja présente un bon effet protecteur contre l'oxydation. Cependant, cet effet dépend de la composition en acides gras d'huiles et de la teneur en phospholipides de lécithines utilisées. De même, les lécithines favorisent l'activité d'autres antioxydants dans le système émulsionné et limitent la propagation des radicaux libres (Frankel, 2001). Un effet synergique entre les phospholipides et les tocophérols et/ou certains antioxydants phénoliques a également été observée (Judde *et al.*, 2003; Ramadan, 2012). En outre, les phospholipides aminés possèdent des propriétés de chélateur vis-à-vis des métaux pro-oxydant et peuvent former des produits de type Maillard avec des produits de peroxydation (Jewell *et al.*, 1980; King *et al.*, 1992). Des propriétés antiradicalaires ont également été attribuées à la fonction amine

des PC et PE (Saito *et al.*, 1997). Finalement, les phospholipides ont des propriétés antioxydantes déterminées par les types de groupes phosphorylés, la nature des acides gras et leurs caractéristiques thermodynamiques (Chen *et al.*, 1991; Pokorný *et al.*, 1981).

Les acides gras constituant les phosphatidylcholines de soja comportent une majorité d'AGPI dont 65% d'acide linoléique, de 6 à 8 % d'acide alpha-linolénique et de 10 à 15% d'acide oléique. Par conséquent, ces AGPI rendent les phospholipides à leur tour, susceptibles à l'oxydation (Passi *et al.*, 2004).

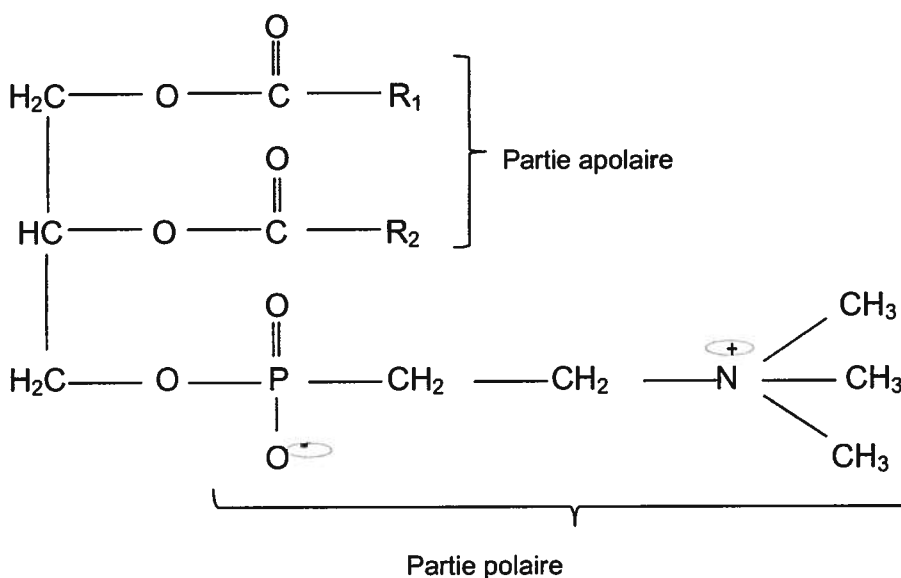


Figure 2.2 : Structure de la molécule de phosphatidylcholine.

Les phospholipides sont des constituants de toutes les membranes cellulaires et sont présents dans les aliments d'origine végétale et animale (Küllenbergh *et al.*, 2012). Dans l'organisme humain, elles sont synthétisées dans le foie et transportées vers d'autres organes et tissus par les lipoprotéines plasmatiques. Des études scientifiques montrent clairement que la lécithine de soja influence le profil des lipides sanguins d'une manière bénéfique. Elle réduit le niveau de cholestérol en modifiant l'activité des enzymes régulatrices impliquées dans le métabolisme des lipides ou en diminuant l'absorption de cholestérol (Cohn *et al.*, 2010; Gundermann, 1993). La supplémentation en divers phospholipides s'est avérée efficace pour le traitement de maladies inflammatoires (Hartmann *et al.*, 2009) pour l'inhibition des tumeurs et des métastases (Li *et al.*, 2006; Markert, 1968; Sakakima *et al.*, 2007) ainsi que dans le traitement des lésions hépatiques liés à l'alcool ou causées par les toxines et les infections virales (Jenkins *et*

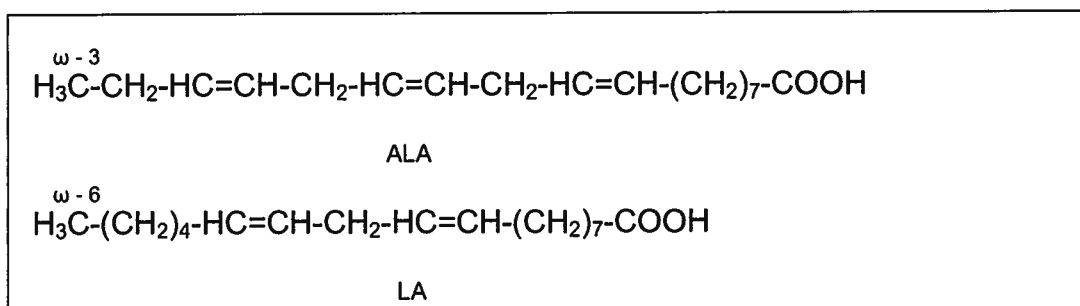
*al.*, 1982; Lieber *et al.*, 1990). En outre, la PC réduit le risque des maladies cardiovasculaires par la réduction de la concentration plasmatique d'homocystéine et a un effet modulateur positif sur la fonction du système immunitaire (Olthof *et al.*, 2005). Outre les effets mentionnés, la PC est un donateur de choline utile pour le traitement des maladies neurologiques. Elle est également connue pour son activité anti-stress, antifatique et pour sa faculté à stimuler les performances intellectuelles et la mémoire (Favrelière *et al.*, 2003).

Dans l'industrie alimentaire, la lécithine est utilisée comme émulsifiant, agent de texture ou un agent mouillant et modificateur de viscosité (Joshi *et al.*, 2006). En qualité d'émulsifiant, elle améliore les caractéristiques initiales des émulsions, diminue le taux de crémage dans le système et favorise la résistance des émulsions au mûrissement d'Ostwald (Comas *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 2010). Les recherches récentes ont démontré que les phospholipides sont des agents efficaces de stabilisation et d'encapsulation de divers composés nutraceutiques lipophiles et hydrophiles (Alexander *et al.*, 2012; Eskandar *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012).

Dans cette étude, comme les protéines, la lécithine a été utilisée en qualité d'émulsifiant. Certaines recherches démontrent que l'ajout simultané de ces deux émulsifiants dans la même émulsion conduit à une compétition et à un déplacement des protéines de l'interface eau/gras (Chen *et al.*, 1995; Krägel *et al.*, 1999). Il semble que ce processus est complexe et dépend surtout de la composition du système. À une teneur élevée de protéines ou d'agents tensioactifs, le comportement est commandé par la composante principale, tandis que dans un système plutôt mixte le processus d'adsorption est plus complexe et comprend une adsorption partielle qui dépend de l'interaction entre les protéines et les agents tensioactifs, ainsi que du réarrangement de protéines en fonction de la couverture de surface (Krägel *et al.*, 1999). En même temps, dans une étude portée sur l'adsorption compétitive entre les protéines du lait et des modèles de lipides membranaires du lait à l'interface huile-eau, les auteurs suggèrent que l'ordre de l'ajout des constituants et la procédure de mélange pendant la préparation des émulsions est d'une importance cruciale pour la performance d'émulsification et peut influencer l'adsorption à la surface de gouttelettes (Waninge *et al.*, 2005).

**Huile de lin.** L'huile de lin a été choisie dans cette étude, car elle est la source végétale alimentaire la plus riche en acide alpha-linolénique (ALA) (Bloedon *et al.*, 2004). Elle contient une faible quantité de gras saturés (9%), de 14 à 18% d'acide oléique,

monosaturé et 73% d'acides gras polyinsaturés (Cunnane *et al.*, 1993) Les acides gras essentiels caractéristiques sont l'acide linoléique (**Figure 2.3**), un oméga-3 (58%) et l'acide linoléique (LA), un oméga-6 (14%). Donc, l'huile de lin contient plus d'oméga-3 que d'oméga-6. Comme le ratio oméga-6/oméga-3 recommandé est entre 1 et 4 (Kris-Etherton *et al.*, 2002), l'utilisation de l'huile de lin est justifiée en cas de régime riche en oméga-6. Plusieurs sources d'information indiquent que les êtres humains ont un patrimoine génétique adapté à un régime alimentaire avec un ratio d'acides gras oméga-6/oméga-3 d'environ 1, tandis que dans les régimes occidentaux, ce ratio est de 15/1 à 16.7/1 (Eaton *et al.*, 1985; Simopoulos, 2004; Simopoulos, 2008). Des quantités excessives d'acides gras oméga-6 peuvent promouvoir la pathogenèse de nombreuses maladies, tandis que les niveaux accrus d'oméga-3 (un ratio oméga-6/oméga-3 plus petit) exercent des effets suppressifs. Dans la prévention secondaire des maladies cardio-vasculaires, le ratio de 4/1 a été associé à la diminution de 70% de la mortalité totale (Simopoulos, 2008).



**Figure 2.3 : Structure chimique des acides gras  $\alpha$ -linoléique (ALA) et linoléique (LA).**

Les acides linoléique et linoléique sont indispensables au fonctionnement de tous les organes, car le corps humain ne peut les synthétiser. Un apport alimentaire permanent en ces acides est donc nécessaire. Ils sont transformés en acides eicosapentanoïque (AEP) et docosa-hexainoïque (ADH) à chaîne plus longue par l'organisme. Il est suggéré qu'en fonction de ratio oméga-3/oméga-6, un taux de 5 à 18,5% d'acides linoléique peut être converti en AEP et ADH dans l'organisme humain (Emken *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 2004). Cependant, une diète riche en DHA et EPA limite la transformation d'ALA jusqu'à 2,8% (Burdge *et al.*, 2003). Tous ces acides sont des précurseurs d'eicosanoïdes, hormones autocrines, qui sont des médiateurs dans l'activité cellulaires au cours de nombreux processus : contraction des muscles lisses, processus inflammatoire, agrégation plaquettaire, sécrétion gastrique, etc (Simopoulos,

1999). A part de leur rôle énergétique majeur, les AGPI en tant de constituants structurales, règlent la perméabilité et la fluidité des membranes cellulaires. Ils sont aussi considérés comme des molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la transcription de gènes (Clarke *et al.*, 2002), Toutes ces propriétés des acides omega-3 déterminent leurs effets bénéfiques sur la santé humaine.

L'huile de lin est de plus en plus reconnue pour sa faculté de réduire les risques cardiovasculaire, inflammatoires, les maladies auto-immunes et d'améliorer le développement cérébrale et intellectuel des enfants et des adultes (Kew *et al.*, 2003; Lenzi Almeida *et al.*, 2011 ; Shahidi *et al.*, 2005; Simopoulos, 2008; Zhao *et al.*, 2007). De plus, il a été rapporté que les acides omega-3 de l'huile de lin ont une incidence sur la prévention et le traitement de cancers du sein et du côlon (Dwivedi *et al.*, 2005; Truan *et al.*, 2010).

L'incorporation d'huile de lin dans les matrices alimentaires est un moyen efficace d'augmenter l'apport en oméga-3 dans ces produits et d'améliorer le bien-être et la santé humaine (Herchi *et al.*, 2012; Oomah, 2001). Toutefois, l'huile de lin est très sensible à l'oxydation. L'emprisonnement d'huile de lin dans des capsules de gélatine contenant de la gomme arabique a permis d'obtenir une efficacité d'encapsulation de 84% et une stabilité élevée à 25°C (Liu *et al.*, 2010). En outre, la stabilité et la biodisponibilité de l'acide ALA a été bien améliorée après l'incorporation de l'huile de lin dans de particules émulsifiées (Couedelo *et al.*, 2011; Nik *et al.*, 2011). L'utilisation de molécules antioxydantes liposolubles telles que la vitamine E,  $\beta$ -carotènes et plus récemment la CoQ<sub>10</sub> ont été ajoutées dans les produits fortifiés en omega-3 afin de limiter la dégradation oxydative des lipides (Hughes *et al.*, 2012; Polak *et al.*, 2011; Pu *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2000).

Dans cette étude, l'huile de lin a constitué la phase dispersée des émulsions développées. La concentration en cette phase est caractérisée par la fraction volumique de la phase dispersée. Selon Brochette (1999) la fraction volumique de phase dispersée est défini à partir des volumes des phases dispersée (VD) et continue (VC) par la relation suivante :

$$\varphi = VD/VD+VC \quad (1)$$

La fraction volumique de la phase dispersée est en fonction des paramètres de formulation et des paramètres de procédé telles que la nature du tensioactif et des phases huileuse et aqueuse, la température, l'homogénéisation, l'ordre d'incorporation



etc. (Brochette, 1999; Salager *et al.*, 2006). En fonction du type d'homogénéisation utilisé et des conditions d'homogénéisation, on peut contrôler la taille des particules dispersées (Anihouvi *et al.*, 1912; McClements, 2005). Communément, dans une émulsion, les gouttelettes de phase dispersée n'ont pas une taille unique et sont caractérisées par leur diamètre moyen et par la distribution de leur taille (par exemple : monomodale ou bimodale). En fait, la stabilité d'une émulsion, ses propriétés optiques et rhéologiques, ainsi que ses attributs sensoriels sont la conséquence directe de la taille moyenne et de la distribution de taille des gouttelettes (Acosta, 2009; Qian *et al.*, 2011). Il est donc particulièrement important de mesurer de manière fiable et précise la taille des gouttelettes et leur dispersité, lors de la formulation d'une émulsion (McClements *et al.*, 2007).

#### **2.1.4. Procédés d'opération**

L'émulsification est le procédé de fabrication des émulsions qui nécessite un apport d'énergie et d'une façon générale, se réalise en deux étapes successives. Une étape de pré-émulsification qui dans le cas des émulsions H/E va conduire à une simple suspension des gouttelettes de gras dans la phase aqueuse et une étape d'homogénéisation destinée à réduire la taille des gouttes pour obtenir une émulsion stable avec des propriétés requises (Brochette, 1999).

Ces deux opérations s'effectuent avec différents mélangeurs et homogénéisateurs, y compris les mélangeurs à haut cisaillement, les homogénéisateurs à haute pression, les moulins colloïdaux, les homogénéisateurs à ultrasons et les homogénéisateurs à membrane (McClements, 2005; Walstra, 1993). Les caractéristiques physico-chimiques de la phase continue et dispersée ainsi que les propriétés finales requises de l'émulsion (la taille et la concentration des gouttelettes) déterminent le choix des homogénéisateurs et les conditions opératoires (McClements, 2005).

Les procédés et, en particulier, le protocole opératoire sont des éléments essentiels dans la formulation d'une émulsion. Le protocole opératoire fixe l'ordre et le mode d'introduction des constituants, les températures à respecter, les types d'émulsifications, le régime et le temps d'homogénéisation (Anihouvi *et al.*, 1912; Brochette, 1999). Avec les mêmes ingrédients, deux modes opératoires différents peuvent aboutir à deux

émulsions radicalement différentes. La taille et la distribution des gouttes peuvent varier en fonction de la dynamique d'introduction de la phase dispersée (Brochette, 1999).

Dans le cas d'encapsulation des agents bioactifs lipophiles, sensibles à la dégradation chimique (p. ex. les acides gras oméga-3, les caroténoïdes et l'acide  $\alpha$ -linoléique conjugué), il est nécessaire de contrôler les conditions d'homogénéisation afin d'éviter leur dégradation sous l'influence de divers facteurs comme la température élevée, les métaux, l'oxygène, la lumière (McClements *et al.*, 2007). Normalement, ces agents bioactifs sont dispersés dans la phase huileuse avant l'homogénéisation avec la phase aqueuse.

Dans cette étude un pré-mélange d'émulsion a été obtenu à l'aide d'un Ultra-Turrax T25. Cet appareil, constitué d'un stator et d'un rotor entraînés par un moteur, permet de fragmenter les gouttes d'huile, mais la distribution de taille des gouttes est généralement assez large (Anihouvi *et al.*, 1912). L'utilisation de la microfluidisation a permis de réduire la taille de gouttes d'huile. L'émulsion pré-mélangée a été soumise à haute pression dans une chambre d'interaction, dont la géométrie est conçue pour générer un intense cisaillement capable de réduire fortement la taille des globules gras (Anihouvi *et al.*, 1912; Tadros *et al.*, 2004).

Plusieurs résultats des recherches ont montré que la distribution de taille des gouttelettes semble être plus étroite et plus petite dans les émulsions microfluidisées que dans les cas d'homogénéisateurs à haute pression équipé avec une valve (Dalglish *et al.*, 1996; Jafari *et al.*, 2007; Paquin *et al.*, 1989). La microfluidisation a été utilisée avec succès pour la préparation d'émulsions laitières et pour l'encapsulation de différents agents bioactifs tels que le limonène, le  $\beta$ -carotène, la vitamine E (Chen *et al.*, 2004; Jafari *et al.*, 2006; Jafari *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008).

Autres facteurs, qui n'ont pas été mentionnés au-dessus, peuvent influencer la stabilité des émulsions. Par exemple, les émulsions stabilisées par des protéines sont particulièrement sensibles au pH (Dickinson, 2001; Ma *et al.*, 2009; McClements, 2004). Elles ont tendance à flocculer aux valeurs de pH proche de leur point isoélectrique ou quand les forces ioniques dépassent un certain niveau et les répulsions électrostatiques entre les gouttelettes ne sont pas assez fortes pour surmonter les diverses interactions attractives, p. ex. de van der Waals, hydrophobes ou de déplétion (McClements, 2004).

La création d'une émulsion d'un type donné avec une stabilité optimale et des propriétés granulométriques et rhéologiques spécifiques, présentant un taux de rétention

satisfaisant des biomolécules incorporées est un enjeu très complexe, qui dépend certes de la formulation utilisée, du protocole de préparation et des procédés mis en œuvre (Salager *et al.*, 2001). Cette nouvelle discipline tente de maîtriser l'infinité de possibilités existantes afin de préparer des produits répondant aux exigences des consommateurs.

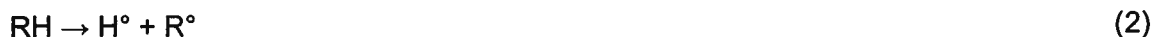
## 2.2. Oxydation des lipides

La peroxydation des lipides est un processus de détérioration majeur des aliments touchant à la fois leurs propriétés biochimiques, nutritionnelles et sensorielles tout au long de la chaîne alimentaire (Yanishlieva *et al.*, 2001). L'oxydation touche non seulement les acides gras insaturés, mais également d'autres composantes mineures présentes dans la fraction lipidique d'une denrée alimentaire comme les vitamines liposolubles, certains pigments, la CoQ<sub>10</sub> etc. (Cillard *et al.*, 2006). Nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques influencent la résistance des lipides à l'oxydation. Les facteurs intrinsèques sont la composition des lipides en acides gras (nombre et position d'insaturations), la présence de pro-oxydants et antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc.). Les facteurs tels que la pression partielle en oxygène, la température, la lumière, le pH et l'activité de l'eau sont des facteurs extrinsèques (Frankel *et al.*, 2000; Hsieh *et al.*, 1989). En fonction du milieu et des agents déclencheurs, on distingue trois mécanismes d'oxydation des lipides:

- l'auto-oxydation, dégradation thermique ou oxydative, déclenchée par la température, les ions métalliques ou les radicaux libres préalablement présents dans le système (Cillard *et al.*, 2006; Rolland, 2004);
- la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs (Mestdagh *et al.*, 2011);
- l'oxydation enzymatique initiée par la présence d'enzymes oxydative telles que la lipooxygénase ou la cyclooxygénase (Genot, 2010).

L'auto-oxydation représente une réaction en chaîne typique qui se déroule en trois étapes: l'initiation, la propagation et la terminaison (Cillard *et al.*, 2006; Frankel *et al.*, 2000; Rolland, 2004). Ce processus débute avec la formation d'un radical libre (R° - radical lipoylé) par l'élimination d'un hydrogène labile de l'acide gras insaturé, adjacent à la double liaison (réaction 1) (Cillard *et al.*, 2006; Devasagayam *et al.*, 2003). Le radical libre formé est très réactif, car il possède un électron non apparié et l'interaction avec

une molécule d'oxygène engendre la formation d'un radical peroxy ( $\text{ROO}^\circ$ ) instable (Frankel, 1998). Celui-ci extrait à son tour un hydrogène labile d'un acide gras insaturé intact et génère un hydroperoxyde ( $\text{ROOH}$ ) non radicalaire plus stable (3) et un nouveau radical lipoylé, capable d'initier la réaction de propagation en chaîne d'oxydation des lipides (Cillard *et al.*, 2006; McClements *et al.*, 2000).



L'étape de terminaison conduit à la disparition des radicaux libres accumulés et à la formation de composés stables non radicalaires (4, 5 et 6) (Cillard *et al.*, 2006; McClements *et al.*, 2000; Rolland, 2004).



Les radicaux lipoylés formés lors de l'étape d'initiation, peuvent aussi être transformés en diènes conjugués par un réarrangement des doubles liaisons (Devasagayam *et al.*, 2003). Les radicaux peroxydes peuvent également se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyle ( $\text{RO}^\circ$ ) et hydroxyle ( $\text{HO}^\circ$ ), des radicaux très réactifs et très toxiques (McClements *et al.*, 2000).

Toutes les espèces réactives créées au cours des phases d'initiation et de propagation forment les produits primaires de la peroxydation des lipides. Ces produits sont très instables, très réactifs vis-à-vis des molécules biologiques telles que les protéines, les hydrates de carbone et l'ADN (Kanazawa *et al.*, 2000; Pokorny, 2003). Ils peuvent causer des modifications irréversibles au niveau structurelle et métabolique et représentent un danger réel pour la santé humaine (Genot, 2010). Selon Halliwell (1991) la majorité des pathologies sont liées à la formation progressive d'espèces radicalaires. Cependant, les produits primaires n'affectent pas les qualités olfactives et gustatives des aliments. En présence de traces de métaux ou sous l'effet de la chaleur ces produits sont rapidement décomposés en produits secondaires souvent volatils: aldéhydes, alcools, cétones, acides (Coupland *et al.*, 1996; Devasagayam *et al.*, 2003). Ces

composés sont responsables des odeurs caractéristiques aux aliments oxydés (Frankel *et al.*, 2000; McClements *et al.*, 2000).

Dans les émulsions, l'oxydation des lipides émulsionnés peut se produire rapidement en raison de l'existence d'une grande surface de contact entre la phase huileuse et la phase aqueuse (Genot, 2010). Ce phénomène est initié à l'interface de ces deux phases et est influencé par la présence de pro-oxydants et antioxydants ainsi que par les interactions entre les différentes composantes du système (Lethuaut *et al.*, 2002; McClements *et al.*, 2000).

De plus, le choix des antioxydants pour un système émulsionné est un défi majeur, car leur comportement dans l'émulsion est très différent de celui en phase continue de lipides (Frankel *et al.*, 1994). Selon le paradoxe polaire de Porter (Porter, 1993) l'antioxydant hydrophile est plus efficace dans la phase lipidique continue alors que l'antioxydant lipophile est plus efficace dans un système émulsionné (Frankel, 2001; Lucas *et al.*, 2010). En conséquence, l'antioxydant lipophile aurait plus d'affinité pour l'interface huile-eau et une meilleure protection contre l'oxydation des lipides dans les émulsions. En revanche, l'antioxydant polaire se trouverait préférentiellement au niveau des interfaces huile-air et serait plus efficace dans la phase lipidique continue (Frankel, 2001). En outre, l'activité des antioxydants dans les émulsions est en fonction de certains facteurs, tels que la nature et les caractéristiques de l'agent émulsifiant (Mei *et al.*, 1998), la composition chimique et les propriétés physico-chimiques des phases aqueuse et lipidique (Coupland *et al.*, 1996; Mancuso *et al.*, 1999; Mei *et al.*, 1998) ainsi que de facteurs extrinsèques, comme la température et la pression. En ce qui concerne la phase dispersée, l'importance principale est accordée à sa concentration et à son état physique, à la taille des gouttelettes, ainsi qu'aux caractéristiques chimiques et physiques de la couche interfaciale, comme la composition, l'épaisseur et la charge (Frankel *et al.*, 2000; Lethuaut *et al.*, 2002; McClements *et al.*, 2000).

### 2.3. Vitamine A

Dans l'organisme humain, la vitamine A (**Figure 2.4**) se trouve sous différentes formes chimiques en fonction de son emplacement et de sa fonction : rétinol, rétinal (dans la rétine), acide rétinoïque (dans les os et les muqueuses) ou palmitate de rétinyle (réserves stockées dans le foie) (Blomhoff *et al.*, 2006; Theodosiou *et al.*, 2010).

La source de rétinol et de rétinal sont uniquement les aliments d'origine animale (foie, lait entier, œuf) (Blomhoff *et al.*, 2006; Iwata, 2009). Le bêta-carotène est la principale source de vitamine A dans les aliments d'origine végétale. L'hydrolyse de la bêta-carotène peut conduire à deux molécules de vitamine A (Blomhoff *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 1965). Dans la rétine, le rétinol peut être transformé en rétinal qui est impliqué dans la vision et facilite la vue dans l'obscurité. En présence de l'enzyme rétinol réductase, le rétinol est oxydé en acide rétinoïque (Napoli, 2011; Theodosiou *et al.*, 2010). Via un mécanisme semblable au mécanisme d'action d'hormones stéroïdes, l'acide rétinoïque adhère aux récepteurs nucléaires spécifiques et contrôle l'expression des gènes et la synthèse de certaines protéines (Napoli, 2011; Niles, 1998). Par conséquent, la vitamine A est essentielle à la différenciation et à la croissance cellulaire, au développement normal des os et des dents, à la reproduction et au bon fonctionnement du système immunitaire (Iwata, 2009; Mark *et al.*, 2006; Mora, 2008; Stephensen, 2001). Elle préserve la santé de la peau et des muqueuses (yeux, voies respiratoires, intestins, etc.) et protège l'organisme contre les infections (McCullough *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1997). De plus, la vitamine A et ses esters sont capables d'inhiber la carcinogénèse (Lippman *et al.*, 1994; Niles, 2000).

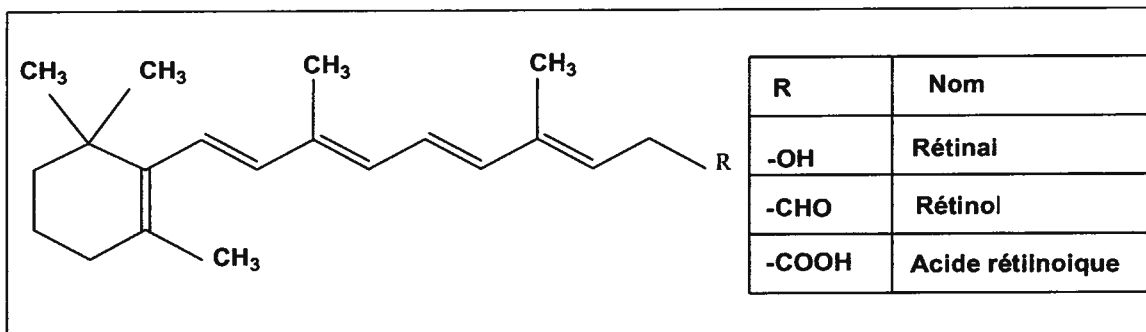


Figure 2.4 : Structure chimique et dénomination des différents types de vitamine A.

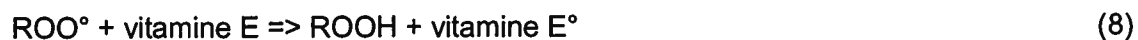
Les valeurs quotidiennes recommandées par Santé Canada (2010) sont de 600 à 900 µg/jour pour les adultes et de 300 à 600 µg/jour pour les enfants. Une carence comme une surdose en vitamine A a des impacts négatifs sur la santé. Un excès de cette vitamine est potentiellement plus dangereux que la plupart des autres vitamines, puisqu'elle peut s'accumuler au niveau du foie et devenir toxique. En outre, la vitamine A est pratiquement insoluble dans l'eau et est très instable en présence d'oxygène, de la lumière et de la chaleur (Gundersen *et al.*, 2001). Étant porteur de doubles liaisons

*trans* dans la chaîne isoprénoïde, elle subit des dégradations caractéristiques à des doubles liaisons conjuguées ce qui aboutit à la perte partielle ou totale de sa bioactivité. Ces réactions de dégradation comprennent l'isomérisation en cis isomères, la fragmentation moléculaire et l'oxydation chimique (Lee *et al.*, 2002). Compte tenu des nombreux effets bénéfiques de rétinol, divers stratégies d'encapsulation ont été utilisées pour résoudre le problème de décomposition (Eskandar *et al.*, 2009; Hung *et al.*, 2011). Selon Eskandar *et al.* (2009), une amélioration significative de la stabilité chimique de vitamine A à 4°C a été remarquée en présence de la lécithine, tandis qu'une dégradation exponentielle d'environ 50% de all-*trans*-rétinol a été notée en absence de la lécithine en moins d'une semaine.

## 2.4. Vitamine E

Cette vitamine liposoluble existe sous huit formes moléculaires : alpha-, bêta-, gamma-, delta-tocophérol et ainsi que l'alpha-, bêta-, gamma-, delta-tocotriénol (**Figure 2.5**). Toutes ces isoformes sont constituées par un noyau hydroxychromane et une chaîne latérale à 16 carbones qui se distinguent par le nombre et la position des groupements méthyles sur le noyau hydroxychromane et par leurs chaînes latérales saturées ou insaturées (Hacquebard *et al.*, 2008; Leger, 2000a).

Les tocophérols ont une double action bénéfique, comme vitamine (p. ex.  $\alpha$ -tocophérol) et comme antioxydante (Burton *et al.*, 1986; Leger, 2000a). L' $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus active et la plus abondante dans l'organisme. Elle intervient dans la protection des lipides comme antioxydant briseur de chaîne (Burton *et al.*, 1981; Laguerre *et al.*, 2007). L'activité antioxydante est attribuée au groupe phénolique du noyau hydroxychromane qui cède un hydrogène au radical peroxyde ou alkoxyde et se transforme en radical tocophéryle (vitamine E°) (Leger, 2000a).



Le radical formé doit être assez stable pour bloquer la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation des réactions en chaîne. Il se transformera en composé non radicalaire ou en autres composés de dimérisation ou de polymérisation (Cillard *et al.*, 2006).

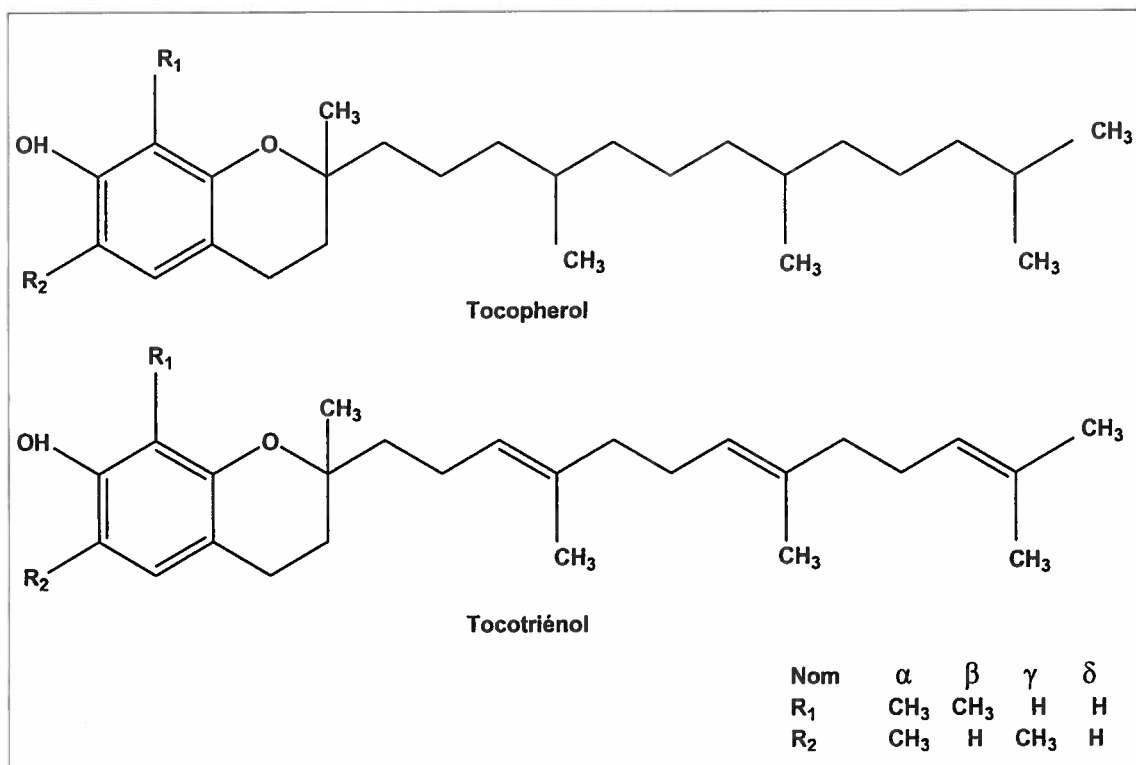


Figure 2.5 : Structure chimique et dénomination de quatre isoformes de tocophérols.



Cet antioxydant engendre une phase de latence qui va ralentir ou stopper la peroxydation lipidique. Cette phase va persister tant que l'antioxydant n'est pas consommé (Laguerre *et al.*, 2007).

Étant un fort antioxydant, l' $\alpha$ -tocophérol protège les membranes cellulaires, les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les globules rouges, les acides gras insaturés et la vitamine A de l'action nocive des radicaux libres (Ingold *et al.*, 1993; Leger, 2000b). En limitant la propagation de la peroxydation des lipides, la vitamine E protège également les constituants cellulaires comme les protéines et les acides nucléiques (Duthie *et al.*, 1996; Poulin *et al.*, 1996). De plus, cette vitamine ralentit le processus de vieillissement cellulaire et diminue les risques cardiovasculaires (Leger, 2000b; Pezeshk *et al.*, 2000) et certaines maladies neuro-dégénérescentes (Etminan *et al.*, 2005), préviennent le cancer (Nomura *et al.*, 1997; Shklar *et al.*, 2000) et l'athérosclérose (Devaraj *et al.*, 1996; Leger, 2000a). Elle est également nécessaire à la reproduction



cellulaire et est indispensable à la bonne formation du fœtus (Evans *et al.*, 1922; Kasimanickam *et al.*, 2010; Landrier, 2011). Bien que plusieurs recherches ont démontré les effets bénéfiques de la supplémentation en vitamine E (supplémentation pharmaceutique) contre divers pathologies, les résultats d'autres études sur la vitamine E à forte dose sont plutôt contradictoires ou négatives (Bjelakovic *et al.*, 2008; Boothby *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2006). Plusieurs de ces études ont utilisé seulement la vitamine E ce qui a conduit à des résultats décevants. En revanche, des données plus convaincantes ont été obtenues lorsque la vitamine E avait été ajoutée à d'autres antioxydants tels que la vitamine C, CoQ<sub>10</sub> (Thomas *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 1996). En conclusion, la supplémentation en vitamine E devrait être étudiée en relation avec d'autres antioxydants et composés avec qu'elle peut interférer et engendrer des effets synergétiques ou négatives.

La vitamine E est une vitamine liposoluble non synthétisée par l'organisme, mais le foie peut la stocker, si elle est apportée en quantité suffisante par l'alimentation (Traber *et al.*, 1994). Les sources principales de vitamine E sont les noix, les céréales, le germe de blé, les huiles végétales, les fruits (banane, fraise, melon) et, dans une moindre mesure, les légumes à feuilles vertes (salade, épinard, chou) (Leger, 2000a). Les œufs, le poisson et la matière grasse du lait contiennent une très faible quantité de cette vitamine.

Selon Santé Canada (2010) l'apport nutritionnel recommandé en vitamine E pour les adultes est de 15 mg/jour et jusqu'à 7 mg/jour pour les enfants. Cette quantité de vitamine E peut être utilisée de façon continue sans aucun risque de souffrir d'effets indésirables. Néanmoins, il est important de souligner que la prise de vitamine E devrait également être associée à un apport suffisant en acides gras polyinsaturés (oméga-3), afin de favoriser sa biodisponibilité.

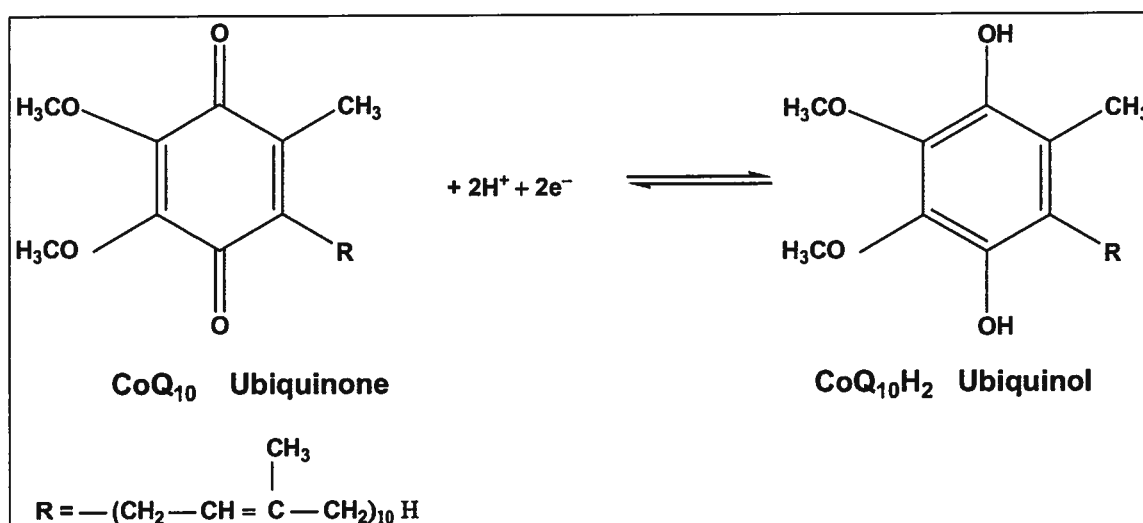
Dans l'industrie alimentaire, cette vitamine est utilisée en tant que micronutriment et antioxydant pour l'enrichissement de la farine et dans la préservation d'huile végétale et des produits carnés (Daly *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2012). La vitamine E est aussi utilisée dans l'encapsulation des composés bioactifs, tels que les acides gras oméga-3, l'acide linoléique conjugué, les vitamines, les caroténoïdes, les phytostérols afin d'inhiber leur dégradation oxydative, ou pour améliorer leur solubilisation et libération contrôlée (McClements *et al.*, 2007). L'immobilisation de l' $\alpha$ -tocophérol dans des particules de matières grasses de lait stabilisées par le caséinate de sodium semblait

conduire à sa protection contre la dégradation (Relkin *et al.*, 2009). Selon Shukat *et al.* (2011), la vitamine E a été incorporée dans des émulsions contenant l'huile de palme et des protéines de lactosérum en présence ou en absence de la lécithine. Après 2 mois de stockage, l' $\alpha$ -tocophérol a été protégé contre la dégradation chimique à 79, 77, 67% p/p dans les émulsions homogénéisées à 300, 800 ou 1200 bars, respectivement, lorsque les protéines ont été utilisées seules, au lieu de 66, 63, 48% p/p lorsque les protéines ont été utilisées en mélange avec des lécithines.

Afin de protéger la bioactivité de la vitamine E dans les compléments alimentaires et les aliments enrichis, elle est souvent utilisée sous forme estérifiée.

## 2.5. Coenzyme Q<sub>10</sub>.

La coenzyme Q<sub>10</sub>, surnommée également ubiquinone, est une substance naturelle, vitale pour le bon fonctionnement du corps humain. Son nom fait référence à son omniprésence dans tous les organismes vivants (Rosenfeldt *et al.*, 2007). Du point de vue chimique, la CoQ<sub>10</sub> est un composé liposoluble constitué d'un noyau quinone et une chaîne latérale formée de 10 unités isopréniques (**Figure 2.6**).



**Figure 2.6** : Réaction de transformation de l'ubiquinone en ubiquinol.

Elle est la partie non protéique d'au moins trois enzymes impliquées dans le transfert d'électrons et la production de l'énergie sur la chaîne respiratoire mitochondriale (Lenaz *et al.*, 1998; Pincemail *et al.*, 2008). Sans cette substance, nous n'aurions pas assez

d'énergie pour rester en vie. Chaque paire d'électrons traités par la chaîne respiratoire mitochondriale doit d'abord interagir avec la CoQ<sub>10</sub>. Comme ce processus est couplé à la phosphorylation oxydative, la CoQ<sub>10</sub> joue un rôle essentiel dans la production biologique d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) (Nik *et al.*, 2011; Quinn *et al.*, 1999). Pendant le transfert d'électrons elle passe par la forme ubiquinol (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> réduite), ubiquinone (CoQ<sub>10</sub> oxydée) et ubisemiquinone (forme intermédiaire). Seule la forme réduite possède des propriétés antioxydantes. La CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> prévient la formation des radicaux alkyls (L•) et peroxy (LOO•) et agit contre la propagation en chaîne du processus oxydant.



CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> est capable de régénérer la vitamine E à partir de l'α-tocopheryl radicale (Ingold *et al.*, 1993; Quinn *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1999), selon le mécanisme suivant:



Ce mécanisme semble être favorisé par rapport à la voie alternative de régénération par l'acide ascorbique (Turunen *et al.*, 2004).

Outre ces actions, la CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> réduit le radical perferryl et l'oxygène singlet, très toxiques et limite la formation des produits terminaux de la peroxydation des gras comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-nonéanal (4-HNE) (Johanknecht, 2002).

La production d'ATP (adénosine triphosphate), l'activité antioxydante et la capacité de stabiliser les membranes sont des propriétés qui permet à la CoQ<sub>10</sub> d'être un agent thérapeutique intéressant dans diverses pathologies: athérosclérose, hypertension et maladies cardiaques, les maladies de Parkinson et de Huntington, diabète, cancer ou encore certaines pathologies oculaires oxydatives (Bhagavan *et al.*, 2006; Feher *et al.*, 2005; Hodgson *et al.*, 2002; Littarru *et al.*, 2007b; Sakano *et al.*, 2006). En augmentant la production d'immunoglobulines, elle stimule l'immunité et améliore la fertilité en améliorant la motilité des spermatozoïdes et l'intégrité du liquide séminal (Folkers *et al.*, 1982; Lewin *et al.*, 1997; Littarru *et al.*, 2007b). Ce composé peut aussi réduire la fréquence des migraines, les nausées et le vieillissement lorsqu'elle est prise à titre préventif ou prophylactique (Hershey *et al.*, 2007; Rozen *et al.*, 2002; Sândor *et al.*, 2005).

Le corps humain peut fabriquer la CoQ<sub>10</sub> à partir d'un acide aminé, la tyrosine, mais il nécessite encore la présence de huit vitamines (surtout B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, niacine et acide folique) et de plusieurs oligo-éléments (Bentinger *et al.*, 2010; Turunen *et al.*, 2004). Le manque d'un ou plusieurs de ces nutriments, va entraîner une carence en CoQ<sub>10</sub>. De plus, la concentration de cette importante substance diminue progressivement avec le vieillissement (après l'âge de 21 ans) et sous influence de divers facteurs tels que le stress, l'effort physique extrême, la consommation accrue d'alcool ou de tabac (Elsayed *et al.*, 2001; Ely *et al.*, 2000). Certaines maladies et médicaments peuvent aussi avoir des répercussions sur le métabolisme de la CoQ<sub>10</sub>, mais une supplémentation alimentaire peut éviter une carence en CoQ<sub>10</sub> (Koumis *et al.*, 2004; Littarru *et al.*, 2007a).

Plusieurs recherches ont démontré que la CoQ<sub>10</sub> travaille en synergie étroite avec d'autres antioxydants contre le stress oxydant (Polak *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2001). En présence des vitamines A, C et E, cette coenzyme protège très efficacement les lipides plasmatiques et intervient avant ou après l'oxydation de la vitamine C afin d'épargner et de recycler l' $\alpha$ -tocophérol. La CoQ<sub>10</sub> agit avant la vitamine C quand l'oxydation est initiée par les radicaux hydrosolubles (superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), radical hydroxyle (OH<sup>·</sup>), hydroperoxyl (OOH<sup>·</sup>), etc.) et après quand ce processus est déclenché par des radicaux liposolubles (Shi *et al.*, 1999; Stocker *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1995). Lorsque la CoQ<sub>10</sub> est dissipée, la vitamine E suivi de la vitamine A commence à neutraliser les radicaux libres (Ingold *et al.*, 1993). Thomas *et al.* (2001) ont observé qu'une supplémentation en CoQ<sub>10</sub> et en vitamine E chez les rats a un effet antiathérogène plus efficace qu'une supplémentation individuelle en ces deux composés. L'effet antiathérogène s'explique par la capacité de ces composés de réduire la formation des plaques lipidiques sur la paroi interne des artères. Toutes ces données indiquent que ces antioxydants, plus particulièrement l' $\alpha$ -tocophérol et la CoQ<sub>10</sub> coopèrent comme des vrais alliés et sont très actifs contre la peroxydation des lipides (Pincemail *et al.*, 2003).

Aujourd'hui, il y a beaucoup de recherches qui mettent l'accent sur l'application pharmaceutique de la CoQ<sub>10</sub> (Balakrishnan *et al.*, 2009; Terao *et al.*, 2006). Cependant, son utilisation dans la fortification des produits alimentaires est limitée (Ozaki *et al.*, 2010). Dans la plupart des produits présents sur le marché, la CoQ<sub>10</sub> se trouve dans sa forme originale, en poudre ou en gélules (Liu *et al.*, 2012). Plus récemment, un groupe des chercheurs a développé une formulation très stable pour l'encapsulation de la

CoQ<sub>10</sub>. La CoQ<sub>10</sub> a été encapsulée dans des transporteurs lipidiques nanostructurés contenant de la lécithine et a révélé une bonne stabilité et un taux d'encapsulation élevés de 98% (Liu *et al.*, 2012). Polak *et al.* (2011) ont utilisé la CoQ<sub>10</sub> simultanément avec d'autres antioxydants dans le traitement de la viande, pour inhiber la formation de produits d'oxydation du cholestérol (COP). Dans cette étude, la combinaison la plus efficace pour l'inhibition de la formation des COP s'est avérée d'être la CoQ<sub>10</sub> avec l'acide ascorbique. Cette combinaison a diminué la formation des COP sous les limites de détection. D'autre part, d'un point de vue nutritionnel, la supplémentation en CoQ<sub>10</sub> serait une source importante de cette coenzyme.

## **2.6. Fabrication du fromage. Impact de la fortification sur la composition de fromage**

Selon les normes d'appellation fédérales, le fromage Cheddar est un produit de la coagulation du lait, soumis aux divers procédés afin d'obtenir un fromage dont les qualités physiques, chimiques et organoleptiques sont spécifiques à un fromage obtenu par cheddarisation (Ministère de la Justice, 2007).

### **2.6.1. Fabrication du fromage**

La fabrication du Cheddar comporte plusieurs étapes.

**Préparation du lait.** La qualité du fromage est le fruit de plusieurs opérations où interviennent de nombreux facteurs à tous les niveaux de la chaîne alimentaire (Fauconneau, 1989). La fabrication du fromage exige un lait frais, d'excellente qualité et exempt d'impuretés (Fox *et al.*, 1993). Tout d'abord, le lait collecté est conservé au froid pour freiner l'activité de la flore microbienne. Comme une durée de stockage plus longue peut détériorer les propriétés fromagères du lait (modification du caractère des protéines et des sels) un traitement thermique modéré à 72°C pendant 15 secondes peut être utilisé (Fauconneau, 1989; Pandey *et al.*, 2003; Rynne *et al.*, 2004). Cette technique appelé thermisation consiste à diminuer le développement de la flore psychotrope. En cas de nécessité, le lait est soumis à une étape de clarification afin d'éliminer les particules étrangères (de la poussière, des leucocytes, de la paille, des cellules épithéliales). Puis, différents moyens tels que la pasteurisation, la bactofugation et la microfiltration sont appliqués pour détruire ou réduire les bactéries capables

d'altérer la qualité du fromage (Fauconneau, 1989). La pasteurisation du lait peut être effectuée à 62,8 °C pendant 30 minutes ou à 72 °C pendant 15 minutes (Zottola *et al.*, 1991). Outre l'élimination des bactéries, la pasteurisation a aussi un effet sur les enzymes présentes dans le lait telles que, la lipoprotéine lipase, la phosphatase alcaline, la cathepsine D et le complexe plasmine/plasminogène (Grappin *et al.*, 1997). Suite à la pasteurisation, ces ferments sont activés ou désactivés (Benfeldt *et al.*, 1997; Benfeldt *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 1984). De plus, la pasteurisation a une incidence sur les propriétés finales du produit en altérant l'emprésurage, la synérèse, la dénaturation de protéines du sérum, la fermeté du caillé et la maturation du fromage (Grappin *et al.*, 1997; Hougaard *et al.*, 2010). La microfiltration et la bactofugation sont des moyens mécaniques destinés à séparer les bactéries thermotolérantes et notamment les spores formées par ces souches (Berger, 1969). Par exemple, *Clostridium tyrobutyricum*, une bactérie sporulante, en utilisant l'acide butyrique produit de l'hydrogène. Ce gaz confère un goût désagréable au fromage et détruit complètement sa texture (Bergere *et al.*, 1978).

Un traitement d'homogénéisation est parfois souhaitable afin de stabiliser l'émulsion des matières grasses dispersées dans la phase aqueuse. Nombreuses recherches ont démontré que l'homogénéisation réduit le diamètre des globules de gras, leur remontée à la surface et augmente aussi l'humidité du fromage (Emmons *et al.*, 1980; Green *et al.*, 1983; Olson *et al.*, 2004 ). Cependant, lorsque le lait est traité thermiquement (10 min à 90°C) et par la suite homogénéisé à une pression de 250 MPa, une augmentation du rendement du caillé de fromage d'environ 15% peut être obtenue, tandis que la fermeté du gel augmente et le temps de coagulation présure est réduit (Huppertz *et al.*, 2005). Selon Okpala *et al.* (2009), il est possible de contrôler et d'inactiver certains micro-organismes (*Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*), généralement trouvés dans les fromages, par l'homogénéisation à haute pression. Une nouvelle technique d'homogénéisation, la microfluidisation a permis d'obtenir un fromage cheddar plus blanc et plus doux, avec une meilleure rétention des graisses et une teneur en humidité plus élevée par rapport au témoin (Lemay *et al.*, 1994). Un diamètre moyenne de 265 à 640 nm des globules de gras, résultant de la microfluidisation, ne change pas le temps de coagulation du lait, la fermeté du gel et la microstructure des caillés (Tosh *et al.*, 1998).

Toutefois, les différents traitements rendent le lait moins apte à la coagulation. Afin de rétablir les équilibres protéiques et minéraux entre les phases soluble et micellaire du

lait, on utilise des traitements de correction tels que l'ajout de chlorure de calcium, le refroidissement, la maturation ou le préchauffage du lait (Fauconneau, 1989; Lawrence *et al.*, 1984; Pandey *et al.*, 2003). La maturation du lait est une étape essentielle, car l'ajout précoce des bactéries lactiques favorise leur répartition plus uniforme et la production de l'acide lactique. Pour la fabrication du fromage Cheddar, cette étape s'effectue de 30 à 60 minutes à 30°C (Lemay *et al.*, 1994; Pandey *et al.*, 2003).

L'objectif de la standardisation du lait fromager est d'harmoniser sa composition provenant de différentes sources. De plus, la composition du lait est variable en fonction des espèces, du type d'alimentation et des saisons (Lucas *et al.*, 2005). Le taux de matière grasse peut varier de 30 à 70 g par litre. L'ajustement du ratio protéines/gras du lait est réalisé à l'aide des crèmes et des protéines laitière et plus récemment avec des crèmes fonctionnelles (Fauconneau, 1989; Lobato-Calleros *et al.*, 2006). Les crèmes fonctionnelles sont des émulsions simples ou multiples contenant divers molécules nutraceutiques et d'autres ingrédients d'origine laitière. En particulier la standardisation fait correspondre le taux de matière grasse à celui exigé par la législation dans les produits laitiers.

A cette étape, il est possible d'ajouter différents colorants pour pallier à la couleur du fromage qui est déterminée par la couleur de la matière grasse du lait. Les colorants utilisés sont les carotènes ( $\beta$ -carotène, le  $\beta$ -apo-8'-caroténal) et l'orleana (colorant de l'anatto), la riboflavine, etc. (Ministère de la Justice, 2007).

**Coagulation.** En fromagerie, il y a trois types de coagulation du lait : enzymatique, acide et mixte. Afin de comprendre mieux ce mécanisme, on va premièrement décrire l'organisation structurale des caséines, protéines clés impliquées dans la coagulation du lait. Ces protéines sont composées d'un mélange de quatre phosphoprotéines: les caséines  $\alpha_{s1}/\alpha_{s2}/\beta$  et  $\kappa$ . Toutes ces caséines contiennent de 150 à 200 acides aminés (Cayot *et al.*, 1998; Dickinson, 2006).

Dans le lait, les caséines sont associés en micelles, particules sphériques d'environ 180 nm constituées de 10 à 100 submicelles de 8 à 20 nm reliées entre elles par des liaisons phosphate de calcium (Amiot *et al.*, 2002; Fox, 2001). La composition des sous-micelles au centre et en périphérie est différente. En effet, les caséines  $\beta$  et  $\alpha_{s1}$  sont plus caractéristique pour les sous-micelles centrales et forment le noyau hydrophobe de la micelle, alors que la partie externe, surtout hydrophile, est constituée de caséine  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\kappa$  (Amiot *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2008). La caséine  $\kappa$  est une protéine très hydrophile,

insensible au calcium, mais très sensible à la chymosine (enzyme de la présure) (Fox *et al.*, 2008).

La coagulation du lait est un processus fondamental dans la fabrication du fromage et dépend de plusieurs facteurs: pH, concentration en caséine, température (Herbert *et al.*, 2000; Hurtaud *et al.*, 2001). L'acidité du lait est ajustée, juste avant la coagulation, avec une solution de 40% d'acide lactique ou contrôlée et régulée par l'ajout d'une culture de bactéries lactiques lors de sa maturation. L'abaissement du pH favorise le processus de coagulation par l'activation des enzymes impliquées dans la coagulation enzymatique ou par la neutralisation des charges négatives et agrégation des micelles en cas de coagulation acide (De Kruif, 1997; Lucey, 2002). Dans le cas du fromage Cheddar, la coagulation est mixte.

**La coagulation acide.** Au cours de l'acidification du lait, il y a une désorganisation de la structure micellaire des caséines. Le calcium intra-micellaire est solubilisé et les liens entre les submicelles sont altérés. Si le lait atteint son pH isoélectrique (4.60), les micelles perdent leur charge électrique et forment entre elles des liaisons faibles, liaisons d'hydrogène (Laligant *et al.*, 2003; Le Graet *et al.*, 1999). Le coagulum formé est partiellement déminéralisé, poreux, fragile et inapte à se contracter, ce qui rend son raffermissement difficile (Michalski *et al.*, 2002).

**La coagulation enzymatique.** La coagulation enzymatique est obtenue par l'action des enzymes coagulantes. En fromagerie, la plus communément employée est la présure. La présure est un extrait de caillette de veau non sevré qui est composé d'un mélange de deux enzymes protéolytiques, la chymosine (80%) et la pepsine (20%) (Andrén, 2002; Fauconneau, 1989). Par un mécanisme de protéolyse partielle, la chymosine convertit la  $k$ -caséine en para-caséine  $\kappa$  et un peptide nommé caséinomacropéptide (CMP) (Dalglish, 1982; Hyslop, 2003; Lucey *et al.*, 2003). La paracaséine  $\kappa$  reste accrochée à la micelle qui perd son pôle hydrophile stabilisant et précipite, tandis que le CMP passe dans le lactosérum en emportant avec lui les ions négatifs et une partie de l'eau. Par conséquent, la disparition des répulsions électrostatiques intermicellaires facilite leur association (Home *et al.*, 2004; Lenoir *et al.*, 1987). Le caillé formé n'est pas déminéralisé, il est compact, élastique, imperméable et contractile (Michalski *et al.*, 2002).

**Égouttage.** L'égouttage permet d'accélérer la séparation entre le caillé et le lactosérum, nommé encore petit lait. Le coagulum qui en résulte est formé particulièrement d'un



maillot de caséine et ions de phosphate et de calcium contenant plusieurs gouttelettes de gras et de l'eau (Dickinson *et al.*, 1995; Michalski *et al.*, 2002). Le lactosérum éliminé entraîne la majeure partie des protéines non-coagulées, du lactose, ainsi qu'une quantité variable des minéraux (St-Gelais, 2002). La quantité plus ou moins grande de liquide retenue dans le caillé va déterminer le type et les caractéristiques du fromage : texture, fermeté, vitesse et intensité de maturation, etc. (Johnston *et al.*, 1998). Afin de contrôler et réguler la teneur d'eau de divers fromages selon les normes requises pour leur extrait sec total, différentes techniques d'égouttages sont utilisées. Une de ces techniques est le découpage (Johnston *et al.*, 1998). Le coagulum est tranché en portions égales pour augmenter la surface totale d'exsudation du lactosérum et de favoriser l'égouttage (Pandey *et al.*, 2003). Le brassage évite l'agglomération des grains de caillé et force leur déshydratation par une technique d'agitation mécanique. Elle doit être menée de façon douce et suffisamment rapide pour prévenir le bris et des pertes des grains de caillé. Afin de retirer un maximum de lactosérum, le caillé est cuit à une température maximale de 38°C (Pandey *et al.*, 2003). La température doit s'élever jusqu'à 38°C pendant 30 minutes avec légère agitation, puis les grains de caillé sont cuits à cette température pour 45 minutes avec agitation plus forte. Le lactosérum est évacué durant l'augmentation de la température, ce qui permet de cuire les grains dans le liquide (Kosikowski *et al.*, 1997). Le soutirage partiel du petit-lait se fait à l'aide du système de soutirage du sérum dans une cuve fermée entièrement mécanisée. Pendant cette étape, il faut toujours contrôler le pH, car il influence le degré de minéralisation du caillé, son pH final et la rétention du sel. En fait, dans le cas du Cheddar, le pH indiqué à l'étape du soutirage est de 6,1 à 6,2, ce qui va déterminer le pH de 5,1-5,2 en fin de fabrication (Kosikowski *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 2003).

**Cheddarisation.** À cette étape, les grains de caillé commencent à s'associer (ont tendance à se souder) pour créer des blocs sous l'effet de la pression, de l'acidité et de la température (Lowrie *et al.*, 1982). Quand le lactosérum recouvre ces blocs, le caillé est coupé en longues tranches qui reposent 15 minutes dans un bassin légèrement chauffé à 38°C, puis elles sont retournées aux 15 minutes. Au cours de l'étape de cheddarisation, les bactéries lactiques continuent à se multiplier, le calcium est solubilisé et la perméabilité du caillé augmente facilitant le drainage du lactosérum. Quand les tranches de caillé sont plus fermes et le lactosérum recueilli atteint un pH d'environ 5,2, l'étape de cheddarisation se termine et le caillé est coupé en petits grains par des moulins industriels (Kosikowski *et al.*, 1997; Lawrence *et al.*, 1984; Pandey *et al.*, 2003).

Après avoir été moulé le caillé est soumis au pressage final pour éliminer les dernières fractions de lactosérum et donner une forme et une texture au fromage. Le taux de pressage et la pression appliquée croissent en fonction de l'extrait sec recherché dans le fromage et sont adaptés à chaque type de fromage. Dans le cas du Cheddar, la force appliquée lors du pressage est de 1,5 à 2,0 kg/cm<sup>2</sup> et dure quelques heures à la température de 20-30°C et à une humidité ambiante suffisante (Kosikowski *et al.*, 1997).

**Salage.** Différentes méthodes de salage existent : le salage à sec ou par la saumure. Dans notre cas, il s'agit de salage à sec qui se pratique bien sur des fromages à pâte ferme. Le sel arrête l'acidification et la déminéralisation du caillé et permet d'intensifier la saveur du fromage (Lawrence *et al.*, 1984). La pression osmotique créée va compléter l'égouttage du lactosérum. De plus, le sel contrôle le développement des bactéries pathogènes et nuisibles. Cette étape aussi détermine le bon déroulement de l'affinage et la formation de la croûte du fromage (Kosikowski *et al.*, 1997). Le fromage cheddar est salé à un taux de 20 g / kg de caillé (Kosikowski *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 2003).

**Affinage** La plupart des fromages subit une maturation (affinage) qui se caractérise par toute une série de processus de nature microbiologique, biochimique et physique. Les composés organiques du fromage sont dégradés par divers enzymes naturelles du lait, de la présure et de la flore microbienne (Lawrence *et al.*, 1984; Molimard *et al.*, 1997). Les enzymes microbiennes jouent le rôle dominant dans la maturation du fromage (Amárta *et al.*, 2002; McSweeney *et al.*, 2000). La contribution des lipases et des protéases du lait à la maturation est mineure, car les conditions de l'affinage ne sont pas propices à leurs actions. Les enzymes à la présure ajoutées exercent aussi une action protéolytique en plus de leur action coagulante et ont un rôle important dans la production du Cheddar (McSweeney *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2001). La maturation du fromage affiné dure de 1 à 12 mois sous des conditions de 2 à 10°C et une humidité relative de 87 à 95% (Fox *et al.*, 1996; Turcot *et al.*, 2002). Au cours de cette période, les fromages sont soumis aux divers traitements comme le retournement, le lavage, le frottage et l'enrobage, qui ont pour but l'uniformité dans les productions. Le Cheddar est généralement emballé sous vide pour sa maturation. Au cours de l'affinage plusieurs transformations biochimiques prennent place. Le lactose est fermenté en acide lactique, en acide acétique, en éthanol et en CO<sub>2</sub>, puis jusqu'en autres acides organiques (Fox *et al.*, 1996; Martley *et al.*, 1993; McSweeney *et al.*, 2000). Les caséines par un mécanisme protéolytique sont transformées en acides aminés, en amines, en acides

organiques et en composés soufrés, tandis que les lipides sont dégradés en acides gras qui seront convertis en cétones, en lactones et en alcools secondaires (Amárta *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2001). Les principaux composés impliqués dans la flaveur du fromage Cheddar sont l'acide lactique, l'acide acétique, les acides aminés soufrés, les acides gras à courtes chaînes et l'ammoniac. La moitié des arômes du fromage Cheddar résultent du catabolisme des acides aminés (Amárta *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 1996)

### **2.6.2. Rendement fromager**

Le rendement fromager est généralement exprimé en kg de fromage obtenu à partir d'une quantité fixée de lait (Hurtaud *et al.*, 2001; Marie *et al.*, 1994). L'amélioration du rendement fromager est une préoccupation quotidienne des fromagers, parce qu'une augmentation de 1% du rendement est équivalente avec 20% de profit (St-Gelais, 2002). Il est surtout en corrélation avec la quantité d'eau retenue dans le fromage et déterminée par la teneur du lait en protéines et en lipides ainsi que par les paramètres technologiques (Hurtaud *et al.*, 2001). Le taux protéique aurait une incidence plus importante sur le rendement (Hurtaud *et al.*, 1995). Plus précisément, c'est les caséines qui forment la matrice fromagère et retiennent plus ou moins de lipides, de minéraux, d'eau et d'éléments solubles en fonction du pH, de la température et du type de coagulation (St-Gelais, 2002). De plus, les caséines sont importantes pour le développement de la saveur, surtout au cours de la maturation du fromage (Williams *et al.*, 2001). En ce qui concerne les protéines sériques, elles jouent un rôle mineur dans le développement de la structure et de la saveur, car 90% de ces protéines sont perdues dans le lactosérum. Cependant, un traitement thermique du lait favorise la dénaturation et la rétention partielle de ces protéines dans le caillé, ce qui permet d'améliorer le rendement fromager (Calvo *et al.*, 1998; Law *et al.*, 1994). Leur incorporation devrait être bien contrôlée, car en grande quantité, elles peuvent altérer la texture et la saveur du produit (Banks *et al.*, 1995; Rynne *et al.*, 2004). Selon les critères normatifs de fabrication du fromage, il faut avoir un ratio caséine/gras bien précis pour obtenir un rendement fromager optimal (St-Gelais, 2002). Une trop forte teneur en matière grasse par rapport aux protéines entraînera des problèmes de coagulation, d'égouttage et de pertes majeures de lipides (Turcot *et al.*, 2001). Afin de réduire les pertes mentionnées, il

faudrait adapter et bien contrôler les méthodes de fabrication du fromage désiré (Hurtaud *et al.*, 2001).

La matière grasse joue un rôle essentiel dans la formation de la structure et de la texture du fromage en lui donnant ses saveurs et son caractère particulier (Molimard *et al.*, 1997). Communément, la fermeté du fromage est inversement proportionnelle à la quantité de matière grasse (Emmons *et al.*, 1980). De plus, les lipides sont un milieu excellent de solubilisation et de transport des agents bioactifs lipophiles (vitamines A, E, D, K, CoQ,  $\beta$ -carotène, etc.) et des molécules volatiles (Molimard *et al.*, 1997).

La fortification du fromage en composés nutraceutiques pourrait affecter la composition et le rendement fromager. Cependant, très peu de données sont disponibles concernant l'impact de la fortification sur le rendement fromager. L'enrichissement du fromage en phospholipides par l'ajout du babeurre riche en phospholipides au lait de fromagerie a permis d'augmenter facilement la teneur en humidité d'un fromage allégé, tandis que la composition en protéines et en matières grasses étaient plus basses. Néanmoins, le rendement fromager n'a pas été affecté (Turcot *et al.*, 2001). De toute façon, la teneur élevée en humidité de ce fromage a affecté le profil de texture et a altéré les propriétés organoleptiques après 60 jours d'entreposage. Les caractéristiques du caillé plus mou et plus granuleux étaient en fonction de la teneur en phospholipides (Turcot *et al.*, 2002). Selon les résultats obtenus par Wagner *et al.* (2008), l'enrichissement du fromage cheddar en vitamine D n'a pas modifié la composition chimique, le rendement et la saveur de ce fromage.

La fortification du fromage en composés nutraceutiques présente un grand intérêt afin de répondre aux exigences des consommateurs et d'accroître le développement des produits laitiers au Canada. Cependant, ce processus nécessite une technique optimale de délivrance et d'encapsulation des agents bioactifs dans la matrice alimentaire et l'ajustement des procédés de fabrication du fromage pour obtenir un produit de bonne qualité.

## 3. MÉTHODOLOGIE

### 3.1. Formulation et caractérisation des émulsions

Les séries d'émulsions utilisées pour développer une émulsion destinée à l'encapsulation des agents lipophiles sont présentées dans le **Tableau 3.1**. Le caséinate de calcium (3,0% p/v) a été solubilisé dans le tampon phosphate de 0,01 N, pH 6,7 et la lécithine dans la phase d'huile à 60-65°C. Puis la dispersion de caséinate a été ajoutée dans la phase huileuse et le mélange a été homogénéisé.

#### 3.1.1. Effet d'agents bioactifs sur la stabilité des émulsions développées

Différents agents lipophiles ont été incorporés dans la phase huileuse de l'émulsion optimisée en utilisant les concentrations suivantes: 0,01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de vitamine D<sub>3</sub>, 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\alpha$ -tocophérol acétate, 0,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  palmitate de rétinol et de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  CoQ<sub>10</sub>. Ces émulsions ont été homogénéisées selon le protocole optimisé. Les concentrations des agents bioactifs incorporés ont été choisies à partir de valeurs journalières minimales recommandées par Santé Canada.

#### 3.1.2. Tests de stabilité des émulsions

Tous les tests de stabilité décrits ci-dessous ont été interprétés de façon à optimiser la stabilité des émulsions et à évaluer leur efficacité afin d'encapsuler et préserver l'activité biologique des agents bioactifs lipophiles.

**a. Indices de stabilité et d'activité d'émulsifiante.** Les indices de stabilité (ESI – *emulsifying stability index*) et d'activité d'émulsifiante (EAI – *emulsifying activity index*) ont été déterminés par la méthode de Pearce *et al.* (1978) modifiée et adaptée aux émulsions développées :

- 5  $\mu\text{l}$  de l'émulsion ont été dilués avec 5 mL de 0,1% SDS. La même procédure a été effectuée après 15 min. L'absorbance de l'émulsion diluée a été mesurée à 500 nm avec un Spectrophotomètre UV-Visible.
- 800  $\mu\text{l}$  d'émulsion fraîche ont été transférés dans un plat pré-pesés. La capsule avec l'émulsion fraîche a été pesée et incubées dans un four à 120°C. Après 2

heures, le plat est retiré du four, refroidi dans un dessiccateur et pesé. EAI et ESI ont été calculés comme suit:

$$\text{ESI (min)} = A_0 t / A_0 - A_{15},$$

$$\text{EAI (m}^2\text{g}^{-1}\text{)} = 4,606 A_0 D_f / F \cdot E \cdot 10^3$$

$$F = (C-A) - E (B-C) / (C-A) + [(B-C) (1+E) \cdot 0,93 - E]$$

où A – poids de la capsule vide,

B - poids de la capsule avec émulsion fraîche,

C - poids de la capsule avec émulsion séchée,

D<sub>f</sub> - facteur de dilution,

E – concentration en protéines,

A<sub>0</sub> - absorbance au temps zéro et après 15 min,

0,93 – densité de l'huile de lin,

T – 15 min.

Ces indices caractérisent l'efficacité des agents émulsifiants (surtout les protéines) de produire des émulsions qui restent stable à l'agrégation des gouttelettes (McClements, 2007a; Pearce *et al.*, 1978). Plus particulièrement, l'EAI reflète la propriété des protéines à générer la surface interfaciale dans l'émulsion nouvellement formées, grâce à leur capacité de s'adsorber et se déplier (ou s'étendre) sur l'interface des globules gras (Fachin *et al.*, 2005; Pearce *et al.*, 1978). Cet indice est en fonction de la conformation des protéines qui a un impact direct sur la flexibilité, la solubilité et l'hydrophobicité des protéines, le degré de ponts disulfures et sur les liaisons d'hydrogène et les forces de Van-der-Walls (Aider *et al.*, 2009).

**b. Viscosité.** La viscosité a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre Brookfield programmable LVDV-II + (Gardner, Columbia, États-Unis) avec un adaptateur UL (Ultra-Low). Ce viscosimètre mesure la viscosité d'un fluide en fonction du taux de cisaillement et est exprimé en mPa·s.

Tableau 3.1 : Émulsions analysées au cours de l'optimisation de la formulation.

Série des émulsions étudiées	Calcium caseinate (% p/p)	Fraction volumique d'huile	Type de lécithine (% p/p d'huile)			Régime de microfluidisation
			78% PC	75% PC	47% PC	
1. Première série des émulsions analysées	1.0	0.2				non applicable*
	1.5	0.2				
	2.0	0.2				
	2.5	0.2				
	3.0	0.2				
	3.5	0.2				
2. Détermination de la concentration optimale de caséinate de calcium (% w/w)	1.0	0.2	2.0			non applicable*
	1.5	0.2	2.0			
	2.0	0.2	2.0			
	2.5	0.2	2.0			
	3.0	0.2	2.0			
	3.5	0.2	2.0			
3. Détermination de la fraction volumique d'huile	3.0	0.1	2.0			non applicable*
	3.0	0.2	2.0			
	3.0	0.3	2.0			
	3.0	0.4	2.0			
	3.0	0.3	0.3			
	3.0	0.3	0.5			
4. Détermination de la concentration optimale de la lécithine (% w/w)	3.0	0.3	1.0			non applicable*
	3.0	0.3	1.5			
	3.0	0.3	2.0			
	3.0	0.3	0.3			
	3.0	0.3	2.0			
	3.0	0.3	2.0			
5. Détermination des conditions optimales d'homogénéisation en fonction de divers types de la lécithine	3.0	0.3			2.0	35
	3.0	0.3			2.0	70
	3.0	0.3			2.0	100
	3.0	0.3	2.0	2.0	2.0	(2 x 70) + 35
	3.0	0.3	2.0	2.0	2.0	(2 x 100) + 35
	3.0	0.3	2.0	2.0	2.0	

PC : phosphatidylcholine, \* émulsions homogénéisées avec un Ultra-Turrax T-25 à 17000 rpm, 2 min.

Toutes les mesures ont été réalisées à la température ambiante et des vitesses différentes (5-100 rpm) ont été appliquées en fonction du type d'émulsion et du type de traitement.

**c. Stabilité chimique d'émulsion.** La stabilité chimique des émulsions à l'oxydation a été évaluée pendant 10 jours à 40°C, afin de simuler un processus accéléré de conditions de stockage, selon la méthode de Masmoudi *et al.* (2005).

**d. Analyse macroscopique et microscopique.** Un volume de 50 mL de l'émulsion a été pris et conservés à 4°C dans un tube de 50 mL, afin d'évaluer la stabilité visuelle de l'émulsion dans le temps (jusqu'à 3 mois). L'émulsion a été considérée comme étant instable quand une séparation de phase a eu lieu.

La microscopie optique a été réalisée avec un microscope Axioscope A1 (Zeiss, Allemagne) à contraste de phase, avec un objectif x100 ou x40. Les images ont été capturées avec un appareil photo numérique relié au microscope.

### 3.1.3. Caractérisation des émulsions

Le diamètre hydrodynamique moyen des globules de gras a été déterminé par spectroscopie de corrélation de photons en utilisant un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Inc, Southborough, MA) et la stabilité physique des émulsions a été estimée à l'aide d'un analyseur (Beckman Coulter). Le Quick Scan permet de mesurer l'homogénéité et la stabilité d'émulsion pendant l'entreposage. L'échantillon est placé dans un cylindre de verre et balayé par un faisceau lumineux (850 nm). L'intensité de la lumière transmise est réfléchiée par l'échantillon et enregistrée en fonction de la hauteur de l'échantillon.

## 3.2. Fabrication du fromage

La fabrication de fromage modèle à l'échelle du laboratoire, le calcul du rendement fromager et le taux de rétention des lipides et des protéines a été réalisée selon la méthode décrite par Morin *et al.* (2008).

Des échantillons de lait standardisé, laits écrémé et de lactosérum lors de la fabrication du fromage ont été analysés pour déterminer les solides totaux (ST) par la méthode



925.23 de l'AOAC, (1990). Les protéines et les lipides ont été déterminés en utilisant les tests MaxSignal® No-Mel Total Protein Assay Test Kit (Bio Scientific) et Labkit Total Lipids (Shemelex, S.A. Barcelona, Spain).

### **3.2.1. Évaluation d'enrichissement du fromage en acide gras oméga-3**

L'enrichissement de fromage en acide gras oméga-3 (ALA) a été évalué en déterminant l'indice d'insaturation des lipides selon la méthode de Masmoudi *et al.* (2005).

### **3.2.2. Rétention des vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub> dans le fromage**

Les vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub> ont été extraites des échantillons et quantifiés par HPLC, selon la méthode de Karpińska *et al.* (2006) qui a été adaptée à nos échantillons. Le taux de récupération (*TR*) des agents encapsulés a été calculé selon l'équation suivante :

$$TR (\%) = BF/BL \times 100 \quad (13)$$

où *BF* ( $\mu\text{M}$ ) est la quantité d'agent bioactif dosé dans le fromage,  
*BL* ( $\mu\text{M}$ ) est la quantité d'agent bioactif ajouté dans le lait fromager.

### **3.2.3. Propriétés antioxydantes**

Les propriétés antiradicalaires des fromages fortifiés en composées bioactives ont été évaluées selon la procédure de Salmieri *et al.* (2006).

Le potentiel d'oxydation des lipides du fromage a été évalué par la détermination d'une des produits finals d'oxydation, le malondialdéhyde (MDA) avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). La concentration de MDA a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant des dilutions en série d'une solution de 1,1,3,3-tétraméthoxypropane (97% (v/v) TMP, Sigma-Aldrich Canada Ltd). Les valeurs de TBARS ont été exprimées en  $\mu\text{g}$  MDA/kg de fromage.

### **3.2.4. Stabilité chimique de fromage**

La stabilité chimique des fromages à l'oxydation au cours de la fabrication et de stockage a été évaluée par la spectroscopie infrarouge (ATR- FTIR), selon la méthode de Masmoudi *et al.* (2005) adaptée pour l'analyse de fromage.

### **3.2.5. Analyse statistique**

Un nombre de 10 échantillons a été analysées pour le calcul des indices de stabilité des émulsions et de fromage (stabilité chimique). Toutes les autres mesures ont été réalisées en triplicata (n = 3). Les tests de Duncan et de *t*-Student ont été utilisés pour les analyses de comparaison multiple, à l'aide du logiciel SPSS Statistics 18 (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Les différences entre les moyennes ont été considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$ .

## 4. DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette étude a permis de mettre au point un procédé d'encapsulation de molécules bioactive lipophiles. On a démontré l'importance de l'immobilisation de ces composés dans des particules émulsifiées pour accroître leur rétention et protéger leur bioactivité tout au cours de la fabrication et de l'entreposage du fromage. On a aussi démontré l'effet positif de l'incorporation des agents lipophiles sur la composition et le rendement du fromage.

### 4.1. Formulation et caractérisation des émulsions

La première partie de l'étude réalisée nous a permis de mettre au point une émulsion H/E destinée à l'encapsulation de composés nutraceutiques lipophiles dans la matrice fromagère (résultats non publiés). La détermination des paramètres optimaux liés à l'optimisation de l'émulsion telle que le choix des composantes, la concentration en protéines et la fraction volumique d'huile, le type et la concentration de la lécithine, ainsi que les conditions d'homogénéisation ont permis d'augmenter la rétention des agents bioactifs dans le fromage jusqu'à 90-93% et de maintenir leur stabilité de plus de 3 mois.

#### 4.1.1. Variables de composition

La première série des émulsions (**Tableau 3.1**), constituées d'huile de lin (30% p/p) et de différentes concentrations d'une solution de caséinate de calcium (3% p/v), et homogénéisées avec un Ultra-Turrax, a démontré une faible stabilité de 48 h à 4°C. L'ajout de la lécithine (2% p/p de gras) dans l'huile de lin a permis de maintenir la stabilité des émulsions pendant 30 jours et de sélectionner les constituants principaux destinés à la préparation de l'émulsion. En même temps, lorsque la lécithine a été ajoutée dans la phase aqueuse des émulsions, une stabilité de 30 min a été notée. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que la présence de lécithine en phase aqueuse engendre une adsorption compétitive par rapport aux protéines. Étant un tensioactif de faible poids moléculaire, la lécithine est plus mobile et s'adsorbe plus rapidement à l'interface huile/eau que les protéines, qui sont des macromolécules. De plus, la lécithine peut déplacer les protéines adsorbées à la surface de gouttelettes

d'huile et cette phénomène est fonction de plusieurs facteurs (Abd El-Salam *et al.*, 2009; Dickinson, 1997a; Dickinson, 2001; Goff, 1997; Mackie *et al.*, 2001; Pugnali *et al.*, 2004). Les facteurs plus importants sont la solubilité des émulsifiants et le ratio tensioactifs/protéines (Dickinson, 1997a; Krägel *et al.*, 1999; Pugnali *et al.*, 2004). Néanmoins, les agents tensioactifs solubles dans l'huile sont connus pour moins à déplacer les protéines, que ceux solubles dans l'eau (Pugnali *et al.*, 2004). Les études rapportées sur l'adsorption compétitive entre la lécithine et les protéines telles que la  $\beta$ -caséine, la  $\beta$ -lactoglobuline et le caséinate de sodium ont révélé que la lécithine n'induisait pas une concurrence substantielle avec les protéines à l'interface huile-eau (Dickinson *et al.*, 1997). De plus, selon Waninge *et al.* (2005), l'ordre de l'ajout des constituants et la procédure de mélange pendant la préparation des émulsions sont d'une importance cruciale pour la performance de l'émulsification et peuvent influencer leur adsorption à la surface de gouttelettes.

Dans notre étude, il semble que la lécithine ajoutée dans l'huile de lin n'entre pas en compétition avec le caséinate de calcium présent dans la phase aqueuse. En s'adsorbant rapidement à l'interface huile/eau, la lécithine interagit probablement avec les composés de la phase aqueuse. Selon Srinivasan *et al.* (1999), dans les émulsions stabilisées par le caséinate de calcium, les  $\alpha_S$ -caséines sont préférentiellement adsorbées à la surface des gouttelettes. Ces molécules sont légèrement plus petites que les  $\beta$ -caséines, mais elles sont plus fortement chargées (-22 e à pH neutre) et possèdent une forte affinité pour les ions calcium (Dickinson *et al.*, 2003a; Dickinson, 2006). Au pH de la formulation proposée (pH 6,7), les molécules d' $\alpha_S$ -caséine et les globules de gras contenant de la lécithine sont chargés négativement (Dickinson, 2006; Wan *et al.*, 2009) et ils peuvent entrer en répulsion. Il est possible que les ions calcium, en interagissant avec les résidus phosphates de la lécithine chargés négativement, et avec les molécules d' $\alpha_S$ -caséine, assurent la stabilité des émulsions. La capacité de la lécithine à fixer les ions calcium a été démontrée dans des expériences effectuées avec des liposomes (Wan *et al.*, 2009). Selon les mêmes auteurs, les ions calcium sont adsorbés à la surface des liposomes chargés négativement et une concentration de 1,41 mmol/L est suffisante pour inverser le potentiel Z négatif des liposomes en potentiel Z positif.

L'analyse de la stabilité des émulsions étudiées (Tableau 3.1, séries 2, 3, 4) a permis d'optimiser la formulation selon le ratio suivant: 70% (p/p) de solution de caséinate de calcium (3% (p/v)) et 30% (p/p) d'huile de lin contenant 2% (p/p de gras) de lécithine.

L'homogénéisation à 40°C de ces émulsions (17000 rpm, 2 min) avec un Ultra-Turrax T25 a également permis d'améliorer la reproductibilité des émulsions.

#### 4.1.2. La microfluidisation

La microfluidisation est une technique qui permet de réduire la taille moyenne de gouttelettes obtenues par cisaillement des fluides sous pression élevée. Selon Paquin *et al.* (1989), la diminution significative de la taille des globules de gras par cette technologie favorise une distribution plus étroite de ces particules et une meilleure stabilité du produit. Dans cette étude, la microfluidisation a permis de diminuer la taille moyenne de gouttelettes de l'émulsion développé jusqu'à 360 nm et d'obtenir une distribution plus uniforme de celles-ci. En contrôlant les conditions d'homogénéisation, il a été possible de moduler la stabilité des émulsions. Les effets des conditions d'homogénéisation sur la stabilité des émulsions sont présentés dans le **Tableau 4.1**. Nos études montrent que la microfluidisation a amélioré significativement ( $P \leq 0,05$ ) la stabilité des émulsions (Tableau 3.1, série d'émulsions 5). Néanmoins, une meilleure stabilité a été révélée après 3 cycles d'homogénéisation. Selon l'ESI, 2 cycles d'émulsification à 70 MPa suivi d'un cycle à 35 MPa (2×70+35) ont permis d'améliorer la stabilité des émulsions de 19% comparativement aux émulsions microfluidisées avec un cycle de 70 MPa (70 MPa). De plus, un cycle sous une pression d'homogénéisation de 35 MPa (35 MPa) et de 70 MPa n'était pas suffisant pour briser les gouttelettes de matières grasses en petits globules, tandis qu'une microfluidisation à pression plus élevée (100 MPa ou 2×100+35 MPa) n'a pas permis d'améliorer la stabilité des émulsions. Selon l'analyse macroscopique, les émulsions obtenues avec 100 MPa ont montré une stabilité seulement de 7 jours à 4°C comparativement à 3 mois lorsque les émulsions ont été préparées suite à un traitement de (2×70)+35 MPa. Les indices ESI et EAI, ainsi que la viscosité de ces émulsions ont diminué significativement ( $p \leq 0,05$ ). Comme mentionné dans la section 2.1, l'EAI est fonction de la conformation des protéines. Un léger degré de dénaturation peut améliorer les propriétés émulsifiantes des protéines par l'exposition des groupes hydrophobiques cachés, tandis qu'une dénaturation très sévère nuit à sa stabilité (Molina *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2010) et possible a conduit à la formation des agrégats de gouttelettes d'huile. L'amélioration de la stabilité des émulsions après la reprise des cycles de microfluidisation (2×100+35 MPa) par rapport aux émulsions traitées à 100 MPa pourrait être due à la diminution de

l'intensité de stress mécanique au cours du 3ème cycle d'homogénéisation (35 MPa), à la désintégration des agrégats et à la modification de la conformation des protéines. Ces résultats suggèrent qu'il y a probablement une dénaturation optimale des protéines qui favorise la stabilité des émulsions.

Tableau 4.1 : Effet des conditions d'homogénéisation sur la stabilité des émulsions.

Conditions d'homogénéisation <sup>1</sup>	ESI (min)	EAI (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
35	103,33 ± 0,8 <sup>c</sup>	0,99 ± 0,01 <sup>e</sup>
70	148,40 ± 0,8 <sup>d</sup>	0,96 ± 0,01 <sup>d</sup>
(2 × 70)+35	184,59 ± 0,7 <sup>e</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>c</sup>
100	66,58 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>
(2×100)+35	88,34 ± 0,6 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,01 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Conditions d'homogénéisation: 35, 70 ou 100 - un cycle à la pression de 35, 70 ou 100 MPa; (2×70)+35 ou (2×100)+35 – 2 cycles à la pression de 70 ou 100 MPa suivi d'un cycle à 35 MPa. ESI, EAI - indices de stabilité et d'activité d'émulsifiante<sup>abc</sup> Les moyennes, pour une même colonne, sont significativement différentes (p ≤ 0.05).

Dans le **Tableau 4.2** sont présentés les effets combinés d'homogénéisation et de différents types de lécithine sur la stabilité des émulsions. Les lécithines Alcollec PC 75, Ultralec F et Yelkin SS ont été étudiées à des concentrations en phospholipides de 2% (p/p d'huile) et on a observé que l'Alcollec PC 75 et l'Ultralec F contenant respectivement 78% et 75% de PC assurent une stabilité significativement supérieure comparativement à la Yelkin SS contenant 47% de PC. Cet effet semble être dû à la quantité de PC présente dans chaque type de lécithine. Selon Arsić *et al.* (1999), une meilleure stabilité de l'acide γ-linolénique, du D,α-tocophérol et de l'acétate d'ascorbyle contre l'oxydation a été obtenu par l'addition de phospholipides purifiées à 80% PC. L'analyse macroscopique des échantillons a aussi démontré qu'une fraction plus élevée de PC a permis de stabiliser les émulsions pendant plus de 3 mois à 4°C. La gélification de ces émulsions a toutefois été observée à la fin de cette période. Ce phénomène peut être induit sous l'effet de la microfluidisation, la diminution de la température ou du pH, en présence de Ca<sup>++</sup> et de protéines (Dickinson, 2006; Eliot *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011).

Afin de prévenir la perte de l'activité des molécules bioactives incorporées, la microfluidisation a été réalisée en présence d'un bain de glace. En fonction des résultats

obtenus, l'utilisation de la glace nous a permis de maintenir une basse température (10°C) et de mieux stabiliser les émulsions.

En conclusion, les conditions optimales de microfluidisation (2×70)+35 MPa ont probablement favorisé l'interaction entre lipides et protéines (Fabra *et al.*, 2010) en raison de leur effet positif sur la conformation des protéines, ce qui a permis de produire une émulsion stable ayant des gouttelettes de taille optimale avec une distribution granulométrique favorable.

**Tableau 4.2 : Effets combinés d'homogénéisation et de différents types de lécithine sur la stabilité des émulsions.**

Type de lécithine	Conditions de microfluidisation <sup>1</sup>			
	(2×70)+35		(2×100)+35	
	ESI (min)	EAI	ESI (min)	EAI (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
47% PC	184,58 ±0,7 <sup>a</sup>	0,76±0,01 <sup>a</sup>	88,67±0,5 <sup>a</sup>	0,51±0,01 <sup>a</sup>
75% PC	235,67±0,7 <sup>bc</sup>	0,91±0,01 <sup>bc</sup>	103,66±1,1 <sup>bc</sup>	0,85±0,01 <sup>bc</sup>
78% PC	236,03±0,8 <sup>bc</sup>	0,91±0,01 <sup>bc</sup>	104,37±0,9 <sup>bc</sup>	0,85±0,01 <sup>bc</sup>

<sup>1</sup>Conditions d'homogénéisation: (2×70)+35 ou (2×100)+35 – 2 cycles à la pression de 70 ou 100 MPa suivi d'un cycle à 35 MPa. ESI, EAI: indices de stabilité et d'activité d'émulsifiante. <sup>abc</sup> Les moyennes, pour une même colonne, suivies de différentes lettres minuscules sont significativement différentes (p ≤ 0.05).

#### 4.1.3. Le comportement rhéologique des émulsions développées

La modification de la viscosité sous l'effet d'optimisation de la formulation de l'émulsion est présentée dans le **Tableau 4.3**. Les résultats obtenus démontrent que la viscosité de l'émulsion optimisée a augmenté de 10 à 18 mPa·s avec la fraction volumique d'huile et jusqu'à 128 mPa·s après microfluidisation. La viscosité de l'émulsion optimisée, mesurée à différentes vitesses rotationnelles (taux de cisaillement), est illustrée à la **Figure 4.1**.

On peut observer que la viscosité dynamique a augmenté avec la diminution du taux de cisaillement ou du gradient de la vitesse. Ces résultats démontrent que l'émulsion développée est une émulsion non-Newtonienne avec un comportement pseudo-plastique et sa stabilité a augmenté à la fois avec l'augmentation de la viscosité et avec

la réduction de la taille des gouttelettes d'huile, selon la loi de Stoke (Courraze *et al.*, 2000).

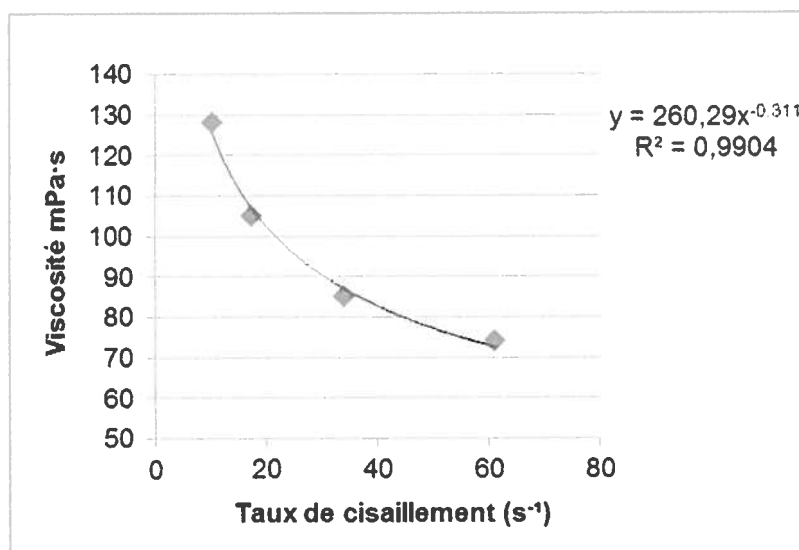


Figure 4.1 : Modification de la viscosité de l'émulsion optimisée en fonction du taux de cisaillement.

#### 4.1.4. Effet des agents bioactifs sur la stabilité des émulsions

La plupart des agents bioactifs lipophiles sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme antioxydants et pour leur effet bénéfique potentiel sur la santé humaine. L'impact de l'encapsulation sur la bioactivité de ces agents et leur influence sur l'oxydation des lipides ont été rapportés par plusieurs chercheurs (Eskandar *et al.*, 2009; Polak *et al.*, 2011; Relkin *et al.*, 2008), tandis que l'impact des agents bioactifs sur la stabilité des émulsions n'est pas bien connu. Dans cette étude, l'incorporation d'agents bioactifs (vitamine A, E, D<sub>3</sub> et CoQ<sub>10</sub>) a eu un effet positif sur la stabilité des émulsions, avec une augmentation significative de l'ESI, de 7 à 9% ( $p \leq 0,05$ ) par rapport au témoin (émulsion sans agents bioactifs) (Figure 4.2).

Plusieurs travaux démontrent que les agents lipophiles (vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub>) interagissent avec les phospholipides dans des milieux biphasiques pour se concentrer à l'interface huile-eau (Afri *et al.*, 2004; Eskandar *et al.*, 2009; Lúcio *et al.*, 2009; Mattila *et al.*, 2001). Dans les émulsions étudiées, les molécules lipophiles incorporées ont possiblement interagi avec la lécithine, provoquant un renforcement de l'interface huile/eau et par conséquent améliorant aussi la stabilité des émulsions. Afin de vérifier



**Table 4.3 : Évolution de la viscosité sous l'effet d'optimisation de la formulation de l'émulsion.**

Série des émulsions étudiées	Caséinate de calcium (% p/p)	Fraction volumique d'huile	Type de lécithine (% p/p d'huile)		Homogénéisation		Viscosité (mPa·s)
			78% PC	75% PC	Ultra-Turrax (rpm, 2 min)	Microfluidiseur, pression (MPa), nombre de cycles	
2. Détermination de la concentration optimale de caséinate de calcium (% w/w)	2.0	0.2	2.0		17,000		10
3. Détermination de la fraction volumique d'huile	3.0	0.3	2.0		17,000		18
5. Détermination des conditions optimales de microfluidisation en fonction de divers types de la lécithine	3.0	0.3		2.0	17,000	(2 x 70) + 35	128

PC : phosphatidylcholine

l'effet positif des agents bioactifs, la taille des particules de gras et la stabilité physico-chimique des émulsions en présence ou absence de la CoQ<sub>10</sub> ont été évaluées. Les résultats sont présentés dans le premier article et montrent que pendant 10 jours de stockage à 40°C, la stabilité chimique de l'émulsion contenant la CoQ<sub>10</sub> n'a pas été affectée significativement par rapport à une émulsion sans CoQ<sub>10</sub>.

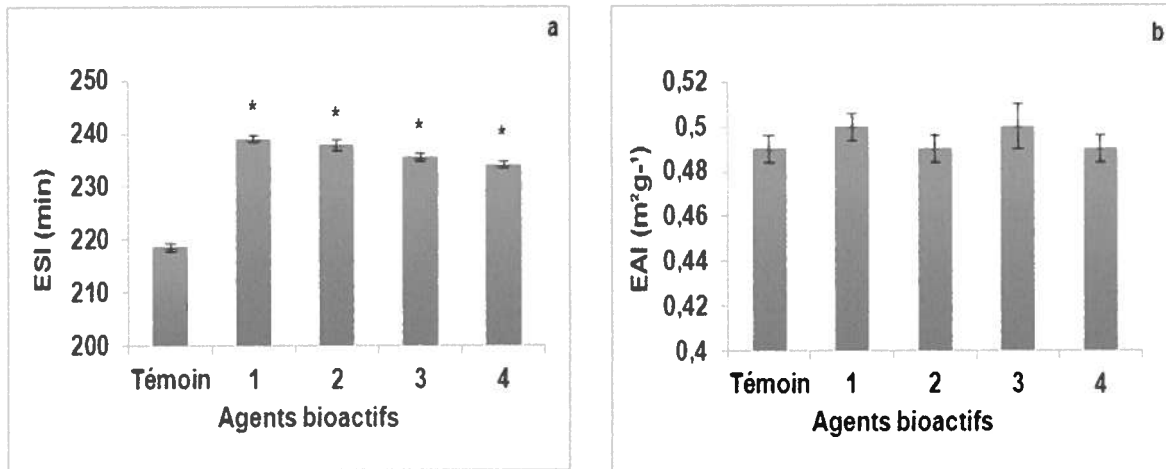


Figure 4.2. Effet des agents bioactifs sur la stabilité d'émulsion. 1 – ECLCoQ, 2 – ECLA, 3 – ECLE, 4 – ECLD<sub>3</sub> (émulsion développée contenant différents agents bioactifs : CoQ<sub>10</sub>, vitamine A, vitamine E, vitamine D<sub>3</sub>). ESI, EAI - indices de stabilité et d'activité d'émulsifiante. \*Stabilité des émulsions significativement différente ( $p \leq 0.05$ ) comparativement au témoin.

#### 4.1.5. Caractérisation des émulsions

Vu que les émulsions ont démontré une stabilité plus élevée en présence de la lécithine, l'émulsion optimisée a été caractérisée par rapport à une émulsion sans lécithine afin d'évaluer l'impact de ce composé sur la taille des particules de gras, sur la rétention des agents bioactifs et sur le rendement fromager. Par la suite, deux types d'émulsions (avec ou sans lécithine) ont été utilisés pour l'encapsulation des agents bioactives ciblés (vitamine A, vitamine E et CoQ<sub>10</sub>).

Selon les travaux rapportés, la taille des globules de gras a une importance essentielle non seulement sur la stabilité de l'émulsion, mais aussi sur le taux d'encapsulation des agents lipophiles, le rendement fromager et la texture du caillé (Afri *et al.*, 2004; Eskandar *et al.*, 2009; Relkin *et al.*, 2008; Tosh *et al.*, 1998). Selon Tosh *et al.* (1998) les globules de gras ayant un diamètre entre 265 à 640 nm n'ont pas d'effet sur les propriétés coagulantes du lait et de la microstructure du fromage cheddar, tandis que les globules de

gras ayant un diamètre inférieur à 265 nm ont diminué le temps de coagulation présure, le taux de raffermissement du gel et l'intégrité de la microstructure du caillé. L'analyse granulométrique a indiqué que la taille des globules de gras des émulsions étudiées correspond à la taille normale des particules testée par Tosh *et al.* (1998) et pourraient être utilisées dans la fabrication du fromage. En réalité, une bonne émulsion doit être compatible avec la matrice alimentaire et capable d'encapsuler une quantité relativement importante de lipides bioactifs par unité de masse du produit. La compatibilité avec la matrice fromagère de la formulation développée et sa capacité à retenir une importante quantité de CoQ<sub>10</sub> ont été investiguées dans le premier article. Selon les résultats obtenus, une rétention de 93% de la CoQ<sub>10</sub> n'a pas modifié le rendement fromager.

## **4.2. Encapsulation d'agents lipophiles dans la matrice fromagère**

L'utilisation de l'huile de lin pour le développement d'émulsion a également permis l'enrichissement du fromage en acides gras oméga-3 (ALA). Le rôle de cet oméga-3 dans la prévention et le traitement de diverses maladies chroniques est de plus en plus reconnu (Larsson *et al.*, 2004; Simopoulos, 1999). En outre, il semble que la conversion de ALA en EPA et DHA est fonction de divers facteurs comme l'apport total de matières grasses, le taux d'ALA, d'EPA, de DHA et de LA (Burdge *et al.*, 2003; Emken *et al.*, 1994; Pawlosky *et al.*, 2001; Simopoulos, 1991; Vermunt *et al.*, 1999). Il a été rapporté que lorsque la prise de LA est maintenue constante à 15 g/j, le pourcentage total de conversion d'ALA en EPA et en DHA est de 11 à 18,5%, mais lorsque l'apport de LA augmente de 15 à 30 g/j, cette conversion est réduite à 5-11% (Emken *et al.*, 1994). Le ratio d'acides gras oméga-6/oméga-3 semble être plus important que la consommation absolue d'oméga-3. Si l'ALA est transformé en EPA et en DHA, le LA est converti en acide arachidonique (AA) via une série d'élongations et de désaturations de la chaîne carbonée. Cependant, ces réactions sont catalysées par les mêmes enzymes (Nakamura *et al.*, 2004) et leur déroulement dépend du ratio LA/ALA (Brenna *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 1998). Une quantité accrue d'acides gras oméga-6 dans l'alimentation conduit à d'importantes quantités de métabolites d'AA (eicosanoïdes) (Simopoulos, 1991). Formés en grande quantité, ces métabolites contribuent à la formation de thrombus et des athéromes, des troubles allergiques, inflammatoires et à la prolifération des cellules. Selon Simopoulos (2008), un ratio plus faible d'oméga-6/oméga-3 est plus souhaitable, car il permet de réduire le risque d'un grand nombre de maladies chroniques à forte prévalence

dans les sociétés occidentales, ainsi que dans les pays en voie de développement. En outre, les acides gras *trans* interfèrent à la fois avec la désaturation et l'élongation de LA et ALA. Ces données suggèrent, que l'huile de lin par son contenu en *cis*-ALA et son ratio oméga-6/oméga-3 est une source excellente d'oméga-3 (Oomah, 2001; Zhao *et al.*, 2007).

La publication 2 montre qu'il est possible d'utiliser l'huile de lin à la fois pour encapsuler des agents bioactifs lipophiles et pour enrichir le fromage en oméga-3. L'ajout de la lécithine contenant 75-78% de PC a permis d'augmenter la rétention des vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub> de 26, 15 et 8 % respectivement. Les fromages contenant les composés bioactifs en mélange ont montré que la vitamine E a diminué au cours des 2 premiers mois d'entreposage. Toutefois, une régénération de cette vitamine a été observée après 3 mois au dépend de la CoQ<sub>10</sub> ainsi qu'une récupération plus élevée de la vitamine A. Ces résultats démontrent qu'il y a une compatibilité d'action entre les agents bioactifs incorporés. Cependant, aucune synergie d'action n'a été notée, car l'activité antiradicalaire des fromages fortifiés en vitamine E était supérieure à celle des fromages contenant tous les agents bioactifs en mélange. Selon Guillard (2011), un effet synergique entre deux vitamines résulte en un effet supérieur à la somme des effets produits par chaque vitamine.

L'association de l'huile de lin avec les vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub> a permis de solubiliser les lipides bioactifs et d'accroître la résistance des fromages enrichis contre l'oxydation des lipides. Les vitamines A et E ont également amélioré le rendement fromager de 1-2%.

### **4.3. Conclusion**

Les travaux réalisés dans cette étude ont permis de démontrer que l'émulsion développée contenant 30% d'huile de lin a été stabilisée par la lécithine (2% p/p d'huile) en présence de caséinate de calcium (3% v/p). Les lécithines avec un taux plus élevée de PC (75-78%) ont permis d'améliorer significativement ( $p \leq 0,05$ ) la stabilité de l'émulsion.

Le choix des conditions d'homogénéisation s'est avéré très important pour l'optimisation de la formulation des émulsions. Les conditions optimales d'homogénéisation (2 x 70) + 35 MPa ont augmenté significativement ( $P \leq 0,05$ ) la viscosité et la stabilité des émulsions. L'ajout d'agents bioactifs lipophiles dans la formulation a amélioré également ( $P \leq 0,05$ ) la stabilité des émulsions.

La taille des particules, de 265-367 nm des émulsions développées (sans lécithine et avec lécithine) est appropriée pour des applications dans la fabrication du fromage cheddar.

Les conditions optimales d'encapsulation ont permis de récupérer une importante quantité (90-93%) des agents bioactifs dans le caillé et de maintenir leur bioactivité durant au moins 3 mois. L'incorporation des vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub> dans la même matrice fromagère a démontré une bonne compatibilité d'action entre ces trois nutriments.

La lécithine de soya contenant 75-78% de PC a permis d'augmenter fortement la stabilité des émulsions, la rétention et la préservation des composantes bioactives lipophiles dans le fromage au cours de l'entreposage, sans affecter le rendement fromager.

L'encapsulation des agents bioactifs ont amélioré la stabilité des émulsions et la résistance des fromages enrichis contre l'oxydation. La fortification des fromages en lipides bioactifs n'a pas affecté la composition et le rendement des fromages cheddar. Une amélioration du rendement fromager a également été notée. Une étude de l'évaluation sensorielle permettrait de vérifier le potentiel commercial de la mise en marché de ces types de fromage.

La formulation développée pourrait être utilisée comme système de vecteur de molécules lipophiles à des fins alimentaires.

Cette nouvelle approche, assez simple et efficace, pourrait être utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour accroître la valeur nutritionnelle du fromage et satisfaire l'exigence des consommateurs.



## 5. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1

### 5.1. Contributions de l'étudiante à l'article 1

L'ensemble des travaux présentés dans cet article est le fruit d'une collaboration entre l'étudiante et les co-auteurs. La formulation de l'émulsion destinée à l'encapsulation des lipides bioactives, les tests de stabilité (ESI et EAI) et le dosage de CoQ<sub>10</sub> par HPLC ont été mis au point par Iulia Stratulat. La méthode d'évaluation de la stabilité chimique des émulsions par ATR-FTIR a été mise au point par Stéphane Salmieri avec la contribution de l'étudiante. L'ensemble des expériences et les analyses statistiques réalisées dans le cadre de cette étude ont été accomplies par Iulia Stratulat. La mesure de la taille des particules et la stabilité physique des émulsions développées ont été effectuées dans les laboratoires du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments (CRDA) à l'aide de l'assistante de recherche Hélène Giroux. L'article a été rédigé par l'étudiante et corrigé par chacun de co-auteurs qui ont donné des suggestions et des idées pour l'amélioration du contenu de cet article. Le Professeur Monique Lacroix, directrice de recherche, a aussi coordonné le projet de recherche et a supervisé les travaux et les discussions scientifiques entourant ce projet. Dans cette étude, l'étudiante a aussi bénéficié du support de Stéphane Salmieri, assistant de recherche, INRS, Institut Armand Frappier.

## 5.2. Article 1: Encapsulation of coenzyme Q<sub>10</sub> in a simple emulsion-based nutraceutical formulation and application in cheese manufacturing

Iulia Stratulat<sup>a</sup>, Michel Britten<sup>bc</sup>, Stéphane Salmieri<sup>a</sup>, Daniel St-Gelais<sup>bc</sup>, Claude P. Champagne<sup>bc</sup>, Patrick Fustier<sup>b</sup>, Monique Lacroix<sup>ac,\*</sup>

*<sup>a</sup>Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Centre, INRS – Institut Armand-Frappier, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7*

*<sup>b</sup>Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada 3600 Casavant Blvd. West, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 8E3*

*<sup>c</sup>Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF), Laval University, Québec City Canada*

\* Corresponding author, Professor Monique Lacroix Telephone: +1-450-687-5010; 25 Fax: +1-450-686-5501;

**E-mail: [monique.lacroix@iaf.inrs.ca](mailto:monique.lacroix@iaf.inrs.ca)**

**Cet article a été soumis au journal *Food Chemistry* le 9 janvier 2013**



### 5.3. Résumé

La coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) a été encapsulée avec succès dans une formulation nutraceutique composée de caséinate de calcium, d'huile de lin et de lécithine. L'effet de la CoQ<sub>10</sub> sur la stabilité physico-chimique des émulsions a été déterminé comparativement aux émulsions sans CoQ<sub>10</sub>. Selon les mesures de stabilité physique, les deux émulsions ont été stables pendant 15 jours, mais selon l'analyse FTIR, les émulsions ont été plus stables en présence de la CoQ<sub>10</sub>. L'émulsion avec la CoQ<sub>10</sub> a été utilisée comme une crème fonctionnelle dans la fabrication du fromage. Le taux de rétention de la CoQ<sub>10</sub>, la composition et le rendement fromager ont également été mesurés. La quantification de CoQ<sub>10</sub> par HPLC a montré que la rétention de cet agent lipophile dans la matrice fromagère était de 93% et équivalent à la quantité de lipides retenus. La rétention des protéines et le rendement fromager n'ont pas été modifiés comparativement au témoin. Pour la première fois, la CoQ<sub>10</sub> a été encapsulée dans une matrice fromagère, ce qui démontre qu'elle pourrait être utilisée dans le développement de fromages fonctionnels.

**Mots-clés:** *émulsion, stabilité, encapsulation, coenzyme Q<sub>10</sub>, fromage*

## 5.4. Abstract

Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) was encapsulated successfully in a nutraceutical formulation composed of calcium caseinate, flaxseed oil and lecithin. The effect of CoQ<sub>10</sub> on the physico-chemical stability of emulsions was determined against emulsions without CoQ<sub>10</sub>. According to light scattering profile both emulsions were stable for 15 days, but according to FTIR analysis, emulsions were found to be more stable in presence of CoQ<sub>10</sub>. The emulsion with CoQ<sub>10</sub> was used as a functional cream in cheese making process. The retention rate of CoQ<sub>10</sub>, composition and cheese yield were also measured. Quantification of CoQ<sub>10</sub> by HPLC showed that the retention of this lipophilic agent into cheese matrix was 93% and equivalent to the amount of retained lipids. Protein retention and cheese yield were not changed compared to control. For the first time, CoQ<sub>10</sub> has been encapsulated in a cheese matrix, hence demonstrating that CoQ<sub>10</sub> could be used in the development of functional cheeses.

## 5.5. Introduction

Dairy products, known for their high nutritional density, are considered as privileged vehicles for the transport of active molecules. However, the addition of bioactive compounds in cheese poses a significant challenge because of whey losses during cheese making, which can reach 95% (Law, 2001), and its influence on the sensory properties of the product. This challenge requires an immobilization method to optimize the retention of bioactive agents in cheese.

Oil-in-water (O/W) emulsions are currently among the most widely used methods of encapsulating bioactive lipids, but they are often susceptible to breakdown over time or when exposed to certain environmental stresses during production, transportation, storage or utilization (McClements *et al.*, 2007).

Milk proteins, especially caseinates, are effective emulsifiers and have been successfully used for protecting sensitive oils and oil-soluble bioactives against oxidation (Hu *et al.*, 2003). These proteins adsorb rapidly at the oil–water interface during emulsification and provide long-term stability to O/W emulsions (Dickinson, 1999). It was also shown that casein micelles can be used as potential vehicles for hydrophobic nutraceutical substances (Semo *et al.*, 2007).

Different antioxidants (such as vitamins A, tocopherol, CoQ<sub>10</sub>, carotenoids) present or incorporated in vegetable oils inhibit or slow lipid peroxidation especially in products rich in polyunsaturated fatty acids. CoQ<sub>10</sub> is a fat-soluble component which plays a fundamental role in generating cellular energy through the mitochondrial respiratory chain and is also a major antioxidant in the organism. CoQ<sub>10</sub> was proved to be much more effective than vitamin E to inhibit lipid peroxidation of low-density lipoproteins (Ingold *et al.*, 1993). In addition, CoQ<sub>10</sub> plays an important role in the regeneration of vitamin E (Ingold *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1994). Its use in conjunction with other antioxidants or polyunsaturated fatty acids opens important perspectives in terms of nutritional prevention of numerous diseases (Mattila *et al.*, 2001). CoQ<sub>10</sub> brings benefits to the heart and can improve immune functions (Hadj *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). It offers great promises for cancer treatments and is also effective in the treatment of hypertension, various neurological disorders, diabetes, obesity, etc. (Albano *et al.*, 2002; Rosenfeldt *et al.*, 2007; Shults *et al.*, 2002). As a prophylactic, CoQ<sub>10</sub> is used to boost energy and fight against migraines, fatigue and aging (Ochoa *et al.*, 2007; Sohal *et al.*, 2007).

Flaxseed oil contains about 58% alpha-linolenic acid (ALA). Now, the role of this omega-3 is increasingly recognized in the prevention and treatment of various chronic and cardiovascular diseases, diabetes, arthritis, cancer, neurological and visual disturbances, autoimmune diseases and other inflammatory disease (Cunnane *et al.*, 1993; Dwivedi *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2011). According to several studies, the omega-6/omega-3 fatty acid ratio seems to be more important than the absolute consumption of omega-3 to reduce the risk of many chronic diseases of high prevalence in Western societies, as well as in developing countries (Larsson *et al.*, 2004; Simopoulos, 2008).

Taking into account the complementarity and synergy of CoQ<sub>10</sub> and flaxseed oil, this coenzyme was incorporated into Cheddar cheese using optimized emulsions, containing calcium caseinate, linseed oil and lecithin as main components. Although sodium caseinate is a better emulsifier than calcium caseinate, the first inhibits the coagulation of the cheese milk (Gaygadzhiev *et al.*, 2011). At high concentrations (> 2%), in contrast to sodium caseinate emulsions, the creaming stability of calcium caseinate emulsions shows no depletion flocculation and they have a monomodal size distribution (Srinivasan *et al.*, 1999; Srinivasan *et al.*, 2001). We assume that the calcium caseinate will have a positive impact on cheese yield thanks to  $\alpha$ -casein molecules which stabilize the fat globules in the developed emulsions. From this, the first objective of this study was to evaluate the effect of CoQ<sub>10</sub> encapsulation on the physico-chemical properties of the emulsion such as particle size, physical stability, chemical stability to oxidation and morphology. The second objective was to determine the rate of encapsulation of CoQ<sub>10</sub> and its effect on the composition and cheese yield in a context of manufacture feasibility.

## 5.6. Materials and methods

### 5.6.1. Materials

Calcium caseinate (Alanate® 380) was obtained from Fonterra Cooperative Group Ltd (Auckland, New Zealand; protein concentration of 97%); soybean lecithin Ultralec F (71-75% phospholipids) was purchased from ADM (Decatur, IL, USA) and CoQ<sub>10</sub> from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Flaxseed oil (first cold pressed) was bought in a local market. Commercial Chy-Max® rennet (CHYE-002; Chr. Hansen Inc., Milwaukee, WI, USA) and commercial pasteurized milk (1% fat and 3.25% protein, w/v), dairy cream (35% fat) were employed in manufacturing cheese. Lab kit Total Lipids was obtained from

Shemelex, S.A. (Barcelona, Spain) and MaxSignal® No-Mel Total Protein Assay Test Kit from Bioo Scientific Corp. (Austin, TX, USA). Methanol and n-hexane were HPLC-grade (Baker, Phillipsburg, NJ, USA).

### **5.6.2. Preparation of emulsions**

Two types of emulsions were prepared. CoQ<sub>10</sub> (30 µg mL<sup>-1</sup> of emulsion) was added to the oil phase of emulsion in order to measure its effect on droplet size, physical and chemical stability compared to the optimised emulsion (without CoQ<sub>10</sub>). The emulsions were prepared by mixing flaxseed oil (30 g) containing 2% (w/w oil) lecithin, and 70 g calcium caseinate dispersion (3.0% w/v). To prepare this emulsion, calcium caseinate was solubilized in phosphate buffer (5 mM, pH 6.7). Then soy lecithin was solubilized in flaxseed oil at 60°C. Finally, the oil phase was gently incorporated into aqueous phase, at room temperature. The resulting emulsion was heated to 40°C and was then homogenized. The emulsification was performed using Ultra-Turrax T25 at 17,000 rpm for 2 min and then with the M-110P microfluidization, 2 cycles at 70 MPa plus 1 cycle at 35 MPa, at 10°C. In all emulsions 0.02% of sodium azide was added as an antimicrobial.

### **5.6.3. Particle size analysis and physical stability of emulsions**

Z-average hydrodynamic diameter was determined at 25°C by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Inc., Southborough, MA, USA). Before measurements, emulsion samples were diluted either 1:200 (v/v) in a dissociating buffer followed by dilution 1:5 (v/v) in deionized water. The dissociating buffer contained 8 M urea, 50 mM EDTA, and 10 mM β-mercaptoethanol and was adjusted to pH 6.8 using 1 N NaOH. The dissociating buffer was filtered (45 µm) before use to eliminate dust particles.

The physical stability of emulsions was estimated using a vertical scan analyser Quick Scan (Beckman Coulter Canada, Inc. Mississauga, ON, Canada). The samples were put in a cylindrical glass measurement cell and were stored at 4°C between each measurement. The backscattering intensity was recorded as a function of the sample height (total height 50 mm) in quiescent conditions at 20°C. Measurements were performed 24 h after preparation of the emulsions and up to 28 days. The separation of whey during storage was determined

by measuring the ratio of serum height to total sample height as a function of time according to the following formula:

$$H_i(\%) = H_w/H_{total} \cdot 100 \quad (14)$$

where  $H_w$  is the serum height,  $H_{total}$  is the total height of the sample, and  $H_i$  is the ratio at quiescent storage time. Serum height (mm) was measured on the backscattering profile. The limit between serum and bulk phases was arbitrary chosen at 80% intensity on the backscattering scale.

#### **5.6.4. Optical microscopy**

Optical microscopy was carried out with an Axioscope A1 (Zeiss, Göttingen, Germany) at contrast phase, with an oil immersion target x100 and x40. It is connected to a digital camera for image capture. The emulsions stored at 40°C were diluted with phosphate buffer (1:100) and analyzed at 0, 5, 7 and 10 days of storage.

#### **5.6.5. Viscosity measurements**

The viscosity measurements were performed using a programmable viscometer Brookfield LVDV-II + (Gardner, Columbia, USA) with a UL (Ultra-Low) adapter. All measurements were performed at room temperature.

#### **5.6.6. Evaluation of emulsion stability by ATR-FTIR analysis**

The chemical stability of emulsions to oxidation was evaluated for 10 days at 40°C, in order to simulate an accelerated process of storage conditions, according to a procedure from Masmoudi *et al.* (2005). A volume of 13 mL of each emulsion was distributed in 15 mL sealed tubes containing a 2 mL head space (air). The tubes were then placed in an oven at 40°C. The chemical stability of emulsions was assessed by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR) analysis after 5, 7 and 10 days in comparison with fresh emulsions. FTIR analysis was performed using a Spectrum One spectrometer (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, MS, USA) equipped with a ATR sampling accessory. Analysis was performed within the spectral region of 650-4000

cm<sup>-1</sup>, using 64 scans recorded at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> using Spectrum software (version 6.3.5). Spectra were normalized with a limit ordinate of 1.5 absorbance units and elongation vibrational bands νC=CH and νC=O were compared.

Unsaturation index corresponded to elongation νC=CH band at 3010 cm<sup>-1</sup> and carbonyl index to νC=O band at 1744 cm<sup>-1</sup>, as mentioned below:

$$\text{Unsaturation index} = A_{3010} / (A_{3010} + A_{2925} + A_{2854}) \quad (15)$$

$$\text{Carbonyl index} = A_{1744} / \sum A_{1800-650} \quad (16)$$

where  $\sum A_{1800-650}$  is the sum of the areas between 1800 and 650 cm<sup>-1</sup>.

### 5.6.7. Cheese making procedure and compositional analysis of cheese

Laboratory-scale manufacture of model cheese, the calculation of cheese yield and the retention rate of lipids and proteins was carried out according to a method described by Morin *et al.* (2008). Emulsions made of flaxseed oil and containing CoQ<sub>10</sub> (30 µg mL<sup>-1</sup> emulsion) were used as functional creams to standardize the cheese milk to a protein-fat ratio of 1.2. Results were compared to a cheese prepared with dairy cream (control).

Samples of skim milks, standardized milks and whey from cheese model manufacture were analyzed for total solids (TS) by dehydration in an air oven at 98-100°C for 3 h (method 925.23; AOAC, 1990). Proteins and lipids were determined by using MaxSignal® No-MeI Total Protein Assay Test Kit and Labkit Total Lipids.

### 5.6.8. Determination of the retention rate of CoQ<sub>10</sub> in cheese by HPLC

The effectiveness of encapsulation of CoQ<sub>10</sub> in the form of simple emulsions was determined by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), in a model cheese made at laboratory scale. CoQ<sub>10</sub> was extracted from samples and quantified by HPLC, according to a modified method described by Karpińska *et al.* (2006). For the extraction of CoQ<sub>10</sub>, 0.25 g of cheese was used. HPLC analysis was carried out on a Waters System 510 (Waters Chromatography, Milford, MA, USA) consisting of a model 510 pump, a 490 Programmable Multiwavelength Detector and a model U6 K Universal Liquid Chromatograph injector. Empower® System software (version for Windows NT) was used for data acquisition. A Zorbax SB-C18, 4.6 mm ID x 150 mm (5µm) column (Agilent Technology, Wilmington, DE, USA) was used to quantify this coenzyme with a

mobile phase of methanol – n-hexane 72:28 (v/v). The flow rate was 1 mL min<sup>-1</sup> and detection was performed at 292 nm.

CoQ<sub>10</sub> recovery level was calculated according to the following equation:

$$\text{CoQ}_{10} (\%) = (\text{Amount of CoQ}_{10} \text{ in cheese} / \text{amount of CoQ}_{10} \text{ introduced in cheese milk}) \times 100 \quad (17)$$

### 5.6.9. Statistical analysis

For each measurement, three replicate in each samples were tested (n = 3). Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple-range tests were used to perform statistical analysis on all results, using PASW 18 Statistics software (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Differences between means were considered to be significant when  $P \leq 0.05$ .

## 5.7. Results and discussion

### 5.7.1. Particle size analysis and physical stability of the emulsions

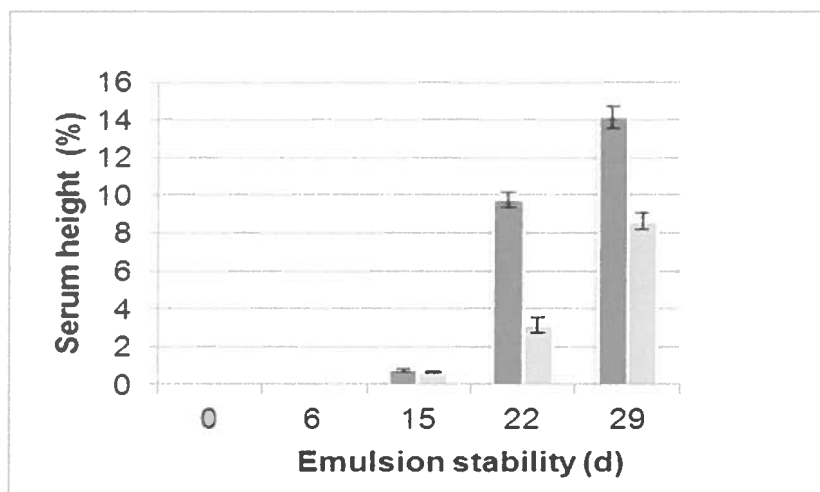
Results of droplet size showed that the average droplet size of emulsions was  $366.7 \pm 3.4$  nm in absence of coenzyme and  $320.1 \pm 4.0$  nm in presence of CoQ<sub>10</sub>. The polydispersity index of the fat droplets was  $< 0.5$ . Determination of the viscosity revealed that flaxseed oil with CoQ<sub>10</sub> are less viscous ( $38.7 \pm 0.5$  mPa·s) than flaxseed oil without CoQ<sub>10</sub> ( $48.6 \pm 0.8$  mPa·s) at a shear rate of  $66 \text{ s}^{-1}$ . The decrease in the oil viscosity has facilitated the disruption of fat droplets and the reduction of their size. According to Tosh *et al.* (1998), the fat globules of 265 to 640 nm are compatible with the cheese matrix, while fat globules with smaller diameters decreased the rennet coagulation time and the curd firming rate. Therefore, the size of the fat globules of studied emulsions was in a suitable range for the manufacture of cheddar cheese.

Quick Scan analysis was used to evaluate the physical stability of emulsions. Indeed, neither creaming, nor coalescence phenomena were recorded during 1 month. A thin layer of serum was detected after 15 days of storage as a result of the gelation of emulsions. According to various authors, gelling emulsions can result from several factors such as microfluidization, a decrease of temperature or pH in the presence of proteins and/or



calcium (Dickinson, 2006; Eliot *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011). Sodium azide was added to the studied samples in order to prevent actions of microbial origin. Moreover, pH measurements showed that the acidity of emulsions stored at 4°C did not change, hence suggesting that this phenomenon was not of microbial origin. The ratio in percentage of serum height to total sample height from transmission profiles at different times is illustrated in **Figure 5.1**. Results show that the amount of released serum is higher in absence of CoQ<sub>10</sub>. The decrease in the size of fat globules increases the surface area of contact between the protein network and fat particles within the gelled emulsions. Therefore, the ability of the gel contraction is weakened and the amount of whey removed is reduced (Michalski *et al.*, 2002).

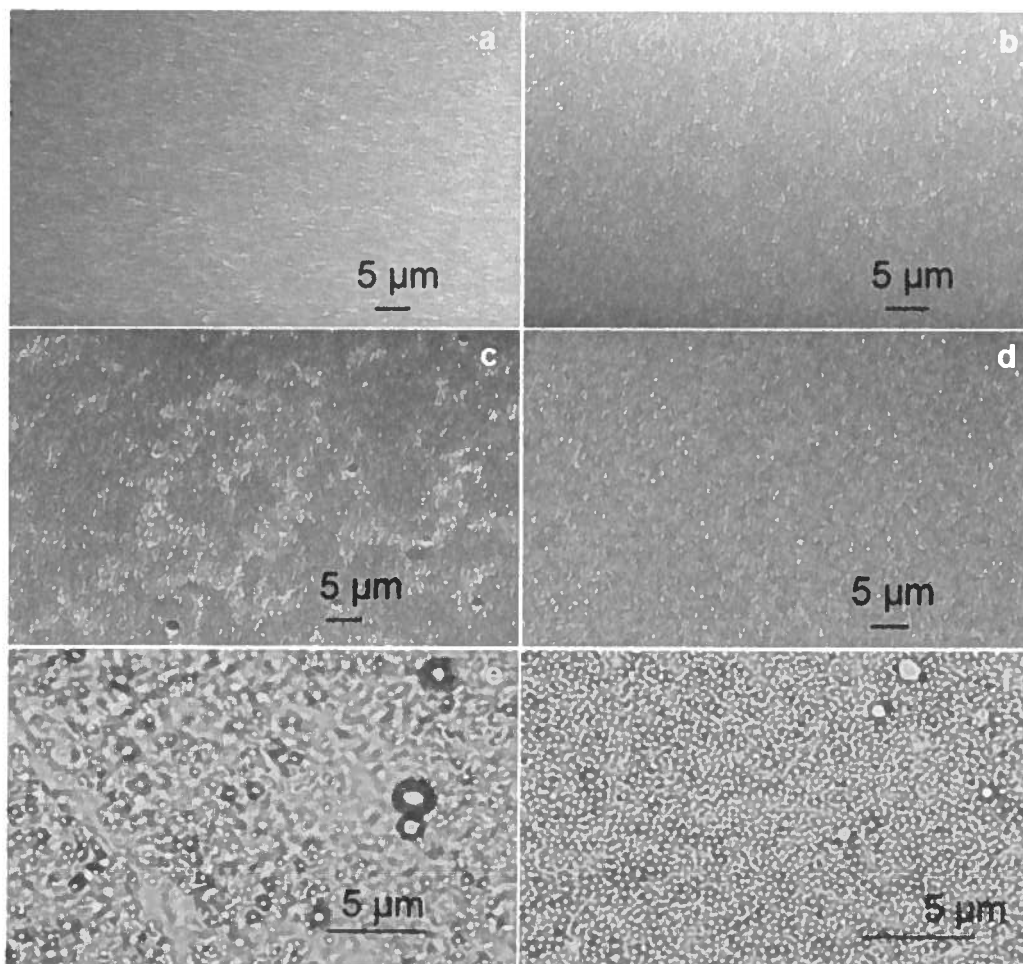
Gelation of emulsions suggested that developed emulsions should not diminish the coagulating properties of cheese milk. The particle size and stability of these emulsions were assessed as suitable for the manufacture of cheddar cheese.



**Figure 5.1:** Physical stability of emulsions with and without CoQ<sub>10</sub>, expressed as a percentage of syneresis. Ratio in percentage of serum height to total sample height from transmission profiles at different time. ■ - emulsion without CoQ<sub>10</sub>; □ - emulsion with CoQ<sub>10</sub>; d – days.

### 5.7.2. Evaluation of emulsion stability by optical microscopy and ATR-FTIR analysis

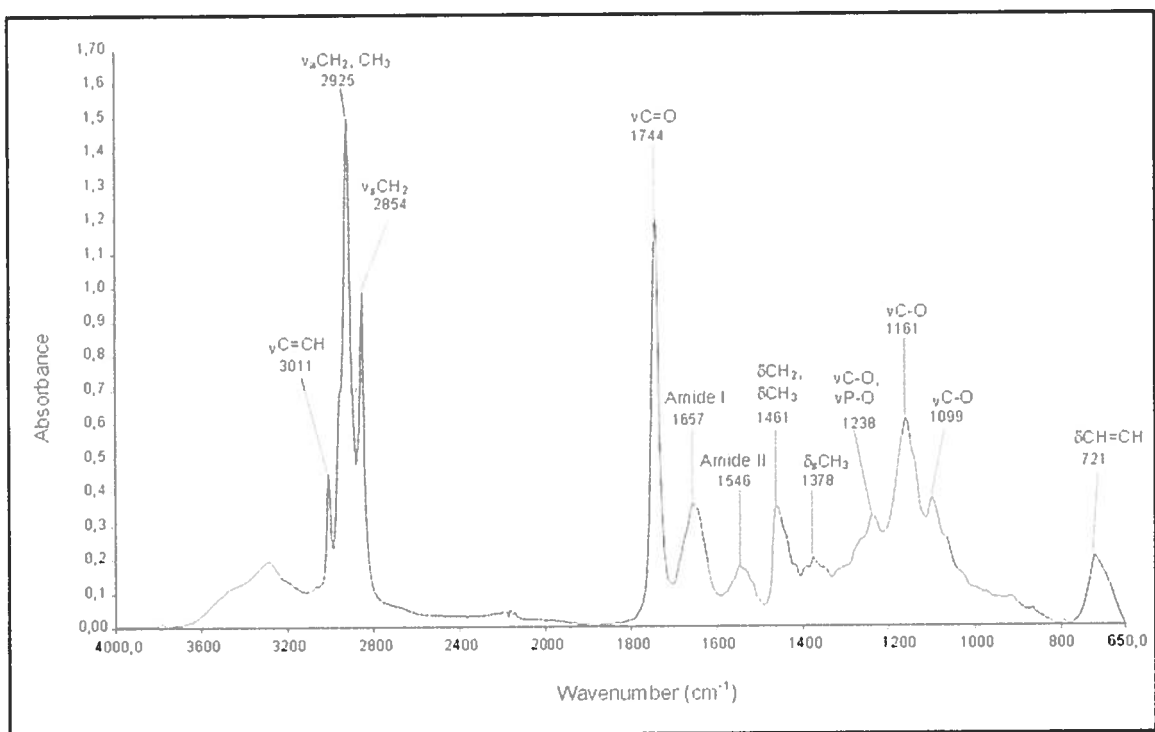
Microscopic views of emulsions without CoQ<sub>10</sub> and in presence of ubiquinone, during storage at 40°C, are illustrated in **Figure 5.2**. These results suggest that emulsions without CoQ<sub>10</sub> were less stable than emulsions with CoQ<sub>10</sub>.



**Figure 5.2.** Microscopic views of emulsions formulated with flaxseed oil at different storage times during accelerated aging measurements at 40°C. Emulsion without CoQ<sub>10</sub> after 0, 5 and 10 days of aging (a, c, e). Emulsion with CoQ<sub>10</sub> after 0, 5 and 13 days of aging (b, d, f). Microscopic views were carried out at x40 (a, b, c, d) and with an oil immersion target at x100 (e, f).

Evaluation of the chemical stability of emulsions by FTIR required the identification of typical vibration bands related to chemical functions of lipids and proteins more susceptible to oxidation. **Figure 5.3** shows the FTIR spectrum of flaxseed oil emulsion in the region 4000-650 cm<sup>-1</sup> and the band assignments, determined by reference to previous works (Guillén *et al.*, 2008; Lazzari *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2006; Whittinghill *et al.*, 1999).

Modifications of unsaturation and carbonyl indices during the storage at 40°C of studied emulsions are illustrated in **Figure 5.4**. Spectral changes occurred during aging, and led to a significant decrease ( $p \leq 0.05$ ) of the unsaturation index (associated with a decrease of  $\nu\text{C}=\text{CH}$  intensity at 3010 cm<sup>-1</sup>) for both emulsions with and without CoQ<sub>10</sub>. However, the



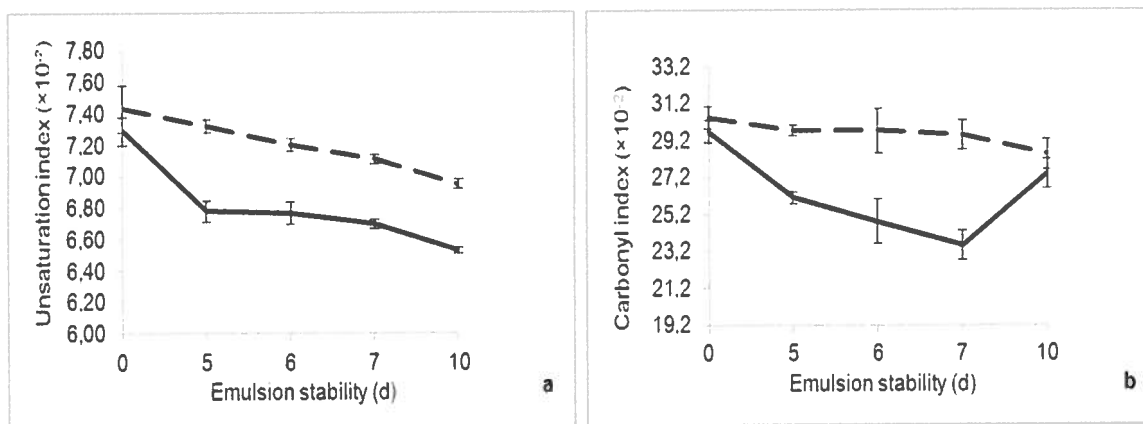
**Figure 5.3: FTIR spectrum of developed emulsion and band assignments related to its components in the region 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ .**

$\nu$  - stretching vibrations,  $\delta$  - bending vibrations, s - symmetric, a – asymmetric.

emulsion with CoQ<sub>10</sub> was less affected by oxidation. The decrease in unsaturated index of these emulsions was lower during 10 days of aging compared to emulsions without CoQ<sub>10</sub> and no significant difference was observed during the intermediate period (Days 5-7). A significant decrease ( $P \leq 0.05$ ) of the carbonyl index (associated with a decrease of  $\nu\text{C}=\text{O}$  intensity at  $1744 \text{ cm}^{-1}$ ) was also noted only for emulsion without CoQ<sub>10</sub>. On the other hand, no significant variation ( $P > 0.05$ ) of this index was measured in emulsion containing CoQ<sub>10</sub> in the overall period (Days 0-10), suggesting that the incorporation of CoQ<sub>10</sub> maintained the stability of emulsion over storage, with less susceptibility to oxidation.

Hence, the addition of CoQ<sub>10</sub> delayed lipid oxidation and therefore increased the stability of the emulsion. The reduced form of CoQ<sub>10</sub> has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation by preventing the production of alkyl radicals ( $\text{R}\cdot$ ) and lipid peroxy radicals ( $\text{ROO}\cdot$ ) (Thomas *et al.*, 1995). In emulsions, oxidation is a reaction which is initiated at the interface of the two phases (McClements *et al.*, 2000). Lipophilic antioxidants concentrate at the oil–water interfaces and inhibit lipid oxidation (Di Mattia *et al.*, 2009). These observations suggest that CoQ<sub>10</sub> could interact with phospholipids and strengthens

oil/water interface and consequently better protect oil from oxygen and prevent coalescence.



**Figure 5.4 Evolution of emulsions stability under the effect of heat stress at 40°C: a) unsaturated index (related to  $\nu\text{C}=\text{CH}$ ); b) carbonyl index (related to  $\nu\text{C}=\text{O}$ ) of emulsions. — emulsion without CoQ<sub>10</sub>; - - emulsion with CoQ<sub>10</sub>; d - days.**

In conclusion, although in the presence of CoQ<sub>10</sub>, emulsions showed a higher resistance to oxidation, slight differences between the two types of emulsions indicate that even in the absence of CoQ<sub>10</sub>, emulsions had good antioxidant properties. This is not surprising since caseinates are pro-oxidant chelators and lecithin shows several antioxidant mechanisms according to system components (Hu *et al.*, 2003; Judde *et al.*, 2003; Ramadan, 2012). Therefore, these results confirm that developed emulsions are systems adapted to the encapsulation of lipophilic molecules for cheese making.

### 5.7.3. Retention rate of CoQ<sub>10</sub> and cheese yield

The retention of a lipophilic compound (CoQ<sub>10</sub>) in a simple form of emulsion in the cheese matrix was tested. The retention time in the HPLC analysis was  $7.2 \pm 0.12$  min. The recovery level of CoQ<sub>10</sub> was determined to 93.2%. In order to check the accuracy of these results, data were compared with the amount of fats lost in whey (7.1 %). Hence, the relative loss of CoQ<sub>10</sub> (~7%) corresponds to the relative loss of fats content determined in whey, which demonstrates the efficiency of encapsulation of CoQ<sub>10</sub> in flaxseed oil particles in enabling a high recovery of the bioactive ingredient in the cheese matrix. Our results are in accordance with recent research published demonstrating that the encapsulation of CoQ<sub>10</sub> in lecithin-based nanostructured lipid carriers (NLC) showed a good stability and a high rate of encapsulation of 98% (Liu *et al.*, 2012).

Figure 5.5 shows the impact of the incorporation of CoQ<sub>10</sub> on the composition and yield of cheese. The lipids retention is higher compared to the control cheese and corresponds to the amount of CoQ<sub>10</sub> retained in the curd. However, the retention of proteins and corrected cheese yield were not changed compared with the control.

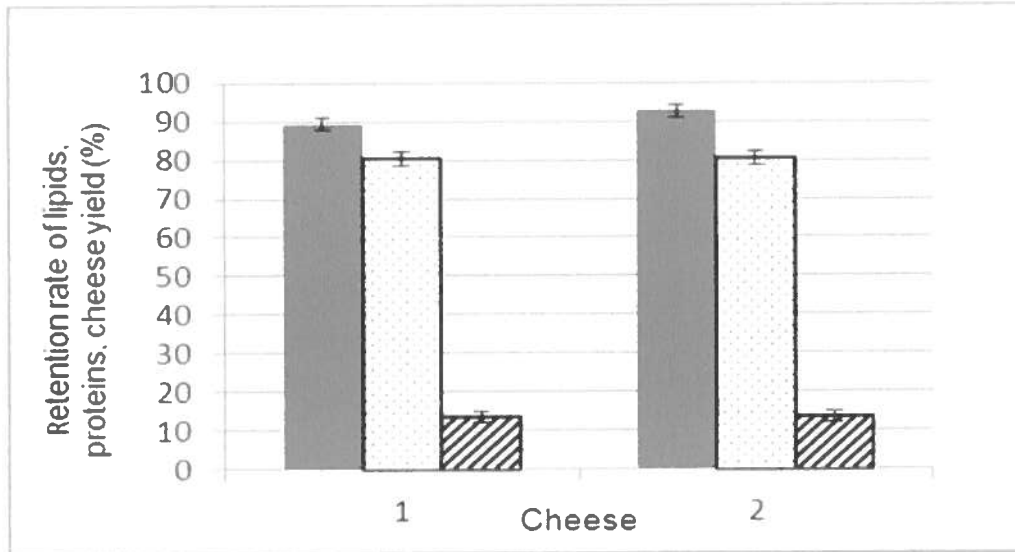


Figure 5.5: Effect of the fortification by CoQ<sub>10</sub> on cheese composition and cheese yield. 1 – control, 2 –cheese enriched with CoQ<sub>10</sub>; ■ - retention rate of lipids; □ - retention rate of proteins; ▨ - cheese yield.

The retention rate of lipids is a good indicator of the strength and cohesion of the paracasein matrix (Morin *et al.*, 2008). A well-structured curd tends to lose less protein and fat falling on decurdling and draining (Hurtaud *et al.*, 1995). Therefore, the integration of CoQ<sub>10</sub> in the cheese matrix did not affect cheese yield and the wedged structure.

In conclusion, the stabilization of the fat particles by calcium caseinate led to the formation of a well-structured curd capable of holding a large quantity of lipids and proteins.

## 5.8. Conclusion

For the first time, CoQ<sub>10</sub> has been successfully introduced in cheese matrix in the form of simple emulsions. Developed emulsions showed good physical and chemical stability, and the incorporation of CoQ<sub>10</sub> improved the resistance of the emulsion to oxidation. The fat globules stabilized by calcium caseinate allowed incorporating up to 93% of CoQ<sub>10</sub> in the curd and retaining a significant amount of fat and proteins without affecting cheese yield

compared to control. From this investigation, the impact of CoQ<sub>10</sub> on the composition of cheese is promising. The high level of recovery of CoQ<sub>10</sub> (> 93%) in the curd reflects a good compatibility between emulsions containing CoQ<sub>10</sub> and other ingredients of cheese matrix. Hence, this study clearly showed that CoQ<sub>10</sub> could be used as a bioactive agent in the development of functional cheeses. Given that the encapsulation of CoQ<sub>10</sub> had a positive effect on the stability of emulsions, the formulation developed in this study could serve as a vector system of lipophilic molecules for nutraceutical purposes.

## **5.9. Acknowledgments**

This research was supported by a grant from the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), Novalait Inc. as well as Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC). Iulia Stratulat was the recipient of an Excellence Grant from the Fondation Armand-Frappier.

## 6. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2

### 6.1. Contributions de l'étudiante à l'article 2

Une étroite collaboration entre l'étudiante et tous les co-auteurs de l'article présenté a permis de réaliser cette étude. La formulation des émulsions et les techniques de la quantification des vitamines A, E et CoQ<sub>10</sub> par HPLC, ainsi que l'analyse de MDA a été mis au point par Iulia Stratulat. La fabrication du fromage cheddar à l'échelle de laboratoire a été effectuée selon le protocole élaboré au CRDA et grâce aux conseils de membres de CRDA, plus particulièrement du co-directeur de recherche de ce projet, Dr Michel Britten. Comme mentionné précédemment, la mesure de la taille des particules et la stabilité physique des émulsions développées ont été effectuées dans les laboratoires du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments (CRDA). L'ensemble des manipulations et le traitement des données, ainsi que la rédaction du manuscrit ont été exécutés par l'étudiante. L'article a été corrigé et amélioré selon les opinions de tous les co-auteurs de ce manuscrit. L'étudiante a bénéficié du support du Pr. M. Lacroix et de S. Salmieri, INRS; M. Britten, CRDA. Le Pr. Monique Lacroix, responsable scientifique et coordinatrice du projet de recherche, était impliquée dans la démarche, le suivi et les discussions scientifiques entourant ce projet.

## **6.2. Article 2: Enrichment of cheese with bioactive lipophilic compounds**

Iulia Stratulat<sup>a</sup>, Michel Britten<sup>b</sup>, Stephane Salmieri<sup>a</sup>, Daniel St-Gelais<sup>b</sup>, Claude Champagne<sup>b</sup>, Patrick Fustier<sup>b</sup>, Monique Lacroix<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Research Laboratories in Sciences Applied to Food, Canadian Irradiation Centre, INRS – Institut Armand-Frappier, 531, Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7*

<sup>b</sup>*Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada 3600 Casavant Blvd. West, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 8E3*

<sup>c</sup>*Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF), Laval University, Québec City Canada*

\* Corresponding author, Professor Monique Lacroix Telephone: +1-450-687-5010; 25 Fax: +1-450-686-5501;

**E-mail: [monique.lacroix@iaf.inrs.ca](mailto:monique.lacroix@iaf.inrs.ca)**



### 6.3. Résumé

Deux formulations d'émulsions ont été développées pour l'encapsulation des agents bioactifs lipophiles dans le fromage cheddar. Les Ingrédients bioactifs (vitamine E, A et CoQ<sub>10</sub>) ont été ajoutés dans l'huile de lin avant la préparation de l'émulsion. Les émulsions ont été stabilisées avec le caséinate de calcium en présence ou en absence de la lécithine et utilisé pour standardiser le lait fromager. Le rendement fromager et les taux de rétention des protéines, des gras et des composants actifs encapsulés ont été déterminés. Une évaluation quantitative de la concentration des ingrédients bioactifs et leur activité antiradicalaire a été effectuée jusqu'à 90 jours de conservation à 4°C. L'enrichissement en acides gras oméga-3 a été évalué par la spectroscopie ATR-FTIR et l'indice d'insaturation des lipides était 36 fois plus élevé que celui du fromage témoin. Le taux de récupération des vitamines E, A et CoQ<sub>10</sub> dans le fromage était respectivement 92, 90 and 93% et avec 26, 15 et 8% plus élevé en présence de lécithine. Une bonne compatibilité entre les agents bioactifs a été révélée lors de l'encapsulation des vitamines A, E et CoQ<sub>10</sub> dans la même matrice fromagère. De plus, la vitamine E a été régénérée après 3 mois d'entreposage, possiblement dû à la contribution de CoQ<sub>10</sub>. Les résultats de l'étude ont démontré que l'encapsulation des agents bioactifs lipophiles dans la matrice fromagère sous la forme de particules émulsionnées a permis d'augmenter leur rétention dans le caillé, en conservant ainsi leur bioactivité et la stabilité chimique des fromages pendant l'entreposage, tout en améliorant le rendement du fromage fortifié.

*Mots-clés: émulsion, stabilité, rendement fromager, agent bioactif, fromage.*

## 6.4. Abstract

Two emulsion formulations have been developed to encapsulate lipophilic bioactive compounds in Cheddar cheese. Bioactive ingredients (vitamin E, A and CoQ<sub>10</sub>) were added to flaxseed oil before emulsion formation. The emulsions were stabilized with calcium caseinate in presence or absence of lecithin and used to standardize cheese milk. Cheese yield and retention rate of proteins, fats and bioactive components were determined. Quantification of bioactives and antioxidant properties of cheeses were performed up to 90 days of storage at 4°C. Enrichment in omega-3 fatty acid of fortified cheese was evaluated by ATR-FTIR spectroscopy and unsaturation index of lipids was found 36 times higher than control. Recovery level of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese was respectively 92, 90 and 93% in presence of lecithin and by 26, 15 and 8% higher than in absence of lecithin. A good compatibility between vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> was observed during their co-encapsulation in cheese matrix. In these cheeses, vitamin E was regenerated after 3 months of storage possibly due to CoQ<sub>10</sub> contribution. Results also showed that the encapsulation of bioactive ingredients in cheese under the form of emulsified particles allowed increasing their retention in the curd, hence maintaining their bioactivity and the chemical stability of cheese during storage, with improved fortified cheese yield.

*Keywords:* Emulsion, Stability, Recovery level, Bioactive agents, Cheese.

## 6.5. Introduction

In recent decades, functional foods have become more popular as consumers require highly nutritional value of foods and trying to find compounds that can improve their health and prevent various diseases. As dairy products have a high nutritional value, cheeses enriched with lipophilic bioactive agents offer a new range of functional foods and meet consumers' requirements. However, when bioactive molecules are added in cheese milk, high losses in whey were observed: 50% of phospholipids, 60% of vitamin D, 95% of enzymes responsible of the cheese ripening (Banville *et al.*, 2000; Law, 2001; Turcot *et al.*, 2001). To overcome this technical issue associated with fortification of cheese, an immobilization method is necessary to optimize its retention in the curd.

Many lipophilic bioactive agents such as omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acids and carotenoids, CoQ<sub>10</sub>, plant sterols and lipophilic vitamins have been incorporated into food via emulsion-based delivery systems (Jimenez *et al.*, 2004; McClements *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2009). The simple emulsions widely used in the food industry are privileged vehicles for increasing retention and stability of fat-soluble active compounds in cheese. This emulsion process produces new cost-effective nutritive products required by consumers.

Fortified cheese with flaxseed oil, rich in alpha-linolenic acid (ALA), is an excellent food model for the delivery of omega-3 fatty acids. Substitution of milk fat by vegetable oils can contribute also to a healthier saturated/unsaturated fat balance in cheese (Yu *et al.*, 2000). The beneficial effects of ALA on human health have been associated with their ability to prevent and treat cardiovascular diseases such as hypertension and hypertriglyceridemia, diabetes, arthritis, cancer, neurological and visual disturbances, autoimmune and other inflammatory diseases (Cunnane *et al.*, 1993; Dwivedi *et al.*, 2005; Goh *et al.*, 2006; Lenzi Almeida *et al.*, 2011 ; Oomah, 2001; Zhao *et al.*, 2007). However, enrichment of foods with omega-3 fatty acid is problematic due to the high susceptibility to oxidative deterioration and rancidity development (Tong *et al.*, 2000).

The inhibition of lipids peroxidation in food may be obtained by adding different antioxidants such as vitamin A,  $\alpha$ -tocopherol, CoQ<sub>10</sub>, carotenoids, etc. (Relkin *et al.*, 2008; Wackerbarth *et al.*, 2009). Vitamins with antioxidant properties also exert a positive effect on the prevalence of certain diseases (cancer, cardiovascular disease, certain eye diseases, etc. (Blomhoff *et al.*, 2006; Laguerre *et al.*, 2007; Lúcio *et al.*, 2009; Molyneux *et al.*, 2008)

The incorporation of a combination of antioxidants might have greater health benefits than that of single antioxidants (Chen *et al.*, 2009). For instance, the combination of certain vitamins as antioxidants could lead to a synergistic action and increased efficiency by combining complementary cellular mechanisms of action.

In this study, the lipophilic bioactive ingredients (vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub>) were encapsulated into an oil-in-water (O/W) emulsion incorporated into a cheddar cheese matrix (separately or together). These emulsions were formulated with calcium caseinate and flaxseed oil in presence or absence of lecithin as surfactant.

The objectives of this study were fourfold:

- Quantification of the physico-chemical properties of developed emulsions, particle size and their physical stability.
- Determination of the unsaturation index of lipids, the recovery level of incorporated lipophilic bioactive ingredients (vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub>), their stability as well as their biological activity during cheese manufacture and over storage.
- Determination of the impact of lecithin in the emulsion stability, in the retention and stabilisation of bioactive agents incorporated into the cheese curd.
- Study of the impact of fortification on cheese composition and cheese yield.

## **6.6. Materials and methods**

### **6.6.1. Materials**

Calcium caseinate (Alanate® 380) was obtained from Fonterra Cooperative Group Ltd (Auckland, New Zealand); soybean lecithin Ultralec F (71-75% phospholipids) was purchased from ADM (Decatur, IL, USA). CoQ<sub>10</sub>,  $\alpha$ -tocopherol acetate and retinyl palmitate were provided by Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Flaxseed oil (cold pressed) was bought in a local market. Commercial Chy-Max® rennet (CHYE-002; Chr. Hansen Inc., Milwaukee, WI, USA) and milk protein concentrate MPC 70 (Idaho Milk Products, Jerome, ID, USA; protein concentration of 70.3 %), commercial pasteurized milk (0% fat and 3.2% protein, w/v) and dairy cream (35% fat) were employed in manufacturing cheese. Lab kit Total Lipids was obtained from Shemelex S.A. (Barcelona, Spain) and MaxSignal® No-Mel Total Protein Assay Test Kit from Bioo Scientific Corp. (Austin, TX, USA). Methanol and n-hexane were HPLC-grade (Baker, Phillipsburg, NJ, USA).

## 6.6.2. Preparation of emulsions

Oil-in-water emulsions prototypes were developed to encapsulated lipophilic bioactive ingredients. These emulsions consisting of 70 g of calcium caseinate dispersion (3%) and 30 g of flaxseed oil differed by the presence or absence of lecithin (2% w/w fat). The lecithin was dissolved in the oil phase at 60-65°C before the addition of bioactive ingredients. Thereafter lipophilic ingredients were dissolved in the oil phase prior to the addition of calcium caseinate according to the following concentrations: 3µg mL<sup>-1</sup> α-tocopherol acetate, 0.6 µg mL<sup>-1</sup> retinyl palmitate and 30 µg mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub>. Caseinate of calcium dispersion (3 % w/w) was prepared in phosphate buffer 0.05M, pH 6.7. The resulting mixture was heated to 40°C and was homogenized. The emulsification was performed using first an Ultra-Turrax disperser T25 at 17,000 rpm for 2 min and then a M-110P microfluidizer, with 2 cycles at 70 MPa plus 1cycle at 35 MPa, at 10°C. In all emulsions 0.02% of sodium azide was added as an antimicrobial. Vitamins A, E and COQ<sub>10</sub> have been encapsulated separately or together in the emulsions. Over 10 types of emulsions were developed as shown in table in Table 6.1.

**Table 6.1: Type and composition of developed emulsions**

Type of emulsions	Abbreviation	Composition of emulsions*	
		Lecithin (2 % w/w fat)	Bioactive agent (µg mL <sup>-1</sup> )
1. Caseinate stabilized emulsion	EC	+	—
2. Caseinate stabilized emulsion in the presence of lecithin	ECL	—	—
3. Individual encapsulation of vitamin A in EC	ECA	—	vitamin A: 0.6
4. Individual encapsulation of vitamin A in ECL	ECLA	—	vitamin A: 0.6
5. Individual encapsulation of vitamin E in EC	ECE	+	vitamin E: 3.0
6. Individual encapsulation of vitamin E in ECL	ECLE	—	vitamin E: 3.0
7. Individual encapsulation of CoQ <sub>10</sub> in EC	ECCoQ <sub>10</sub>	+	CoQ <sub>10</sub> : 30
8. Individual encapsulation of CoQ <sub>10</sub> in ECL	ECLCoQ <sub>10</sub>	—	CoQ <sub>10</sub> : 30
9. Co-encapsulation of vitamins A, E and CoQ <sub>10</sub> in EC	ECV	+	vitamin A : 0.6, vitamin E : 3.0, CoQ <sub>10</sub> : 30
10. Co-encapsulation of vitamins A, E and CoQ <sub>10</sub> in ECL	ECLV	—	vitamin A : 0.6, vitamin E : 3.0, CoQ <sub>10</sub> : 30

\* All emulsions containing 30 g of flaxseed oil, 70 g of 3 % (w/v) of calcium caseinate.

+ Presence of ingredient; — Absence of ingredient.

### 6.6.3. Particle size analysis and physical stability of emulsions

Droplet size and physical stability of the emulsions were analyzed by the EC (caseinate stabilized emulsion) and ECL (caseinate stabilized emulsion in the presence of lecithin).

Z-average hydrodynamic diameter was determined at 25°C by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Inc., Southborough, MA, USA). Prior to their measurements, the emulsions were diluted 1:200 (v/v) in a dissociating buffer followed by dilution 1:5 (v/v) in deionized water. The dissociating buffer contained 8 M urea, 50 mM EDTA and 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and was adjusted to pH 6.8 using 1N NaOH. The dissociating buffer was filtered (45  $\mu$ m) before use to eliminate insoluble urea and other particles.

The physical stability of emulsions was assessed using a vertical scan analyzer Quick Scan (Beckman Coulter, Inc. Mississauga, ON, Canada). The samples were transferred into in a cylindrical glass measurement cell and were maintained at 4°C. The backscattering (BS) and transmission (T) profiles as a function of the sample height (total height 50 mm) were studied in quiescent conditions at 20°C. Measurements were performed 24 h after preparation of the emulsions and up to 28 days. Serum separation during storage was determined by measuring the ratio of serum height to total sample height as a function of time according to the following formula:

$$Ht(\%) = Hw/Htotal \cdot 100 \quad (18)$$

Where  $Hw$  is the serum height,  $Htotal$  is the total height of the sample, and  $Ht$  is the ratio at quiescent storage time. Serum height (mm) was measured on the backscattering profile at 80%.

### 6.6.4. Cheese making procedure and compositional analysis of cheese

Laboratory-scale manufacture of model cheese, the calculation of corrected yield (CY) and the retention rate of lipids and proteins in the cheese was carried out according to a method described by Morin, Pouliot, and Britten (2008). Pasteurized skim milk and enriched with MPC has been standardized with functional creams (Tab.1) or dairy cream at protein-fat ratio of 0.8. Proteins and lipids concentration was 38.5 g·kg<sup>-1</sup> and 44.1 g·kg<sup>-1</sup> in all cheese milks.

Samples of skim milks, standardized milks and whey from the 10 types of manufactured model cheese were analyzed for total solids (TS) by dehydration in a ventilated oven at 98-100°C for 3 h (method 925.23; AOAC, 1990). Proteins and lipids were determined by using MaxSignal® No-Mel Total Protein Assay Test Kit and Labkit Total Lipids. The corrected yield was calculated (CY):

$$\text{CY (\%)} = \text{AY} \times (100 - \text{CM} - \text{WS}/100 - \text{RCM} - \text{RWS})$$

where AY is actual yield, CM is curd moisture, RCM is reference curd moisture (50%), WS is whey solids, and RWS is reference whey solids (6.9%). For corrected yield calculations, raw skim milk model cheese moisture and whey solids were used as the reference.

#### **6.6.5. Determination of recovery level of bioactives by HPLC analysis**

The retention of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in the oil-in-water emulsions was determined by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), in both the cheese model and in the whey. Vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> were extracted from 0.25 g of samples and quantified by RP-HPLC, according to a modified method of Karpińska *et al.* (2006). HPLC analysis was carried out using a Waters System 510 (Waters Chromatography, Milford, CA, USA) consisting of a model 510 pump, a 490 Programmable Multiwavelength Detector and a model U6K Universal Liquid Chromatograph injector. Empower® System software (version for Windows NT) was used for data acquisition. A Zorbax SB-C18, 4.6 mm ID x 250 mm (5µm) column (Agilent, Wilmington, DE, USA) was used to quantify CoQ<sub>10</sub>, α-tocopherol acetate and retinyl palmitate with a mobile phase of methanol – n-hexane 72:28 (v/v). The flow rate was 1 mL min<sup>-1</sup> and detection was performed at 276 nm, 292 nm and 324 nm respectively. Recovery level (RL) of encapsulated bioactive agents was calculated according to the following equation:

$$\text{RL (\%)} = (\text{Bioactive in cheese } (\mu\text{M}) / \text{Bioactive introduced in cheese milk } (\mu\text{M})) \times 100 \quad (19)$$

#### **6.6.6. Antioxidant properties of cheese**

##### **6.6.6.1 Antiradical properties**

Antiradical properties of cheese were evaluated following the procedure of Salmieri *et al.* (2006) using *N,N*-diethylphenylenediamine (DPPD) reagent (Sigma-Aldrich) and 50 mg of

cheese. FRS (free radical scavenging) capacity was expressed in mM Trolox equivalent (TE)/g cheese.

#### 6.6.6.2. Lipid oxidation

The lipid oxidation potential of cheese was evaluated by the determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A quantity of 250 mg of cheese was homogenized with 0.5 mL of deionized water and 0.5 mL of methanol. The homogenate was centrifuged at 15000 *g* for 15 min. Thereafter 1.5 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%), 0.05 mL of 0.01 M FeSO<sub>4</sub> and 1 mL thiobarbituric acid 0.8% (w/v) were added to the supernatant. The mixture was vortexed for 15 s and placed into a 100 °C water bath for 60 min and then cooled in ice. Then, 3 mL of the mixture butylacetate-butanol (85:15 v/v) was added to the sample for the extraction of trimetic complex. Samples were centrifuged at 3,000 rpm for 7 min. Absorbance was read at 535 nm using a DMS 100S spectrophotometer (Varian Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) and the concentration of malonaldehyde was calculated from a standard curve obtained using serial dilutions of a 1,1,3,3-tetramethoxypropane solution (97% (v/v) TMP; Sigma-Aldrich Canada Ltd.). TBARS values were expressed in µg malondialdehyde (MDA)/kg cheese.

#### 6.6.7. Determination of chemical stability of cheese

The chemical stability of cheeses to oxidation during 3 months of storage at 4°C was evaluated by a procedure adapted from Masmoudi *et al.* (2005), based on the measurement of the infrared absorption bands of unsaturation and carbonyl groups related to lipids and proteins.. ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy) analysis was performed using a Spectrum One spectrometer (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, MS, USA) equipped with a ATR sampling accessory. A thin cheese layer was deposited with a spatula onto the sampling plate containing zinc selenide crystal. A dry layer was formed after 15 min evaporation of water from the cheese and analysis was performed within the spectral region of 650-4000 cm<sup>-1</sup>, using 64 scans recorded at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. Spectral data were handled and processed using Spectrum software (version 6.3.5). After ATR and baseline corrections, spectra were normalized with a limit ordinate of 1.5 absorbance units. Resulting FTIR spectra were



compared in order to evaluate the chemical stability of cheese, based on the intensity of elongation vibrational bands  $\nu\text{C}=\text{CH}$  and  $\nu\text{C}=\text{O}$ .

Structural and functional indices were calculated after measuring the peak area from valley to valley. In this case, the functional groups that are most susceptible to oxidation and most likely to be altered were used for calculations as mentioned below:

$$\text{Unsaturation index} = A_{3010} / (A_{3010} + A_{2925} + A_{2855}) \quad (20)$$

$$\text{Carbonyl index} = A_{1744} / \sum A_{1800-650} \quad (21)$$

where  $\sum A_{1800-650}$  is the sum of the areas between 1800 and 650  $\text{cm}^{-1}$ .

The unsaturation index corresponds to the absorption band  $\nu\text{C}=\text{CH}$  at 3010  $\text{cm}^{-1}$  whereas the carbonyl index is related to the absorption band  $\nu\text{C}=\text{O}$  at 1744  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.6.8. Statistical analysis

A number of 10 ATR-FTIR analyses/cheese was performed before calculation of indices. All other measurements were realized in triplicate ( $n = 3$ ). Analysis of variance (ANOVA), Duncan's multiple-range test and Student- $t$  test (for MDA measurements) were used to perform statistical analysis, using PASW 18 Statistics software (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Differences between means were considered to be significant when  $p \leq 0.05$ .

## 6.7. Results and discussion

### 6.7.1 Particle size analysis and physical stability of the emulsions

The average droplet size of emulsions was  $265 \pm 3.4$  nm for EC and  $366.7 \pm 3.4$  nm for ECL suggesting that lecithin addition exert a notable effect on the particle size. The polydispersity of fat droplets was  $< 0.5$ . Similar results were reported by Henry *et al.* (2010), who obtained droplets of 280 nm for proteins and 350 nm for phospholipids. According to Tosh and Tosh *et al.* (1998), the fat globules of 265 to 640 nm are compatible with the cheese matrix, while fat globules with smaller diameters decreased the rennet

coagulation time and the curd firming rate. Therefore, the size of the fat globules of studied emulsions is suitable for the manufacture of cheddar cheese.

The physical stability of emulsions was evaluated by Quick Scan analysis. Indeed, neither creaming, nor coalescence was recorded during 1 month. The appearance of serum was noted after 6 days for EC and after 15 days of storage for ECL. The Ht value from transmission profiles at different times is shown in **Figure 6.1**. Results show that the amount of serum is higher in ECL, but it appears later (after 15 days) than in EWL (after 6 days). Gelation of emulsions can be induced by several factors such as microfluidization, a decrease of temperature or pH in presence of proteins and/or calcium (Dickinson, 2006; Eliot *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011). The pH measurements showed that the acidity of emulsions stored at 4°C did not change, hence suggesting that this phenomenon was not of microbial origin due to the use of sodium azide.

However, microfluidization and storage of emulsions at 4°C, possibly favored the gelation. The microfluidization is accompanied by a partial unfolding of adsorbed proteins, by exposure of hydrophobic regions on the surface of molecules and by increasing of caseinate-caseinate interactions between proteins surrounding adjacent droplets. (Galazka *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011; San Martin-González *et al.*, 2009). Caseinate-caseinate interactions are stabilized by hydrogen bonding interactions as the temperature is lowered (Dickinson, 2006). The overall balance of temperature-dependent attractive and repulsive forces between the casein-coated droplets is also sensitively determined by electrostatic interactions formed between protein molecules, phosphate groups and calcium ions. The electrostatic repulsions between the protein molecules were reduced and the potential for intermolecular associations of proteins in the gel-like network structure were increased (Dickinson, 2006; Dickinson, 2012).

The adsorption of lecithin to the oil-water interface reduces the interactions between proteins and slow gelation of emulsion (Dickinson *et al.*, 1996). The adsorption of surfactant on the oil-water interface will determines the microstructure and properties of the gel while serum release seems to be determined by the microstructure of the gel and the size of fat globules (Dickinson, 2012; Michalski *et al.*, 2002). Fat particles are integrated within the protein matrix and could reduce the effective pore size and obstruct micro-channels, thus reducing solvent release from the gel (Boutin *et al.*, 2007). Therefore, the ability of the gel contraction is weakened and the amount of removed whey is reduced

(Michalski *et al.*, 2002). Fat particles of EC seems to obstruct more effective the micro-channels that those of ECL.

Gelation is an important feature of the developed emulsions, because the goal was to develop an encapsulation system capable of retaining a significant amount of bioactive molecules in the cheese matrix without reducing the milk clotting properties. These emulsions are non-finished products and a stability of a few hours is appropriate for their use in the preparation of cheese.

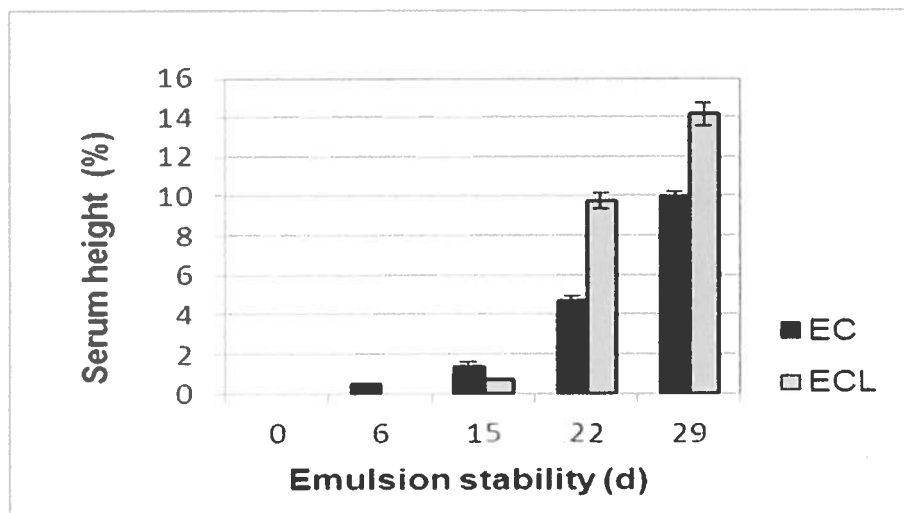


Figure 6.1: Fig.1. Physical stability of emulsions expressed as a ratio in percentage of serum height to total simple height from transmission profiles at different times. EC - caseinate stabilized emulsions, ECL - caseinate stabilized emulsions in presence of lecithin, d – days.

## 6.7.2. Retention and stability of lipophilic agents in the cheese matrix

### 6.7.2.1. Recovery level of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> individually encapsulated in cheese matrix

Figure 6.2 shows that after cheese making, the RL of vitamin E, A and CoQ<sub>10</sub> was 66, 75 and 85% in the absence of lecithin, respectively. The addition of the lecithin allowed an additional raise in RL by 26, 15 and 8% respectively. The concentrations of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> not retained in the curd were detected in whey. The evaluation of the stability of lipophilic agents incorporated during 3 months of storage showed that the content of vitamin A and CoQ<sub>10</sub> was well preserved in the presence of lecithin, while their amount decreased by 39 and 7% respectively in absence of phospholipid. Conversely, vitamin E

decreased in both cases, but with 21% more in presence of lecithin and compared to day 0. However, its quantity was higher than in the absence of phospholipid.

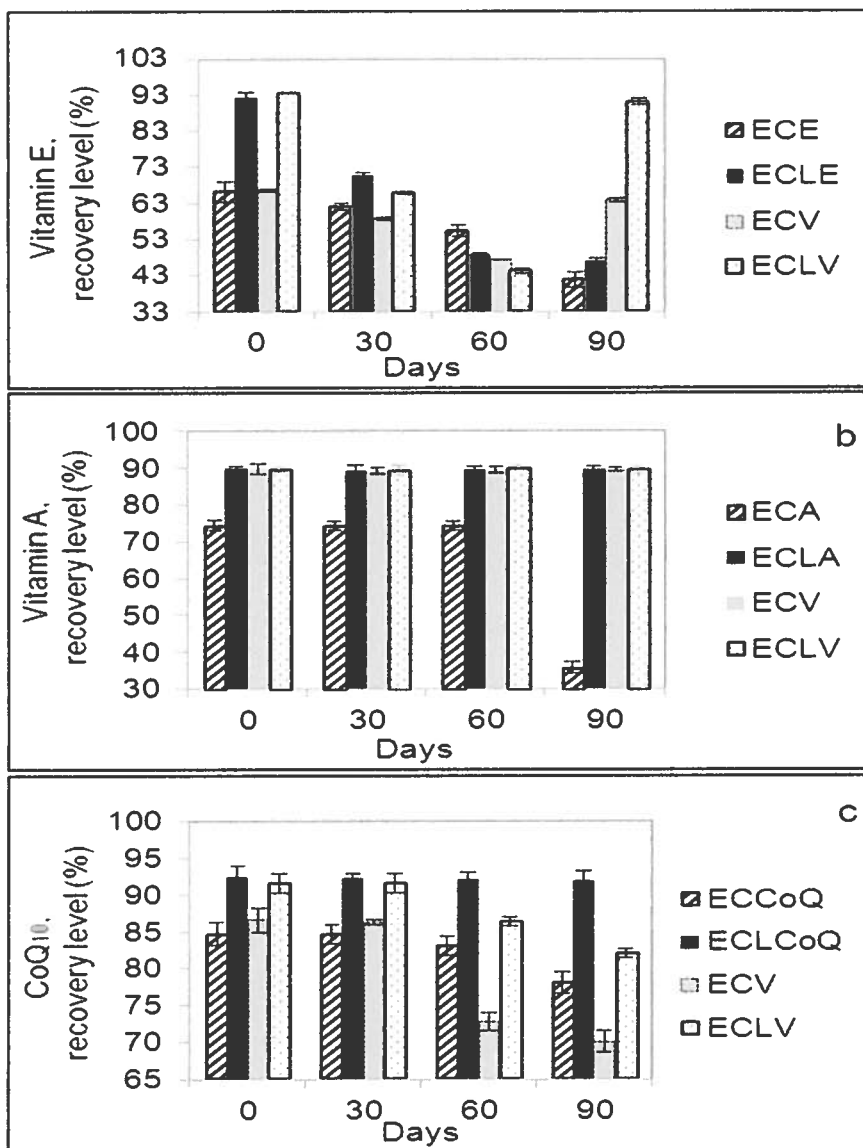


Figure 6.2: Recovery level (RL) and stability of vitamins E (a), A (b) and CoQ<sub>10</sub> (c) in cheese after during manufacture and during storage. EC - caseinate stabilised emulsions, ECL- caseinate stabilised emulsions in the presence of lecithin; ECE (ECL), ECA (ECLA), ECCoQ (ECLCoQ): individually encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; ECV (ECLV): co-encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL.

These results point out that the addition of lecithin in the emulsion had a beneficial influence on retention and preservation of lipophilic bioactive ingredients in the cheese matrix during storage. Positive effects of lecithin on the encapsulation of vitamin A and CoQ<sub>10</sub> were recently reported (Eskandar *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). According to

Washington (1996), the lipophilic bioactive ingredients might potentially adsorb to the oil–water interface. In the presence of lecithin these antioxidants can be entrapped between hydrophobic acyl chains or parallel to the lipid monolayer (Afri *et al.*, 2004; Eskandar *et al.*, 2009; Lúcio *et al.*, 2009; Roche *et al.*, 2006). This entrapment of bioactive ingredients among lecithin molecules probably strengthened the interface of fat droplets and therefore increased significantly the retention and stability of components, hence preserving their biological activity. This effect of co-antioxidant has been reported by Ogawa *et al.* (2007).

#### **6.7.2.2. Co-encapsulation of vitamin A, E and CoQ<sub>10</sub> and recovery yield in the cheese matrix**

The RL of vitamins A, E and CoQ<sub>10</sub> incorporated together in cheese matrix is presented in **Figure 6.2** and revealed a good compatibility between incorporated bioactive ingredients. The retention rate of lipophilic ingredients in cheese with ECLV and ECV was not modified, relative to their individual incorporation, but the ability of EC to retain vitamin A was improved up to 90% in presence of vitamin E and CoQ<sub>10</sub>. This RL improvement is equivalent to the amount of retained vitamin A in cheeses with ECLA and ECLV. During storage of cheese, the amount of vitamin A was stable. Vitamin E was regenerated after 3 months while the CoQ<sub>10</sub> concentration was reduced by 9 and 17% in presence or absence of lecithin, respectively. These results suggest that vitamin E was regenerated through a CoQ<sub>10</sub> contribution. A large quantity of oxidized vitamin E (99 and 96% in the presence or absence of lecithin respectively) could have been converted into active vitamin. One similar phenomenon was observed by Polak *et al.* (2011) after the addition of CoQ<sub>10</sub> into pâté batter in the form of ubiquinone. Vitamin E neutralizes and stops the production of reactive oxygen species generated by the oxidation of lipids. During this reaction, tocopherol is converted into a tocopheryl radical. CoQH<sub>2</sub> effectively regenerates vitamin E from  $\alpha$ -tocopheroxyl radicals (E•) and thereby interfering with the propagation step of lipids oxidation (Thomas, Neuzil, & Stocker, 1997). Our results suggest that vitamin E is the first line of defense against lipid peroxidation, via CoQ<sub>10</sub> involvement. Vitamin A appears to act as an antioxidant later, after CoQ<sub>10</sub> and vitamin E. The same order of actions between these lipophilic agents was reported by Ingold *et al.* (1993) on studies for low-density lipoproteins (LDL) oxidation.

### 6.7.3. Antiradical properties of cheese

Figure 6.3 shows the evaluation of the FRS activity of lipophilic bioactive ingredients encapsulated immediately after cheese manufacturing and for 3 months of storage. The antiradical activity of cheese containing ECE, ECA and ECQ are respectively 69, 24 and 34 TE/g of cheese after 3 months of storage. The FRS properties of ingredients encapsulated individually are higher in presence of lecithin, with values of 78, 30 and 40 TE/g of cheese for vitamin E, vitamin A, and CoQ<sub>10</sub> respectively after 3 months of storage. During this period, antiradical activity was relatively stable for all treatments except cheese with ECLE, where an increase of 10 and 20% was observed after 1 and 2 months of storage respectively. Interactions between vitamin E and lecithin can influence the gradual increase of FRS over time. Moreover, this increase could also be associated with significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) of vitamin E, which was noticed after 30 days of storage, which is relevant with FRS results. Cheeses prepared with EC, ECL and controls have low antiradical properties.

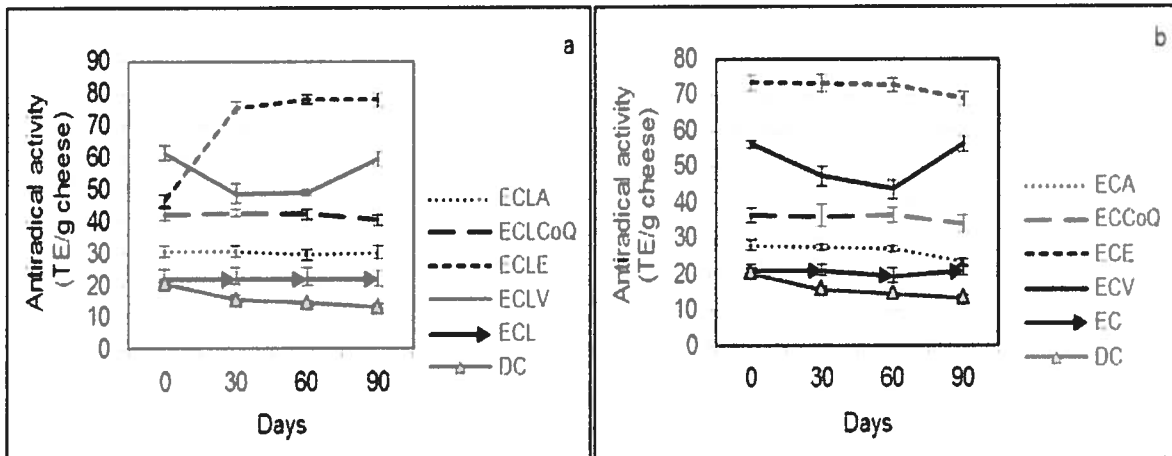


Figure 6.3: Antiradical activity of fortified cheeses after manufacture and during storage compared to control. EC: caseinate stabilized emulsions, ECL: caseinate stabilized emulsions in presence of lecithin; ECE (ECL), ECA (ECLA), ECCoQ (ECLCoQ): Individual encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; ECV (ECLV): co-encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; DC: dairy cream (control).

Immediately after cheese making, the FRS activity of curd containing ECLV and ECV was 61 and 56 TE/g of cheese respectively. Antiradical activity of cheese containing 3 bioactive ingredients together was also higher in presence of lecithin and compared to vitamins incorporated individually, except vitamin E in absence of lecithin relevantly to previous observations. During 3 months of storage at 4°C, the FRS activity of these cheeses was

function of vitamin E content, but it was significantly ( $p \leq 0.05$ ) lower than cheese containing ECLE and ECE (**Figure 6.3**). Regeneration of vitamin E after 3 months of storage fostered the increase of FRS activity, which reached the initial values at day 0.

#### 6.7.4. Lipid oxidation

Lipid peroxidation was assayed by determining the production of TBARS and was expressed as  $\mu\text{g MDA/kg}$  cheese. **Table 6.2** illustrates the concentration of MDA after 3 months of storage at  $4^\circ\text{C}$  in cheeses containing vitamin A, E, CoQ<sub>10</sub> and omega-3. Results showed that in general, MDA content was higher in absence of lecithin in the order of bioactive ingredients incorporated: vitamin A > CoQ<sub>10</sub> > vitamin E. MDA was not detected in cheese fortified with vitamin E at day 0. With and without lecithin, a negligible quantity of MDA was detected after 3 months of storage in all studied cheeses except cheese with ECLE. The encapsulation of these 3 lipophilic ingredients together in cheese matrix provided a better prevention of lipid peroxidation than vitamin A and CoQ<sub>10</sub> incorporated individually, but less than vitamin E. Although the amount of MDA increased significantly ( $p \leq 0.05$ ) in all samples including cheese control during storage, these values were lower than those reported by Hughes *et al.* (2012) in Soft Goat Cheese fortified by fish oil and vitamin E. These non-significant MDA values obtained by Hughes *et al.* (2012) were presumably related to storage conditions of cheese since the cheese was packed under partial vacuum conditions and kept in the fridge. Time and storage conditions of cheese in our study are longer (3 months) and more conducive to oxidation ( $4^\circ\text{C}$  in closed system conditions). Lower values of MDA were observed in fortified cheeses without antioxidant than cheese-control. This phenomenon could be associated to the encapsulation of flaxseed oil in emulsified particles stabilized by the caseinate.

The low level of lipid oxidation noted, despite the high fortification of cheese in omega-3 (ALA), suggests that incorporation of flaxseed oil in the O/W emulsion with addition of vitamin as antioxidant did not accelerate the oxidation mechanism, likely due to the presence of appropriate concentration of antioxidants (vitamins) and the low oxygen availability in the cheese matrix.

**Table 6.2: Concentration of MDA in cheeses fortified with omega-3 fatty acid in the presence or absence of antioxidant during manufacture and storage.**

Type of fortified cheese	MDA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ of cheese) <sup>1, 2</sup>	
	0 day	90 days
DC	0,089 $\pm$ 0,005 <sup>a,b,A</sup>	8,12 $\pm$ 0,01 <sup>i,B</sup>
EC	0,100 $\pm$ 0,005 <sup>d,A</sup>	5,08 $\pm$ 0,01 <sup>i,B</sup>
ECL	0,720 $\pm$ 0,005 <sup>c,A</sup>	4,36 $\pm$ 0,003 <sup>h,B</sup>
ECE	ND <sup>a,A</sup>	0,024 $\pm$ 0,003 <sup>a,b,B</sup>
ECLE	ND <sup>a,A</sup>	ND <sup>aB</sup>
ECA	0,136 $\pm$ 0,009 <sup>b,A</sup>	1,18 $\pm$ 0,003 <sup>g,B</sup>
ECLA	0,088 $\pm$ 0,007 <sup>a,b,A</sup>	0,788 $\pm$ 0,005 <sup>f,B</sup>
ECCoQ	0,128 $\pm$ 0,006 <sup>a,b,A</sup>	0,608 $\pm$ 0,005 <sup>e,B</sup>
ECLCoQ	0,076 $\pm$ 0,005 <sup>a,b,A</sup>	0,136 $\pm$ 0,005 <sup>b,B</sup>
ECV	0,096 $\pm$ 0,005 <sup>a,b,A</sup>	0,424 $\pm$ 0,005 <sup>d,B</sup>
ECV	0,056 $\pm$ 0,005 <sup>a,b,A</sup>	0,276 $\pm$ 0,003 <sup>c,B</sup>

EC - caseinate stabilized emulsions, ECL- caseinate stabilized emulsions in the presence of lecithin; ECE (ECLE), ECA (ECLA), ECCoQ (ECLCoQ): individual encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; ECV (ECLV): co-encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; DC: dairy cream (control). <sup>1</sup> Means followed by a different lowercase letter in the same column are significantly different ( $P \leq 0.05$ ). <sup>2</sup> Means followed by a different uppercase letter in the same row column are significantly different ( $P \leq 0.05$ ). <sup>3</sup>ND: non detectable.

### 6.7.5. Analysis of the chemical stability of cheese by ATR-FTIR

The evaluation of the chemical stability of cheeses by ATR-FTIR requires the identification of typical vibration bands related to chemical functions of lipids and proteins which are more susceptible to oxidation. **Figure 6.4** shows the ATR-FTIR spectra of cheese containing flaxseed oil compared to control cheese made with dairy cream in the region 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ . The global description of these bands are summarized in **Table 6.3** and were determined by referring to previous works (Che Man *et al.*, 2005; Guillén *et al.*, 2008; Lazzari *et al.*, 1999; Manjunath *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2006; Whittinghill *et al.*, 1999).

The chemical stability of each cheese during storage was evaluated to verify if the low level of detected MDA had detrimental effects on their chemical composition. MDA, a secondary product of lipid peroxidation, reacts with amino groups of proteins ( $\epsilon$ -amino groups of lysine residues) to form imines that allow the formation of carbonyl groups at the level of the amino acid chains (Burcham *et al.*, 1996; Genot *et al.*, 2003). This reaction involves an increase the carbonyl index during ATR-FTIR analysis.



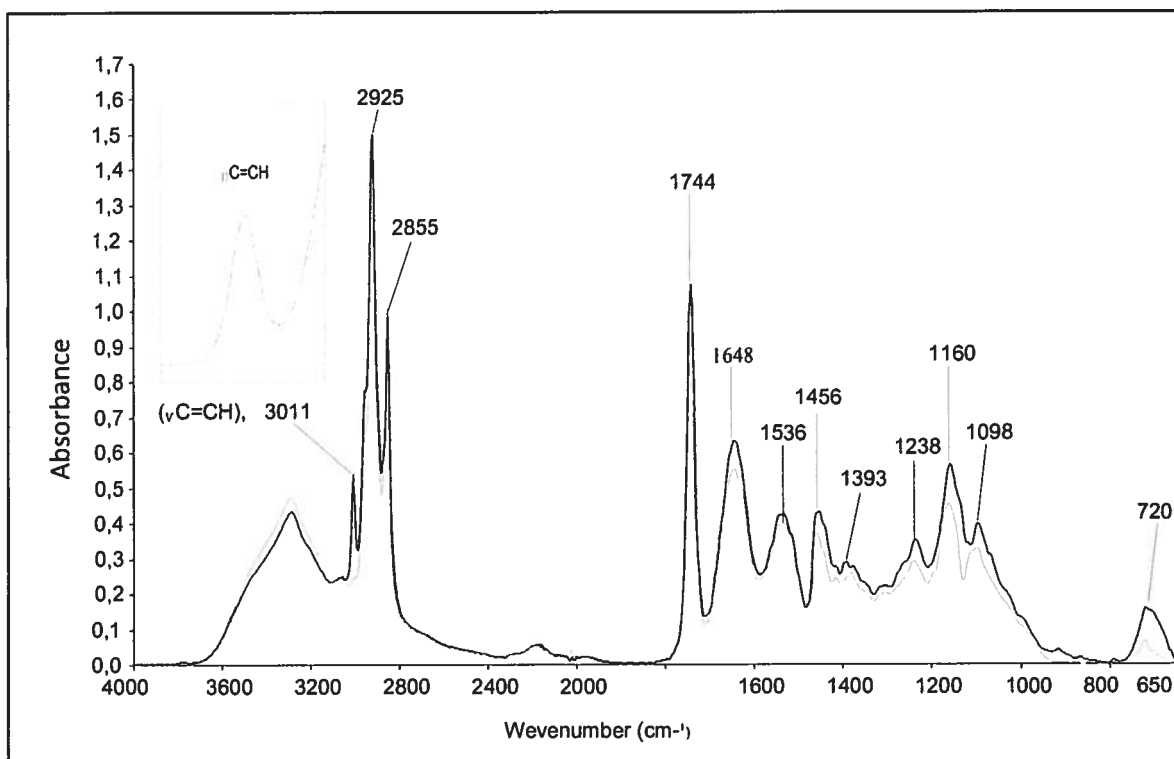


Figure 6.4: FTIR spectrum of enriched cheese with omega-3 compared to control.

— Dairy cream, — Functional cream.

Table 6.3: Assessment of the typical vibrational bands to functional groups of cheese according to FTIR analysis.

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Vibration	Functional group
3040-2800	$\nu$ C=CH and $\nu$ CH	Region of proteins and lipids (saturated and unsaturated alkyl groups)
3010	$\nu$ C=CH	cis-double bond (unsaturated fatty acids)
2925	$\nu$ CH <sub>2</sub> asymmetric	Methylene groups (proteins, lipids)
2855	$\nu$ CH <sub>2</sub> symmetric	Methylene groups (proteins, lipids)
1744	$\nu$ C=O	Carbonyl group (fatty acids, proteins)
1643	Amide I	Amide I (proteins), CoQ <sub>10</sub>
1536	Amide II	Amide II (proteins)
1456-1393	$\delta$ C-H	Methyl and methylene groups (proteins, lipids)
1239	$\nu$ C-O, $\nu$ P-O	C-O group, asymmetric phosphate (lipids, lecithin)
1160	$\delta$ C-O	C-O group (esters)
1098	$\delta$ OH	OH group (cheese components)
721	$\nu$ CH <sub>2</sub>	Methylene groups (fatty acids)

$\nu$  - stretching vibrations,  $\delta$  - bending vibrations.

The unsaturation degree of lipids of studied cheeses is represented by a peak at  $3010\text{ cm}^{-1}$ , due to the stretching vibration of  $\text{CH}=\text{"cis"}$  group and a peak with a similar behavior at  $721\text{ cm}^{-1}$  due to the vibration deformation of the  $\text{CH}_2$  group which is related to the chain length and the degree of lipids oxidation. Peaks at  $3010\text{ cm}^{-1}$  showed a significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between fortified cheeses and cheese control, with 72 and 2 mAU respectively. Hence, the degree of lipid unsaturation in fortified cheese is 36 times higher than the control. These data confirm that the cheese prepared with a functional cream contained more polyunsaturated fatty acids. A progressive decrease of these bands were associated to a significant decrease in unsaturation index of control (cheese prepared with dairy cream) and of fortified cheeses with ECL or EC. These decreases were indicated by the disappearance of the double bonds in the *cis* conformation and the oxidation level of these cheeses from day zero to day 90 (**Figure 6.5, a**). The carbonyl index is related to the absorption band  $\nu\text{C}=\text{O}$  at  $1744\text{ cm}^{-1}$ . According to previous works, the  $\text{C}=\text{O}$  groups at  $1744\text{ cm}^{-1}$  and  $\text{C}-\text{O}$  at  $1160\text{ cm}^{-1}$  have a similar behavior. The intensity of absorbance of those two groups increases with the intensity of lipid oxidation (Lazzari *et al.*, 1999; Masmoudi *et al.*, 2005). The carbonyl index of control and cheeses with ECL or EWL decreased significantly ( $p \leq 0.05$ ) with 62, 45 and 39% after 2 months and then increased significantly ( $p \leq 0.05$ ) after 3 months with 50, 32 and 19% respectively as compared to 60 days (**Figure 6.5, b**). These results indicate that lipids contained in control and cheeses with ECL or EWL were affected significantly ( $p \leq 0.05$ ) by oxidation. However, although cheese with ECL or EC are richer in polyunsaturated fatty acids than control cheese, the lipid oxidation level was found to be lower than in control cheese. This observation is somewhat expected due to the fact that flaxseed oil was incorporated in the form of simple emulsion stabilized by calcium caseinate and lecithin which possess antioxidant properties (Judde *et al.*, 2003; Ramadan, 2012; Semo *et al.*, 2007).

Analysis of ATR-FTIR spectra of all cheeses (containing vitamins A, E and  $\text{CoQ}_{10}$ ) showed that the unsaturation and carbonyl index were not modified significantly during 3 months of storage (**Figure 6.5, c, d**). Therefore, it can be assessed that the incorporation of vitamin E, A and  $\text{CoQ}_{10}$  in cheeses increased significantly the resistance of cheese against oxidation. The low level of detected MDA had no deleterious effect on cheese composition.

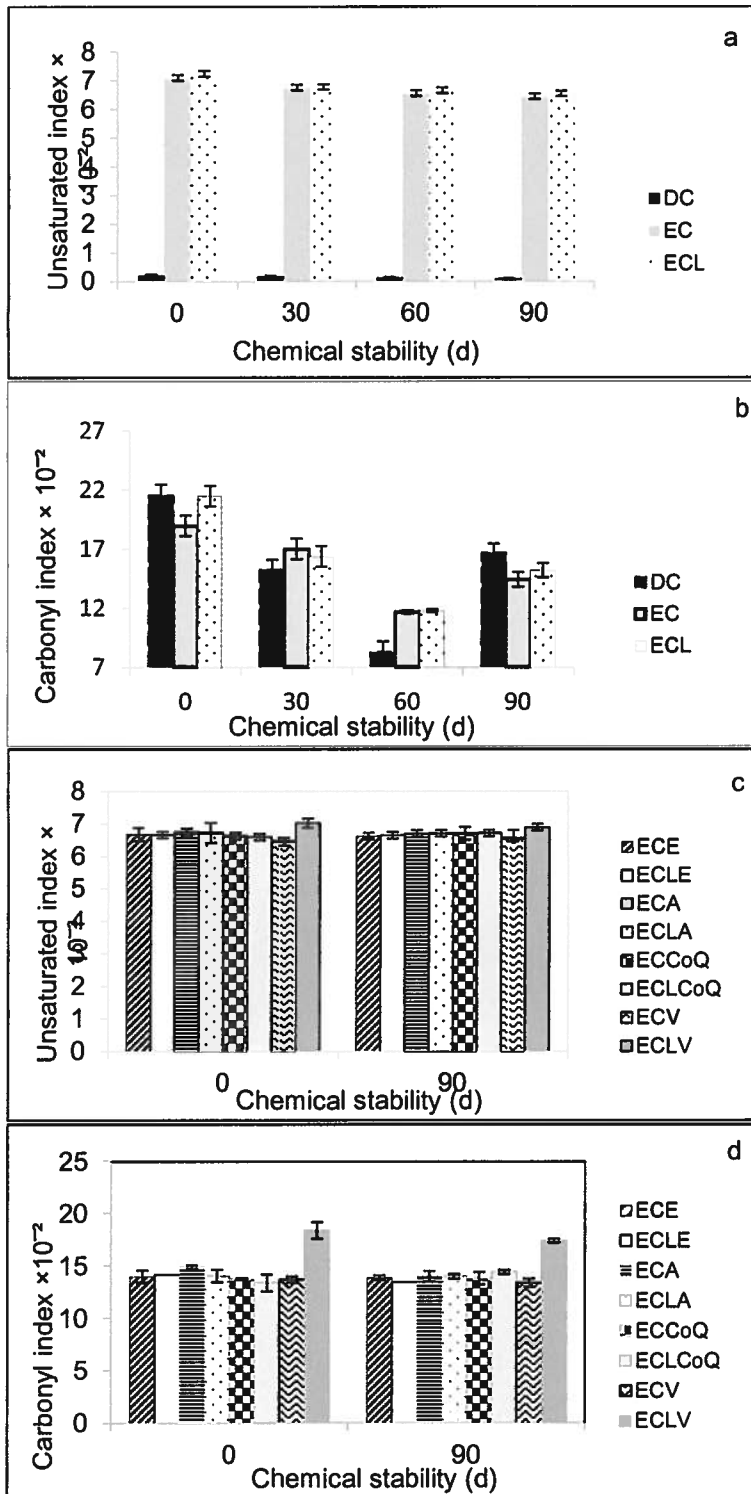


Figure 6.5: Chemical stability of fortified cheeses during manufacture and storage compared to control: a) unsaturated index (related to vC=CH); b) carbonyl index (related to vC=O). EC: caseinate stabilized emulsions, ECL: caseinate stabilized emulsions in presence of lecithin; ECE (ECLE), ECA (ECLA), ECCoQ (ECLCoQ): individual encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; ECV (ECLV): co-encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; DC: dairy cream (control), d: days

These results indicate that encapsulation of flaxseed oil in the presence of vitamin E, vitamin A and CoQ<sub>10</sub>, individually or together, preserved the stability of cheese chemical composition for 3 months of storage.

#### 6.7.6. Effect of fortification on cheese composition and cheese yield

The lipid, protein contents and yields of fortified cheeses versus control cheese prepared with dairy cream are shown in **Table 6.4**. Cheeses fortified with omega-3 fatty acid (ALA) and different antioxidants had significant ( $p \leq 0.05$ ) higher lipid retention (90-93%) than cheese control (89%). However, no significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed between the cheese prepared with ECL or EWL and control. Results suggest that fat droplets are more retained in cheese matrix in presence of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub>. Proteins retention rate and corrected yield in fortified model cheeses were found to be greater or equal (80-84% of proteins and CY 14-16%) to those in the cheese control (80% of proteins and CY 14%).

**Table 6.4: Retention of lipids, proteins (a) and corrected yield (CY) (b) of fortified cheeses with developed emulsions (ECL and EC) compared to control.**

Fortified cheeses	Retention rate of lipids (%)	Retention rate of proteins (%)	Corrected yield (%)
DC (control)	89.30 <sup>a,b</sup>	80.30 <sup>a</sup>	13.48 <sup>a</sup>
EC	89.10 <sup>a</sup>	80.50 <sup>a</sup>	13.53 <sup>a,b</sup>
ECL	89.17 <sup>a</sup>	80.18 <sup>a</sup>	14.31 <sup>b</sup>
ECE	90.87 <sup>c,d</sup>	82.83 <sup>c,d</sup>	15.77 <sup>c,d,e</sup>
ECLE	92.80 <sup>f</sup>	80.93 <sup>b</sup>	16.34 <sup>e</sup>
ECA	91.00 <sup>d,e</sup>	81.90 <sup>b,c</sup>	15.01 <sup>c,d</sup>
ECLA	91.13 <sup>d,e</sup>	83.80 <sup>d,e</sup>	15.78 <sup>c,d,e</sup>
ECCoQ	92.13 <sup>e,f</sup>	80.23 <sup>a</sup>	13.61 <sup>a,b</sup>
ECLCoQ	91.20 <sup>d,e</sup>	80.37 <sup>a</sup>	13.49 <sup>a</sup>
ECV	89.96 <sup>a,b,c</sup>	82.53 <sup>c,d</sup>	14.78 <sup>b,c,d</sup>
ECLV	90.43 <sup>b,c,d</sup>	80.89 <sup>b</sup>	14.77 <sup>b,c,d</sup>

EC: caseinate stabilized emulsions, ECL: caseinate stabilized emulsions in presence of lecithin; ECE (ECLE), ECA (ECLA), ECCoQ (ECLCoQ): individual encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; ECV (ECLV): co-encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> in cheese using EC or ECL; DC: dairy cream (control).

<sup>1</sup> Means followed by a different lowercase letter in the same column are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Better protein retention and better CY was recorded in cheeses containing vitamins A and E. Non-significant differences were observed ( $P > 0.05$ ) between cheeses fortified with CoQ<sub>10</sub>, with EC and control. According to reported data, vitamins E and A might potentially adsorb to the oil–water interface (Afri *et al.*, 2004; Eskandar *et al.*, 2009; Lúcio *et al.*, 2009). The nature and the composition of the fat interface influence the propriety and the microstructure of gel (Dickinson, 2012; Michalski *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2010). Consequently, these vitamins may have an impact on the texture of curd and on the retention of lipids and proteins. Retention of a significant rate of lipids and proteins is a good indicator of the quality of cheese curd. According to Hurtaud *et al.* (1995), a well-structured curd loses less fat and proteins during cheese making. The incorporation of vitamins A, E and CoQ<sub>10</sub> in emulsified particles form had a positive impact on the composition and the CY of cheese.

## 6.8. Conclusion

Cheddar cheese has been successfully enriched with omega-3 fatty acid, vitamins A, E and CoQ<sub>10</sub> by the immobilization process of lipophilic bioactive agents in emulsified particles. Although developed emulsions with and without lecithin led to very satisfactory results, the emulsions containing lecithin were found to be more effective. They allowed increasing retention of lipophilic agents up to 90-93% in the curd, improvement of their stability and biological activity during manufacture and storage. The co-encapsulation of vitamins E, A and CoQ<sub>10</sub> into a cheese matrix showed good compatibility of the mixture of these bioactive ingredients. Vitamin E was regenerated after 3 months of storage due to possible antioxidant capacity of CoQ<sub>10</sub>. Also, the RL and preservation of vitamin A was improved up to 90% in cheese with ECV.

The compatibility and complementary action between vitamins and flaxseed oil inhibited the lipid peroxidation for 3 months of storage and maintained the chemical stability of fortified cheeses with lipophilic bioactive agents. Low levels of MDA, despite a high fortification of cheese in omega-3, did not affect the chemical composition of cheese during storage. The effect of fortification with lipophilic components on the composition and cheese yield was quite positive. The incorporation of the lipophilic ingredients in the cheese matrix in form of emulsified particles allowed increasing i) their retention in the curd

(RL), ii) the stability and the functionality of bioactive components during storage, iii) the resistance of lipids to peroxidation and iv) the yield of fortified cheese.

## **6.9. Acknowledgments**

This research was supported by a grant from the Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies, the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Novalait, Inc. as well as Agriculture and Agri-Food Canada. Iulia Stratulat was also the recipient of an Excellence Grant from the Fondation Armand-Frappier.

## RÉFÉRENCES

- Abd El-Salam M & Mohamed D (2009) The protective effect of processed cheese against hyperlipidemia in rats. *Dairy Sc. Technol.* 89(5):437-447.
- Acosta E (2009) Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sc.* 14(1):3-15.
- Afri M, Ehrenberg B, Talmon Y, Schmidt J, Cohen Y & Frimer AA (2004) Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part III: Locating Vitamin E, ubiquinol and ubiquinone and their derivatives in the lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids.* 131(1):107-121.
- Aider M & Halleux D (2009) Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications LWT. *Food Sci. Technol.* 42(3):679-685.
- Albano C, Muralikrishnan D & Ebadi M (2002) Distribution of Coenzyme Q homologues in brain. *Neurochem Res.* 27:359-368.
- Alexander M, Acero Lopez A, Fang Y & Corredig M (2012) Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *Food Sci. Technol.* 47(2):427-436.
- Amárita F, Carmen Martínez-Cuesta M, Taborda G, Soto-Yárritu PL, Requena T & Peláez C (2002) Formation of methional by *Lactococcus lactis* IFPL730 under cheese model conditions. *Eur. Food Res. Technol* 214(1):58-62.
- Amiot J, Fournier S, Leboeuf B, Paquin P & Simpson R (2002) Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait, transformation du lait. Montréal: Presses Internationales Polytechnique.* 1:73.
- Andrén A (2002) Rennets and coagulants. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Roginski H (Édit.) Academic Press, London. p 281-286.
- Anihouvi PP, Danthine S, Karamoko G & Blecker C (1912) Les crèmes végétales: une alternative aux crèmes laitières (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 16(3):344-359.
- Arsić I, Vidovic S & Vuleta G (1999) Influence of liposomes on the stability of vitamin A incorporated in polyacrylate hydrogel. *Int. J. Cos. Sci.* 21(4):219-225.
- Balakrishnan P, Lee BJ, Oh DH, Kim JO, Hong MJ, Jee JP, Kim JA, Yoo BK, Woo JS, Yong CS & Choi HG (2009) Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a

- novel solid Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72(3):539-545.
- Banks JM, Law AJR, Leaver J & Home DS (1995) Maturation profiles of cheddar-type cheese produced from high heat treatment milk to incorporate whey protein. *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*, (Advances in Experimental Medicine and Biology, Malin EL & Tunick MH (Édit.) Plenum Press Div Plenum Publishing Corp, New York Vol 367. p 221-236.
- Banville C, Vuilleumard JC & Lacroix C (2000) Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. *Int. Dairy J.* 10(5-6):375-382.
- Benfeldt C, Sørensen J, Ellegård KH & Petersen TE (1997) Heat treatment of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 7(11):723-731.
- Benfeldt C & Sorensen J (2001) Heat treatment of cheese milk: Effect on proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11(4-7):567-574.
- Bentinger M, Tekle M & Dallner G (2010) Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 396(1):74-79.
- Bergere J, Sys T, Vassal L, Pitel M & Cathelin M (1978) Bactéries lactiques susceptibles d'inhiber la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* en culture et dans le fromage. *Lait.* 58(575-576):215-233.
- Bhagavan HN & Chopra RK (2006) Coenzyme Q<sub>10</sub>: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res.* 40(5):445-453.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG & Gluud C (2008) Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Database Syst Rev.* 16(3):CD004183.
- Bloedon LT & Szapary PO (2004) Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutr. Rev.* 62(1):18-27.
- Blomhoff R & Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* 66(7):606-630.
- Boothby LA & Doering PL (2005) Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann. Pharmacother.* 39(12):2073-2080.
- Boutin C, Giroux HJ, Paquin P & Britten M (2007) Characterization and acid-induced gelation of butter oil emulsions produced from heated whey protein dispersions. *Int. Dairy J.* 17(6):696-703.



- Brenna JT, Salem N, Sinclair AJ, Cunnane SC & null (2009) alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostag. Leukot. Essent. Fatty Acids*. 80(2-3):85-91.
- Brochette P (1999) Émulsification: Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*. 2:J2150.
- Burcham P & Kuhan T (1996) Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malonaldehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 220:996-1001.
- Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM & Wootton SA (2003) Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [<sup>13</sup>C]α-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards β-oxidation in older men. *Br. J. Nutr.* 90(2):311-321.
- Burton GW & Ingold KU (1981) Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 103(21):6472-6477.
- Burton GW & Ingold KU (1986) Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 19(7):194-201.
- Calvo MM & Balcones E (1998) Influence of heat treatment on rennet clotting properties of mixtures of cow's, ewe's, and goat's milk and on cheese Yield. *J. Agric. Food Chem.* 46(8):2957-2962.
- Cayot P & Lorient D (1998) Les propriétés d'hydratation des protéines. *Structures et technofonctions des protéines du lait* Tec & Doc, Paris. p 209-227.
- Charalambous G & Doxastakis G (1989) *Food emulsifiers: chemistry, technology, functional properties and applications*. Elsevier Amsterdam. 549 p
- Che Man YB, Ammawath W & Mirghani MES (2005) Determining α-tocopherol in refined bleached and deodorized palm olein by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 90(1-2):323-327.
- Chen CC & Wagner G (2004) Vitamin E nanoparticle for beverage applications. *Chemical Engineering Research and Design* 82(11):1432-1437.
- Chen J, Shi J, MacNaughton L, Kakuda Y, Xue SJ, Ma Y, Zhang M & Jiang Y (2009) The scavenging capacity of combinations of lycopene, β-carotene, vitamin e, and vitamin c on the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *J. Food Biochem.* 33(2):232-245.

- Chen JS & Dickinson E (1995) Surface shear viscosity and protein surfactant interactions in mixed protein films adsorbed at the oil-water interface. *Food Hydrocolloids*. 9(1):35-42.
- Chen ZY & Nawar WW (1991) Prooxidative and antioxidative effects of phospholipids on milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68(12):938-940.
- Cillard J & Cillard P (2006) Lipid peroxidation biomarkers. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol. Corps Gras Li* 13(1):24-29.
- Clarke SD, Gasperikova D, Nelson C, Lapillonne A & Heird WC (2002) Fatty acid regulation of gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 967(1):283-298.
- Cohn JS, Kamili A, Wat E, Chung RWS & Tandy S (2010) Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients*. 2(2):116-127.
- Comas D, Wagner J & Tomas M (2006) Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein-lecithin interaction. *Food Hydrocolloids*. 20(7):990-996.
- Couedelo L, Boue-Vaysse C, Fonseca L, Montesinos E, Djoukitch S, Combe N & Cansell M (2011) Lymphatic absorption of alpha-linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br. J. Nutr.* 105(7):1026-1035.
- Coupland JN & McClements DJ (1996) Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci. Technol.* 7(3):83-91.
- Courraze G & Grossiord JL (2000) *Initiation à la rhéologie (3 Éd.)*. Lavoisier, Tec et Doc, Paris. 300 p
- Cunnane SC, Ganguli S, Menard C, Liede AC, Hamadeh MJ, Chen ZY, Wolever TMS & Jenkins DJA (1993) High  $\alpha$ -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): Some nutritional properties in humans. *Br. J. Nutr.* 69(2):443-453.
- Dalgleish D (1982) The enzymatic coagulation of milk. *Developments in dairy chemistry*. 1:157-187.
- Dalgleish D, Tosh S & West S (1996) Beyond homogenization: the formation of very small emulsion droplets during the processing of milk by a microfluidizer. *Ned. melk Zui.* 50(2):135-148.
- Daly CM, Moloney AP & Monahan FJ (2007) Lipid and colour stability of beef from grazing heifers supplemented with sunflower oil alone or with fish oil. *Meat Sci.* 77(4):634-642.
- De Kruijff CG (1997) Skim milk acidification. *J. Colloid Interface Sci* 185(1):19-25.

- De Luca M, Rocha-Filho P, Grossiord J, Rabaron A, Vaution C & Seiller M (1991) Les emulsions multiples. *Int J Cosmet Sci.* 13(1):1-21.
- Devaraj S & Jialal I (1996) Oxidized low density lipoprotein and atherosclerosis. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 26(3):178-184.
- Devasagayam TPA, Bloor KK & Ramasarma T (2003) Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 40(5):300-308.
- Di Mattia CD, Sacchetti G, Mastrocola D & Pittia P (2009) Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Res. Int.* 42(8):1163-1170.
- Dickinson E & Stainsby G (1982) *Colloids in food.* Applied Science Publishers, UK. 533 p
- Dickinson E, Euston S & Woskett C (1990) Competitive adsorption of food macromolecules and surfactants at the oil-water interface. *Prog.Coll. Pol.Sci.* 82:65-75.
- Dickinson E & Hong ST (1995) Influence of water-soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein-stabilized emulsion gels. *J. Agric. Food Chem.* 43(10):2560-2566.
- Dickinson E & Yamamoto Y (1996) Viscoelastic properties of heat-set whey protein-stabilized emulsion gels with added lecithin. *J. Food. Sci.* 61(4):811-816.
- Dickinson E, Golding M & Povey MJW (1997) Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. *J. Colloid Interface Sci.* 185(2):515-529.
- Dickinson E (1997a) Properties of emulsions stabilized with milk proteins: Overview of some recent developments. *J. Dairy Sci.* 80(10):2607-2619.
- Dickinson E (1999) Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *Int. Dairy J.* 9(3-6):305-312.
- Dickinson E, Ritzoulis C & Povey MJW (1999a) Stability of emulsions containing both sodium caseinate and Tween 20. *J. Colloid Interface Sc.* 212(2):466-473.
- Dickinson E, Ritzoulis C, Yamamoto Y & Logan H (1999b) Ostwald ripening of protein-stabilized emulsions: Effect of transglutaminase crosslinking. *Colloids Surface B.* 12(3-6):139-146.
- Dickinson E (2001) Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Surface B.* 20(3):197-210.
- Dickinson E (2003) Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids.* 17(1):25-39.

- Dickinson E, Radford SJ & Golding M (2003a) Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*. 17(2):211-220.
- Dickinson E (2006) Structure formation in casein-based gels, foams, and emulsions. *Colloids Surface A*. 288(1-3):3-11.
- Dickinson E (2012) Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*. 28(1):224-241.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA & Collins AR (1996) Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res*. 56(6):1291-1295.
- Dwivedi C, Natarajan K & Matthees DP (2005) Chemopreventive effects of dietary flaxseed oil on colon tumor development. *Nutrition and Cancer*. 51(1):52-58.
- Eaton SB & Konner M (1985) Paleolithic nutrition. *The New England Journal of Medicine* 312(5):283-289.
- Eliot C & Dickinson E (2003) Thermoreversible gelation of caseinate-stabilized emulsions at around body temperature. *Int. Dairy J*. 13(8):679-684.
- Elsayed NM & Bendich A (2001) Dietary antioxidants: Potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutr. Res*. 21(3):551-567.
- Ely JTA & Krone CA (2000) A brief update on ubiquinone (Coenzyme Q10). *J. Orthomol. Med*. 15(2):63-68.
- Emken EA, Adlof RO & Gulley RM (1994) Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *BBA - Lipids and Lipid Metabolism*. 1213(3):277-288.
- Emmons DB, Kalab M, Larmond E & Lowrie RJ (1980) Milk gel structure. Texture and microstructure in cheddar cheese made from whole milk and from homogenized low-fat milk. *J. Texture Stud*. 11(1):15-34.
- Eskandar NG, Simovic S & Prestidge CA (2009) Chemical stability and phase distribution of all-trans-retinol in nanoparticle-coated emulsions. *Int. J. Pharm*. 376(1-2):186-194.
- Etminan M, Gill SS & Samii A (2005) Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet Neurol*. 4(6):362-365.
- Evans HM & Bishop KS (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*. 56(1458):650-651.

- Fabra MJ, Talens P & Chiralt A (2010) Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions. *Food Hydrocolloids*. 24(4):384-391.
- Fachin L & Viotto W (2005) Effect of pH and heat treatment of cheese whey on solubility and emulsifying properties of whey protein concentrate produced by ultrafiltration. *Int. Dairy J.* 15(4):325-332.
- Fauconneau J (1989) Aspects technologiques du lait de bovins. Conservation. Transformation. *Options Méditerranéennes*. (6 ):181-189.
- Favrelière S, Perault MC, Huguet F, De Javel D, Bertrand N, Piriou A & Durand G (2003) DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiol. Aging*. 24(2):233-243.
- Feher J, Kovacs B, Kovacs I, Schvöller M, Papale A & Balacco Gabrieli C (2005) Improvement of visual functions and fundus alterations in early age-related macular degeneration treated with a combination of acetyl-L-carnitine, n-3 fatty acids, and coenzyme Q<sub>10</sub>. *Ophthalmol.* 219(3):154-166.
- Folkers K, Shizukuishi S, Takemura K, Drzewoski J, Richardson P, Ellis J & Kuzell WC (1982) Increase in levels of IgG in serum of patients treated with coenzyme-Q<sub>10</sub>. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 38(2):335-338.
- Fox PF & Stepaniak L (1993) Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.* 3(4-6):509-530.
- Fox PF, Wallace JM, Morgan S, Lynch CM, Niland EJ & Tobin J (1996) Acceleration of cheese ripening. *Int. J. Gen. Mol. Microb.* 70(2-4):271-297.
- Fox PF (2001) Milk proteins as food ingredients. *Int. J. Dairy Tec.* 54(2):41-55.
- Fox PF & Brodkorb A (2008) The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *Int. Dairy J.* 18(7):677-684.
- Franco D, González L, Bispo E, Latorre A, Moreno T, Sineiro J, Sánchez M & Núñez MJ (2012) Effects of calf diet, antioxidants, packaging type and storage time on beef steak storage. *Meat Sci.* 90(4):871-880.
- Frankel EN, Huang SW, Kanner J & Bruce German J (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42(5):1054-1059.
- Frankel EN (1998) *Lipid Oxidation*. Oily Press Ltd, Dundee, Scotland, 1<sup>nd</sup> ed. 303 p
- Frankel EN & Meyer AS (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* . 80(13):1925-1941.

- Frankel EN (2001) Interfacial Lipid Oxidation and Antioxidation. *J. Oleo Sc* 50(5):387-391.
- Fustier P, Taherian A, Ramaswamy HS, Smith J & Charter E (2010) *Emulsion delivery systems for functional foods*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 528 p
- Galazka VB, Dickinson E & Ledward DA (2000) Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sc.* 5(3-4):182-187.
- Garti N & Bisperink C (1998) Double emulsions: Progress and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 3(6):657-667.
- Gaygadzhiev Z, Corredig M & Alexander M (2011) Rennet coagulation properties of milk in the presence of oil droplets stabilised by a combination of sodium caseinate and whey protein isolate. 91(6):719-737.
- Genot C (2010) Metabolic impact of lipid structure and oxidation in foods. *Innovation Agronomique.* 10:43-67.
- Genot C, Meynier A, Riaublanc A & Chobert J (Édit) (2003) *Protein alterations due to lipid oxidation in multiphase systems*. AOACS, Blaubeuren. 265-292 p.
- Goff HD (1997) Colloidal aspects of ice cream—A review. *Int. Dairy J.* 7(6-7):363-373.
- Goh KKT, Ye AQ & Dale N (2006) Characterisation of ice cream containing flaxseed oil. *Int. J. Food Sc. Technol.* 41(8):946-953.
- Grappin R & Beuviel E (1997) Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *Int. Dairy J.* 7(12):751-761.
- Green ML, Marshall RJ & Glover FA (1983) Influence of homogenization of concentrated milks on the structure and properties of rennet curds. *J. Dairy Res.* 50(03):341-348.
- Guilland JC (2011) Les interactions entre les vitamines A, D, E et K: synergie et/ou compétition. *Ol. Corps Gras Li.* 18(2):59-67.
- Guillén MD, Carton I, Goicoechea E & Uriarte PS (2008) Characterization of cod liver oil by spectroscopic techniques. New approaches for the determination of compositional parameters, acyl groups, and cholesterol from 1H nuclear magnetic resonance and fourier transform infrared spectral data. *J. Agric. Food Chem.* 56(19):9072-9079.
- Gundermann K (1993) *The "essential" phospholipids as a membrane therapeutic*. Polish Section of European Society of Biochemical Pharmacology, Medical Academy, Szczecin. 168 p
- Gundersen TE & Blomhoff R (2001) Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J. Chromatogr A.* 935(1-2):13-43.

- Hacquebard M, Vandenbranden M, Malaisse WJ, Ruyschaert JM, Deckelbaum RJ & Carpentier YA (2008) Vitamin E transfer from lipid emulsions to plasma lipoproteins: Mediation by multiple mechanisms. *Lipids*. 43(7):663-671.
- Hadj A, Esmore D, Rowland M, Pepe S, Schneider L, Lewin J & Rosenfeldt F (2006) Pre-operative Preparation for Cardiac Surgery Utilising a Combination of Metabolic, Physical and Mental Therapy. *Heart. Lung. Circ.* 15(3):172-181.
- Halliwell B (1991) The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species. *Free radicals and food additives*, Aruoma OI & Halliwell B (Édit.) Taylor and Francis, London. p 41-45.
- Hartmann P, Szabó A, Erős G, Gurabi D, Horváth G, Németh I, Ghyczy M & Boros M (2009) Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine in neutrophil leukocyte-dependent acute arthritis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 622(1):58-64.
- Hemar Y & Horne DS (1999) A diffusing wave spectroscopy study of the kinetics of Ostwald ripening in protein-stabilised oil/water emulsions. *Colloids Surface B*. 12(3–6):239-246.
- Henry JVL, Fryer PJ, Frith WJ & Norton IT (2010) The influence of phospholipids and food proteins on the size and stability of model sub-micron emulsions. *Food Hydrocolloids*. 24(1):66-71.
- Herbert S, Mouhous Riou N, Devaux MF, Riaublanc A, Bouchet B, Gallant DJ & Dufour É (2000) Monitoring the identity and the structure of soft cheeses by fluorescence spectroscopy. *Lait*. 80(6):621-634.
- Herchi W, Bouali I, Bahashwan S, Rochut S, Boukhchin S, Kallel H & Pepe C (2012) Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. *Plant Physiol. Biochem.* 54:1-5.
- Hershey AD, Powers SW, Vockell ALB, LeCates SL, Ellinor PL, Segers A, Burdine D, Manning P & Kabbouche MA (2007) Coenzyme Q10 deficiency and response to supplementation in pediatric and adolescent migraine. *Headache*. 47(1):73-80.
- Hodgson JM, Watts GF, Playford DA, Burke V & Croft KD (2002) Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: A controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *Eur. J.Clin. Nutr.* 56(11):1137-1142.
- Home D & Banks J (2004) Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 1:47-70.

- Hougaard AB, Ardö Y & Ipsen RH (2010) Cheese made from instant infusion pasteurized milk: Rennet coagulation, cheese composition, texture and ripening. *Int. Dairy J.* 20(7):449-458.
- Hsieh RJ & Kinsella JE (1989) Oxidation of polyunsaturated fatty acids. mechanisms, products, and Inhibition with emphasis on fish. *Adv. Food Nutr. Res.* 33:233-341.
- Hu M, McClements DJ & Decker EA (2003) Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 51(6):1696-1700.
- Hughes BH, Brian Perkins L, Calder BL & Skonberg DI (2012) Fish oil fortification of soft goat cheese. *J. Food Sci.* 77(2):S128-S133.
- Hung LC, Basri M, Tejo BA, Ismail R, Nang HLL, Abu Hassan H & May CY (2011) An improved method for the preparations of nanostructured lipid carriers containing heat-sensitive bioactives. *Colloids Surface B.* 87(1):180-186.
- Huppertz T, Hinz K, Zobrist MR, Uniacke T, Kelly AL & Fox PF (2005) Effects of high pressure treatment on the rennet coagulation and cheese-making properties of heated milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6(3):279-285.
- Hurtaud C, Rulquin H, Delaite M & Vérité R (1995) Prediction of cheese yielding efficiency of individual milk of dairy cows. Correlation with coagulation parameters and laboratory curd yield. *Ann. Zootech.* 44:385-398.
- Hurtaud C, Buchin S, Martin B, Verdier-Metz I, Peyraud J & Noël Y (2001) La qualité des laits et ses conséquences sur la qualité des produits de transformation: quelques techniques de mesure dans les essais zootechniques. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants.* 8:35-42.
- Husain SR, Terao J & Matsushita S (1986) Effect of browning reaction products of phospholipids on autoxidation of methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63(11):1457-1460.
- Hyslop D (2003) Enzymatic coagulation of milk. *Advanced dairy chemistry.* 1(Part B):839-878.
- Ingold KU, Bowry VW, Stocker R & Walling C (1993) Autoxidation of lipids and antioxidation by  $\alpha$ -tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: Unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(1):45-49.



- Iwata M (2009) Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin. Immun.* 21(1):8-13.
- Jafari S, He Y & Bhandari B (2006) Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *Int. J. Food Prop.* 9(3):475-485.
- Jafari S, He Y & Bhandari B (2007) Optimization of nano-emulsions production by microfluidization *Eur. Food Res. Technol.* 225(5-6):733 - 741.
- Jenkins PJ, Portmann BP, Eddleston ALWF & Williams R (1982) Use of polyunsaturated phosphatidyl choline in HBsAg negative chronic active hepatitis: Results of prospective double-blind controlled trial. *Liver.* 2(2):77-81.
- Jewell NE & Nawar W (1980) Thermal oxidation of phospholipids 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 57(12):398-402.
- Jimenez M, García H & Beristain C (2004) Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *Eur. Food Res. Technol.* 219:588-592.
- Johanknecht V (2002) *The effect of the antioxidant, Coenzyme Q, on Coco-2 colon cells treated with iron to reduce lipid peroxidation.* M.S. (University of Wisconsin, Stout US). 41 p
- Johnston KA, Luckman MS, Lilley HG & Smale BM (1998) Effect of various cutting and stirring conditions on curd particle size and losses of fat to the whey during cheddar cheese manufacture in ost vats. *Int. Dairy J.* 8(4):281-288.
- Joshi A, Paratkar SG & Thorat BN (2006) Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108(4):363-373.
- Judde A, Villeneuve P, Rossignol-Castera A & Le Guillou A (2003) Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80(12):1209-1215.
- Kanazawa A, Sawa T, Akaik T & Maeda H (2000) Formation of abasic sites in DNA by t-butyl peroxy radicals: Implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. *Cancer Lett.* 156(1):51-55.
- Karpińska J, Mikołuc B, Motkowski R & Piotrowska-Jastrzebska J (2006) HPLC method for simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol and coenzyme Q 10 in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42(2):232-236.
- Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Rodriguez JS, Pelzer KD, Sponenberg PD & Thatcher CD (2010) Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8(1):86.

- Kentaro M, Wataru T, Inoue T & Matsumura Y (2010) Effects of bacteriostatic emulsifiers on stability of milk-based emulsions *J. Food Eng.* 96:185-191.
- Kew S, Banerjee T, Minihane AM, Finnegan YE, Muggli R, Albers R, Williams CM & Calder PC (2003) Lack of effect of foods enriched with plant-or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am. J. Clin. Nutr.* 77(5):1287-1295.
- King M, Boyd L & Sheldon B (1992) Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69(6):545-551.
- Kosikowski F & Mistry V (1997) Process cheese and related products. *Cheese and Fermented Milk Foods.* 1:328-352.
- Koumis T, Nathan J, Rosenberg JM & Cicero LA (2004) Strategies for the prevention and treatment of statin-induced myopathy: is there a role for ubiquinone supplementation? *Am. J. Health Syst. Pharm.* 61(5):515.
- Krägel J, Wüstneck R, Husband F, Wilde PJ, Makievski AV, Grigoriev DO & Li JB (1999) Properties of mixed protein/surfactant adsorption layers. *Colloids Surface B.* 12(3-6):399-407.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ & Nutrition C (2002) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 106(21):2747-2757.
- Küllenberg D, Taylor LA, Schneider M & Massing U (2012) Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis* 11.
- Laguerre M, López-Giraldo LJ, Lecomte J, Pina M & Villeneuve P (2007) In vitro evaluation tools for antioxidant capacity. *Prog. Lipid Res.* 14(5):278-292.
- Laligant A, Famelart MH, Brule GR, Piot M & Paquet D (2003) Fermentation by lactic acid bacteria at two temperatures of pre-heated reconstituted milk. I - Behaviour of proteins and minerals. *Lait.* 83(3):181-192.
- Landrier JF (2011) Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *Ol. Corps Gras Li.* 18:83-87.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M & Wolk A (2004) Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: A review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(6):935-945.
- Law AJR, Banks JM, Horne DS, Leaver J & West IG (1994) Denaturation of the whey proteins in heated milk and their incorporation into cheddar cheese. *Milchwissenschaft.* 49(2):63-67.
- Law B (2001) Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.* 11: 383-398

- Lawrence RC, Heap HA & Gilles J (1984) A controlled approach to cheese technology. *J. Dairy Sci.* 67(8):1632-1645.
- Lazzari M & Chiantore O (1999) Drying and oxidative degradation of linseed oil. *Polym. Degrad. Stabil.* 65(2):303-313.
- Le Graet Y & Gaucheron F (1999) pH-induced solubilization of minerals from casein micelles: influence of casein concentration and ionic strength. *J. Dairy Res.* 66(2):215-224.
- Lee SC, Yuk HG, Lee DH, Lee KE, Hwang YI & Ludescher RD (2002) Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35(4):358-363.
- Leger CL (2000a) La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardio-vasculaire, biodisponibilité. *Ol. Corps Gras Li.* 7(3):258-265.
- Leger CL (2000b) Prevention of cardiovascular risk by vitamin E. *Ann. Biol. Clin.* 58(5):527-540.
- Lemay A, Paquin P & Lacroix C (1994) Influence of microfluidization of milk on cheddar cheese composition, color, texture, and yield. *J. Dairy Sci.* 77(10):2870-2879.
- Lenaz G, Cavazzoni M, Genova ML, D'Aurelio M, Pich MM, Pallotti F, Formiggini G, Marchetti M, Castelli GP & Bovina C (1998) Oxidative stress, antioxidant defences and aging. *Biofactors.* 8(3-4):195-204.
- Lenoir J & Veisseyre R (1987) Coagulation du lait par la présure et correction des laits de fromagerie. *Le lait matière première de l'industrie laitière*, CEPIL-INRA, Paris p 329-340.
- Lenzi Almeida KC, Teles Boaventura G & Guzmán Silva A (2011) Influence of omega-3 fatty acids from the flaxseed (*Linum usitatissimum*) on the brain development of newborn rats. *Nutr. Hosp.* 26(5):991-996.
- Lethuaut L, Métro F & Genot C (2002) Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79(5):425-430.
- Lewin A & Lavon H (1997) The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol. Aspects. Med.* 18(SUPPL.):S213-S219.
- Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW & Kim YN (2006) Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am. J. Pathol.* 168(4):1107-1118.
- Lieber CS, DeCarli LM, Mak KM, Kim CI & Leo MA (1990) Attenuation of alcohol-induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. *Hepatology.* 12(6):1390-1398.

- Lippman SM, Benner SE & Hong WK (1994) Cancer chemoprevention. *J. Clin. Oncol.* 12(4):851-873.
- Littarru GP & Langsjoen P (2007a) Coenzyme Q10 and statins: Biochemical and clinical implications. *Mitochondrion.* 7(SUPPL.):S168-S174.
- Littarru GP & Tiano L (2007b) Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q<sub>10</sub>: Recent developments. *Mol. Biotechnol.* 37(1):31-37.
- Liu F & Tang C (2011) Cold, gel-like whey protein emulsions by microfluidisation emulsification: Rheological properties and microstructures. *Food Chem.* 127(4):1641-1647.
- Liu GY, Wang JM & Xia Q (2012) Application of nanostructured lipid carrier in food for the improved bioavailability. *Eur. Food Res. Technol.* 234(3):391-398.
- Liu S, Low NH & Nickerson MT (2010) Entrapment of flaxseed oil within gelatin-gum arabic capsules. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87(7):809-815.
- Lobato-Calleros C, Rodriguez E, Sandoval-Castilla O, Vernon-Carter EJ & Alvarez-Ramirez J (2006) Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W-1/O-W-2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Res. Int.* 39(6):678-685.
- Lowrie RJ, Kalab M & Nichols D (1982) Curd granule and milled curd junction patterns in cheddar cheese made by traditional and mechanized processes. *J. Dairy Sci.* 65(7):1122-1129.
- Lucas A, Rock E, Chamba JF, Verdier-Metz I, Brachet P & Coulon JB (2005) Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait.* 86(1):21-41.
- Lucas R, Comelles F, Alcantara D, Maldonado OS, Curcuroze M, Parra JL & Morales JC (2010) Surface-active properties of lipophilic antioxidants tyrosol and hydroxytyrosol fatty acid esters: a potential explanation for the nonlinear hypothesis of the antioxidant activity in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 58(13):8021-8026.
- Lucey J (2002) Rennet coagulation of milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 1:286-293.
- Lucey JA, Johnson ME & Horne DS (2003) Invited Review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *J. Dairy Sci.* 86(9):2725-2743.
- Lúcio M, Nunes C, Gaspar D, Ferreira H, Lima J & Reis S (2009) Antioxidant activity of vitamin E and trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies In vitro. *Food Biophys.* 4(4):312-320.

- Ma H, Forssell P, Partanen R, Seppänen R, Buchert J & Boer H (2009) Sodium caseinates with an altered isoelectric point as emulsifiers in oil/water systems. *J. Agric. Food Chem.* 57(9):3800-3807.
- Mackie AR, Gunning AP, Ridout MJ, Wilde PJ & Morris VJ (2001) Orogenic displacement in mixed  $\beta$ -lactoglobulin/ $\beta$ -casein films at the air/water interface. *Langmuir.* 17(21):6593-6598.
- Mancuso JR, McClements DJ & Decker EA (1999) The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 47(10):4112-4116.
- Manjunath MS & Sannappa J (2011) Variation of amino acids in some biological and pharmaceutical sample using FT-IR study. *Int. J. Pharm. Technol.* 3(1):1946-1951.
- Marie C & Delacroix-Buchet A (1994) Comparaison des variants A et C de la caséine  $\beta$  des laits de vaches Tarentaises en modèle fromager de type beaufort. II. Protéolyse et qualité des fromages. *Lait.* 74(6):443-459.
- Mark M, Ghyselinck NB & Chambon P (2006) Function of retinoid nuclear receptors: Lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46:451-480.
- Markert CL (1968) Neoplasia: a disease of cell differentiation. *Cancer Res.* 28(9):1908-1914.
- Martley FG & Crow VL (1993) Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3(4-6):461-483.
- Masmoudi H, Le Dreu Y, Piccerelle P & Kister J (2005) The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int. J. Pharm.* 289(1-2):117-131.
- Mattila P & Kumpulainen J (2001) Co-enzyme Q<sub>9</sub> and Q<sub>10</sub>: contents in foods and dietary intake. *Eur. Food Res. Technol.* 14:409-417.
- McClements DJ & Decker EA (2000) Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food. Sci.* 65(8):1270-1282.
- McClements DJ (2004) Protein-stabilized emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9(5):305-313.
- McClements DJ (2005) *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. Boca Raton: CRC Press. 609 p

- McClements DJ, Decker EA & Weiss J (2007) Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *J. Food. Sci.* 72(8):R109-R124.
- McClements DJ (2007a) Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47(7):611-649.
- McCullough FSW, Northrop-Clewes CA & Thurnham DI (1999) The effect of vitamin A on epithelial integrity. *Proc. Nutr.Soc.* 58(2):289-293.
- McSweeney PLH & Sousa MJ (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait.* 80(3):293-324.
- Mei L, McClements DJ, Wu J & Decker EA (1998) Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl. *Food Chem.* 61(3):307-312.
- Mestdagh F, Kerkaert B, Cucu T & De Meulenaer B (2011) Interaction between whey proteins and lipids during light-induced oxidation. *Food Chem.* 126(3):1190-1197.
- Michalski MC, Cariou R, Michel F & Garnier C (2002) Native vs. damaged milk fat globules: Membrane properties affect the viscoelasticity of milk gels. *J. Dairy Sci.* 85(10):2451-2461.
- Ministère de la Justice (2007) Règlement sur les produits laitiers. <http://lois.justice.gc.ca/fr/showdoc/cr/DORS-79-840///fr?page=1> (consulté le 15 novembre 2010)
- Molimard P, LeQuere JL & Spinnler HE (1997) Lipids and flavour of dairy products. *Ol. Corps Gras Li.* 4(4):301-311.
- Molina E, Papadopoulou A & Ledward DA (2001) Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids.* 15(3):263-269.
- Molyneux SL, Young JM, Florkowski CM, Lever M & George PM (2008) Coenzyme Q<sub>10</sub>: is there a clinical role and a case for measurement? *Clin. Biochem. Rev.* 29(2):71.
- Mora JR (2008) Homing imprinting and immunomodulation in the gut: Role of dendritic cells and retinoids. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14(2):275-289.
- Morin P, Pouliot Y & Britten M (2008) Effect of buttermilk made from creams with different heat treatment histories on properties of rennet gels and model cheeses. *J. Dairy Sci.* 91(3):871-882.
- Myers D (2005) *Surfactant science and technology*. John Wiley and Sons, New York, 3<sup>rd</sup>. 400 p
- Nakamura MT & Nara TY (2004) Structure, function, and dietary regulation of  $\Delta$ -6,  $\Delta$ -5, and  $\Delta$ -9 desaturases. *Nutrition.* 24:345-376.

- Napoli JL (2011) Effects of ethanol on physiological retinoic acid levels. *IUBMB Life*. 63(9):701-706.
- Nik AM, Corredig M & Wright AJ (2011) Release of lipophilic molecules during in vitro digestion of soy protein-stabilized emulsions. *Mol. Nutr. Food Res*. 55:S278-S289.
- Niles RM (1998) Control of retinoid nuclear receptor function and expression. *Sub-Cell. Biochem*. 30:3-28.
- Niles RM (2000) Recent advances in the use of vitamin A (retinoids) in the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*. 16(11-12):1084-1089.
- Nomura A, Stemmermann GN, Lee J & Craft NE (1997) Serum micronutrients and prostate cancer in Japanese Americans in Hawaii. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prevent*. 6(7):487-491.
- Ochoa JJ, Quiles JL, López-Frías M, Huertas JR & Mataix J (2007) Effect of lifelong coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation on age-related oxidative stress and mitochondrial function in liver and skeletal muscle of rats fed on a polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich diet. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. 62(11):1211-1218.
- Ogawa M, Sato M & Suzuki K (2007) Development of astaxanthin nano emulsion with improved shelf life and enhanced absorbability. *Fujifilm research & development* 52:26-35.
- Okpala COR, Piggott JR & Schaschke CJ (2009) Effects of high-pressure processing (HPP) on the microbiological, physico-chemical and sensory properties of fresh cheeses: A review. *Afr. J. Biotechnol*. 8(25):7391-7398.
- Olson D, White C & Richter R (2004) Effect of pressure and fat content on particle sizes in microfluidized milk. *J Dairy Sci*. 87(10):3217-3223.
- Olson JA & Hayaishi O (1965) The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 54(5):1364-1370.
- Olthof MR, Brink EJ, Katan MB & Verhoef P (2005) Choline supplemented as phosphatidylcholine decreases fasting and postmethionine-loading plasma homocysteine concentrations in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr*. 82(1):111-117.
- Ong L, Dagastine RR, Kentish SE & Gras SL (2010) The effect of milk processing on the microstructure of the milk fat globule and rennet induced gel observed using confocal laser scanning microscopy. *J. Food. Sci*. 75(3):E135-E145.
- Oomah BD (2001) Flaxseed as a functional food source. *J. Sc.i Food Agric*. 81(9):889-894.

- Ozaki A, Muromachi A, Sumi M, Sakai Y, Morishita K & Okamoto T (2010) Emulsification of coenzyme Q<sub>10</sub> using gum arabic increases bioavailability in rats and human and improves food-processing suitability. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 56(1):41-47.
- Pandey PK, Ramaswamy HS & St-Gelais D (2003) Evaluation of pH change kinetics during various stages of Cheddar cheese-making from raw, pasteurized, micro-filtered and high-pressure-treated milk. *Food Sci. Technol.* 36(5):497-506.
- Paquin P & Giasson J (1989) La microfluidisation comme procédé d'homogénéisation d'une boisson à base de matière grasse laitière. *Lait.* 69(6):491-498.
- Passi S, Ricci R, Cataudella S, Ferrante I, De Simone F & Rastrelli L (2004) Fatty acid pattern, oxidation product development, and antioxidant loss in muscle tissue of rainbow trout and *dicertrachus labrax* during growth. *J. Agric. Food Chem.* 52(9):2587-2592.
- Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA & Salem Jr N (2001) Physiological compartmental analysis of  $\alpha$ -linolenic acid metabolism in adult humans. *J. Lipid Res.* 42(8):1257-1265.
- Pearce KN & Kinsella JE (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26(3):716-723.
- Pezeshk A & Dalhouse AD (2000) Vitamin E, membrane fluidity, and blood pressure in hypertensive and normotensive rats. *Life Sci.* 67(15):1881-1889.
- Philip J, Gnanaprakash G, Jayakumar T, Kalyanasundaram P & Raj B (2003) Three distinct scenarios under polymer, surfactant, and colloidal interaction. *Macromolecules.* 36(24):9230-9236.
- Pimentel-González D, Campos-Montiel R, Lobato-Calleros C, Pedroza-Islas R & Vernon-Carter E (2009) Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* 42(2):292-297.
- Pincemail J & Defraigne JO (2003) Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.* 8(2):55-60.
- Pincemail J & Defraigne JO (2008) Potentiel thérapeutique du coenzyme Q<sub>10</sub>. *J. Cardiol.* 1:57-62.
- Pokorny J (2003) Problème de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. *Lipides et corps gras alimentaires. Graille J. Ed.: Technique et documentation, Lavoisier, Paris.* 147-187.



- Pokorný J, Poskočilová H & Davidek J (1981) Effect of phospholipids on the decomposition of lipid hydroperoxides (Short communication). *Nahrung*. 25(6):K29-K31.
- Polak T, Žlender B, Lušnic M & Gašperlin L (2011) Effects of coenzyme Q<sub>10</sub>, α-tocopherol and ascorbic acid on oxidation of cholesterol in chicken liver pâté. *Food Sci. Technol.* 44(4):1052-1058.
- Porter WL (1993) Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol. Ind. Health*. 9(1-2):93-122.
- Poulin JE, Cover C, Gustafson MR & Kay MMB (1996) Vitamin E prevents oxidative modification of brain and lymphocyte band 3 proteins during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93(11): 5600-5603.
- Pu J, Bankston JD & Sathivel S (2011) Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer. *Biosystems Eng.* 108(2):121-132.
- Pugnaroni LA, Dickinson E, Ettelaie R, Mackie AR & Wilde PJ (2004) Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging. *Adv. Colloid Interface Sci.* 107(1):27-49.
- Qian C & McClements DJ (2011) Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*. 25(5):1000-1008.
- Quinn PJ, Fabisiak JP & Kagan VE (1999) Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q. *Biofactors*. 9(2-4):149-154.
- Ramadan MF (2012) Antioxidant characteristics of phenolipids (quercetin-enriched lecithin) in lipid matrices. *Ind. Crop. Prod.* 36(1):363-369.
- Relkin P, Yung JM, Kalnin D & Ollivon M (2008) Structural behaviour of lipid droplets in protein-stabilized nano-emulsions and stability of α-tocopherol. *Food Biophys.* 3(2):163-168.
- Relkin P, Jung JM & Ollivon M (2009) Factors affecting vitamin degradation in oil-in-water nano-emulsions. *J. Therm. Anal. Calorim.* 98(1):13-18.
- Ries D, Ye A, Haisman D & Singh H (2010) Antioxidant properties of caseins and whey proteins in model oil-in-water emulsions. *Int. Dairy J.* 20(2):72-78.
- Robins MM (2000) Emulsions — creaming phenomena. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5(5–6):265-272.

- Roche Y, Peretti P & Bernard S (2006) Influence of the chain length of ubiquinones on their interaction with DPPC in mixed monolayers. *BBA - Biomembranes*. 1758(4):468-478.
- Rodriguez A, Sarda P, Nessmann C, Boulot P, Leger CL & Descomps B (1998) Delta 6- and Delta 5-desaturase activities in the human fetal liver: kinetic aspects. *J. Lipid Res.* 39(9):1825-1832.
- Rolland Y (2004) Plant natural antioxidants. *Antioxydants naturels végétaux*. 11(6):419-424.
- Rosenfeldt FL, Haas SJ, Krum H, Hadj A, Ng K, Leong JY & Watts GF (2007) Coenzyme Q(10) in the treatment of hypertension: a meta-analysis of the clinical trials. *J. Hum. Hypertens.* 21(4):297-306.
- Rozen TD, Oshinsky ML, Gebeline CA, Bradley KC, Young WB, Shechter AL & Silberstein SD (2002) Open label trial of coenzyme Q<sub>10</sub> as a migraine preventive. *Cephalalgia*. 22(2):137-141.
- Rynne NM, Beresford TP, Kelly AL & Guinee TP (2004) Effect of milk pasteurization temperature and *in situ* whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 14(11):989-1001.
- Saito H & Ishihara K (1997) Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *J. Am. Oil Soc.* 74(12):1531-1536.
- Sakakima Y, Hayakawa A, Nagasaka T & Nakao A (2007) Prevention of hepatocarcinogenesis with phosphatidylcholine and menaquinone-4: In vitro and in vivo experiments. *J. Hepatol.* 47(1):83-92.
- Sakano K, Takahashi M, Kitano M, Sugimura T & Wakabayashi K (2006) Suppression of azoxymethane-induced colonic premalignant lesion formation by coenzyme Q<sub>10</sub> in rats. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 7(4):599-603.
- Salager JL, Antón R, Anderez JM & Aubry JM (2001) Formulation des microémulsions par la méthode HLD. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés*, NJ2155.1-20.
- Salager JL, Antón R & Aubry J (2006) Formulation des émulsions par la méthode HLD. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés* J2-158:1-16.
- Salmieri S & Lacroix M (2006) Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 54(26):10205-10214.

- San Martin-González MF, Roach A & Harte F (2009) Rheological properties of corn oil emulsions stabilized by commercial micellar casein and high pressure homogenization. *LWT - Food Sci. Technol.* 42(1):307-311.
- Sândor PS, Di Clemente L, Coppola G, Saenger U, Fumal A, Magis D, Seidel L, Agosti RM & Schoenen J (2005) Efficacy of coenzyme Q<sub>10</sub> in migraine prophylaxis: A randomized controlled trial. *Neurology.* 64(4):713-715.
- Santé Canada (2008) Maladies du coeur. <http://www.hc-sc.gc.ca/hc-ps/dc-ma/heart-coeur-fra.php> (Visité le 13 février 2010)
- Santé Canada (2009) Les gras trans. <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/gras-trans-fats/index-fra.php> (Visité le 18 novembre 2011)
- Santé Canada (2010) Apports nutritionnels de référence. [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/reference/table/ref\\_vitam\\_tbl-fra.php](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/reference/table/ref_vitam_tbl-fra.php) (consulté le 13 octobre 2011)
- Semo, Kesselman, Danino & Livney (2007) Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids.* 21(5):936-942.
- Shahidi F & Miraliakbari H (2005) Omega-3 fatty acids in health and disease: Part 2 - Health effects of omega-3 fatty acids in autoimmune diseases, mental health, and gene expression. *J. Med. Food.* 8(2):133-148.
- Shi H, Noguchi N & Niki E (1999) Comparative study on dynamics of antioxidative action of  $\alpha$ -tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and  $\alpha$ -tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 27(3-4):334-346.
- Shklar G & Oh SK (2000) Experimental basis for cancer prevention by vitamin E. *Cancer Invest.* 18(3):214-222.
- Shukat R & Relkin P (2011) Lipid nanoparticles as vitamin matrix carriers in liquid food systems: On the role of high-pressure homogenisation, droplet size and adsorbed materials. *Colloid Surface B.* 86(1):119-124.
- Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Flint Beal M, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompoliti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL, Kurlan R, Molho E, Harrison M & Lew M (2002) Effects of coenzyme Q<sub>10</sub> in early Parkinson disease: Evidence of slowing of the functional decline. *Arch. Neurol.* 59(10):1541-1550.
- Simopoulos AP (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54(3):438-463.
- Simopoulos AP (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70(3 SUPPL.):560S-569S.

- Simopoulos AP (2004) Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biol. Res.* 37(2):263-277.
- Simopoulos AP (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 233(6):674-688.
- Singh K, Mridula D, Rehal J & Barnwal P (2011) Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51(3):210-222.
- Singh U, Devaraj S & Jialal I (2007) Coenzyme Q10 supplementation and heart failure. *Nutr. Rev.* 65(6):286-293.
- Sohal R & Forser M (2007) Coenzyme Q<sub>10</sub>, oxidative stress and aging. *Mitochondrion.* 7 suppl:S103-111.
- Sousa MJ, Ardö Y & McSweeney PLH (2001) Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11(4-7):327-345.
- Srinivasan M, Singh H & Munro PA (1999) Adsorption behaviour of sodium and calcium caseinates in oil-in-water emulsions. *Int. Dairy J.* 9(3-6):337-341.
- Srinivasan M, Singh H & Munro PA (2001) Creaming stability of oil-in-water emulsions formed with sodium and calcium caseinates. *J. Food. Sci.* 66(3):441-446.
- St-Gelais D (2002) Fromage. *Science et technologie du lait: transformation du lait*, Vignola CL (Édit.) Presses internationales Polytechnique, Montréal. p 349-407.
- Stephensen CB (2001) Vitamin A, infection, and immune function. *Annu. Rev. Nutr.* 21:167-192.
- Stocker R, Bowry VW & Frei B (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does  $\alpha$ -tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(5):1646-1650.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J & Solans C (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108-109(0):303-318.
- Tcholakova S, Denkov ND, Ivanov IB & Campbell B (2002) Coalescence in  $\beta$ -lactoglobulin-stabilized emulsions: Effects of protein adsorption and drop size. *Langmuir.* 18(23):8960-8971.
- Tcholakova S, Denkov ND, Ivanov IB & Campbell B (2006) Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Adv. Colloid Interface Sci.* 123-126(SPEC. ISS.):259-293.

- Terao K, Nakata D, Fukumi H, Schmid G, Arima H, Hirayama F & Uekama K (2006) Enhancement of oral bioavailability of coenzyme Q 10 by complexation with  $\gamma$ -cyclodextrin in healthy adults. *Nutr. Res.* 26(10):503-508.
- Theodosiou M, Laudet V & Schubert M (2010) Erratum: From carrot to clinic: An overview of the retinoic acid signaling pathway *Cell. Mol. Life. Sci.* 67(9):1563-1564.
- Thomas SR, Neuzil J, Mohr D & Stocker R (1995) Coantioxidants make alpha-tocopherol an efficient antioxidant for low-density-lipoprotein *Am. J. Clin. Nutr.* 62(6):S1357-S1364.
- Thomas SR, Witting PK & Stocker R (1999) A role for reduced coenzyme Q in atherosclerosis? *Biofactors.* 9(2-4):207-224.
- Thomas SR, Leichtweis SB, Pettersson K, Croft KD, Mori TA, Brown AJ & Stocker R (2001) Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q10 inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21(4):585-593.
- Tong LM, Sasaki S, McClements DJ & Decker EA (2000) Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J. Food. Sci.* 65(8):1325-1329.
- Tosh SM & Dalgleish DG (1998) The physical properties and renneting characteristics of the synthetic membrane on the fat globules of microfluidized milk. *J. Dairy Sci.* 81(7):1840-1847.
- Traber MG, Ramakrishnan R & Kayden HJ (1994) Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-  $\alpha$ -tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(21):10005-10008.
- Truan JS, Chen JM & Thompson LU (2010) Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. *Mol. Nutr. Food Res.* 54(10):1414-1421.
- Turcot S, Turgeon SL & St-Gelais D (2001) Effect of buttermilk phospholipid concentrations in cheese milk on production and composition of low fat Cheddar cheese. *Lait.* 81(3):429-442.
- Turcot S, St-Gelais D & Turgeon SL (2002) Ripening of low fat Cheddar cheeses made from milks enriched with phospholipids. *Lait.* 82(2):209-223.
- Turunen M, Olsson J & Dallner G (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *BBA - Biomembranes.* 1660(1-2):171-199.

- Ueda S & Yasunari K (2006) What we learnt from randomized clinical trials and cohort studies of antioxidant vitamin? : Focus on vitamin E and cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7(2):69-72.
- Vermunt SHF, Mensink RP, Simonis AMG & Hornstra G (1999) Effects of age and dietary n-3 fatty acids on the metabolism of [<sup>13</sup>C]-  $\alpha$ -linolenic acid. *Lipids.* 34(6 SUPPL.).
- Wackerbarth H, Stoll T, Gebken S, Pelters C & Bindrich U (2009) Carotenoid-protein interaction as an approach for the formulation of functional food emulsions. *Food Res. Int.* 42(9):1254-1258.
- Wagner D, Rousseau D, Sidhom G, Pouliot M, Audet P & Vieth R (2008) Vitamin D-3 fortification, quantification, and long-term stability in Cheddar and low-fat cheeses. *J. Agric. Food Chem.* 56(17):7964-7969.
- Walstra P (1993) Principles of emulsion formation. *Chem. Eng. Sci.* 48(2):333-349.
- Wan P, Zhao Y, Tong H, Yang Z, Zhu Z, Shen X & Hu J (2009) The inducing effect of lecithin liposome organic template on the nucleation and crystal growth of calcium carbonate. *Mater. Sci. Eng. C.* 29(1):222-227.
- Wang JL, Swartz-Basile DA, Rubin DC & Levin MS (1997) Retinoic acid stimulates early cellular proliferation in the adapting remnant rat small intestine after partial resection. *J. Nutr.* 127(7):1297-1303.
- Waninge R, Walstra P, Bastiaans J, Nieuwenhuijse H, Nylander T, Paulsson M & Bergenstahl B (2005) Competitive adsorption between beta-casein or beta-lactoglobulin and model milk membrane lipids at oil-water interfaces. *J. Agric. Food Chem.* 53(3):716-724.
- Washington C (1996) Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 20(2-3):131-145.
- Watanabe Y, Suzuki H & Ueda T (2006) HLB number of vitamins C, E, coenzyme Q(10) derivatives and their transportation efficiency into skin. *Vib. Spectrosc.* 42(2):195-200.
- Weber C, Sejersgard Jakobsen T, Mortensen SA, Paulsen G & Holmer G (1994) Antioxidative effect of dietary coenzyme Q10 in human blood plasma. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 64(4):311-315.
- Wen Y, Killalea S, McGettigan P & Feely J (1996) Lipid peroxidation and antioxidant vitamins C and E in hypertensive patients. *Irish J. Med. Sci.* 165(3):210-212.

- Whittinghill JM, Norton J & Proctor A (1999) A fourier transform infrared spectroscopy study of the effect of temperature on soy lecithin-stabilized emulsions. *J. Am. Oil Soc.* 76(12):1393-1398.
- Williams AG, Noble J & Banks JM (2001) Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 11(4-7):203-215.
- Yan W, Qiao L, Gu X, Li J, Xu R, Wang M, Reuhs B & Yang Y (2010) Effect of high pressure treatment on the physicochemical and functional properties of egg yolk. *Eur. Food Res. Technol.* 231(3):371-377.
- Yanishlieva NV & Marinova EM (2001) Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 103(11):752-767.
- Ye A, Srinivasan M & Singh H (2000) Influence of NaCl addition on the properties of emulsions formed with commercial calcium caseinate. *Food Chem.* 69(3):237-244.
- Ye A, Cui J, Taneja A, Zhu X & Singh H (2009) Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Res. Int.* 42:1093-1098.
- Yu LP & Hammond EG (2000) The modification and analysis of vegetable oil for cheese making. *J. Am. Oil Soc.* 77(9):911-915.
- Yuan Y, Gao Y, Zhao J & Mao L (2008) Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Res. Int.* 41(1):61-68.
- Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Gillies PJ, West SG & Kris-Etherton PM (2007) Dietary  $\alpha$ -linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(2):385-391.
- Zottola EA & Smith LB (1991) Pathogens in cheese. *Food Microbiol.* 8(3):171-182.