



HAL
open science

Élaboration de matériaux à base de farine de maïs : évaluation et compréhension des relations entre structure et cinétique de biodégradation

Fouzia Jbilou

► **To cite this version:**

Fouzia Jbilou. Élaboration de matériaux à base de farine de maïs : évaluation et compréhension des relations entre structure et cinétique de biodégradation. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10066 . tel-00841383

HAL Id: tel-00841383

<https://theses.hal.science/tel-00841383>

Submitted on 4 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre : 66-2011

Année 2011

UNIVERSITE Lyon1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Génie Biologique

**Elaboration de matériaux à base de farine de maïs :
évaluation et compréhension des relations entre
structure et cinétique de biodégradation**

Par

Fouzia JBILOU

SOUTENUE LE 29 AVRIL 2011

JURY :

Pr. Anne BERGERET (Ecole des Mines d'Alès)	Rapporteur
Pr. Yves GROHENS (Université de Bretagne Sud, Lorient)	Rapporteur
Pr. Françoise SILVESTRE (ENSIACET, Toulouse)	Rapporteur
Pr. Pascal DEGRAEVE (IUT Université Lyon1)	Directeur de thèse
Dr. Sophie GALLAND (IUT Université Lyon1)	Co-directrice de thèse
Dr. Nadia OULAHAL (IUT Université Lyon1)	Examineur
Dr. Valérie DESJARDIN (INSA Lyon)	Membre invité
Dr. Patrice DOLE (CTCPA Bourg en Bresse)	Membre invité

Liste des travaux relatifs à la thèse

Publications dans des revues à comité de lecture

(1) **Fouzia Jbilou**, Sophie Galland, Farouk Ayadi, Laurent Belard, Charlyse Pouteau, Patrice Dole, Valérie Desjardin, Rémy Bayard, Pascal Degraeve (2011). Biodegradation of corn flour-based materials assessed by enzymatic, aerobic, and anaerobic tests: influence of specific surface area. *Polymer Testing*, **30**, 131-139.

(2) **Fouzia Jbilou**, Farouk Ayadi, Sophie Galland, Catherine Joly, Patrice Dole, Laurent Belard, Pascal Degraeve. Effect of shear stress extrusion intensity on plasticized corn flour structure: proteins role and distribution. *Journal of Applied Polymer Science (in press)*

Communications à des congrès nationaux et internationaux

(1) **Fouzia Jbilou**, Pascal Degraeve, Issam Sebti. Synthèse sur les différentes méthodes d'évaluation de la biodégradabilité des polymères à base de ressources renouvelables. Colloque National de la Recherche dans les IUT (CNRIUT) les 29 et 30 mai 2008 à l'IUT A et l'IUT B, Université Claude Bernard Lyon 1. Lyon-Villeurbanne. (Communication orale et article de 8 pages)

(2) **Fouzia Jbilou**, Sophie Galland & Pascal Degraeve. Estimation de la biodégradabilité d'un matériau d'emballage alimentaire à base de farine de maïs par voie enzymatique. Colloque National de la Recherche dans les IUT (CNRIUT) 8-10 Juin 2009 à l'IUT A de Villeneuve d'Ascq Lille1. (Communication orale et article de 8 pages)

(3) **Fouzia Jbilou**, Sophie Galland, Laurent Belard, and Pascal Degraeve. Effect of corn flour extrusion on its enzymatic degradation: impact of shearing zone profile. Congrès Matbim: First International Meeting on Material / Bioproduct Interactions. 3-5 March 2010 AgroParisTech, Paris. (Communication par affiche)

(4) **Fouzia Jbilou**, Sophie Galland, Nadia Oulahal, Pascal Degraeve. Effet de la formulation et du procédé sur la biodégradation d'un matériau à base de farine de maïs. 15^{ème} journée scientifique de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé le 17 Mars 2010 à l'université Lyon1. (Communication par affiche)

(5) **Fouzia Jbilou**, Sophie Galland, Laurent Belard, Valérie Desjardin, Rémy Bayard, Pascal Degraeve. Biodegradation of corn flour-based material intended for food packaging under aerobic and anaerobic conditions. Congrès Plovdiv, Bulgarie au Food Science Engineering and Technologies. 15 et 16 octobre 2010. (Communication orale)

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (LRGIA) à l'IUT de l'Université Lyon1. J'exprime mes profonds remerciements à *Pascal Degraeve*, directeur du laboratoire et de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir permis d'y réaliser cette thèse, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour sa patience et son encouragement à finir ce travail dans les délais prévus. Son œil critique m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections. Je salue aussi la souplesse et l'ouverture d'esprit de mon directeur de thèse qui a su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche. Ensuite je tiens à remercier mon encadrante de thèse, *Sophie Galland*, Maître de Conférences à l'IUT de l'Université Lyon1, pour m'avoir donné la possibilité de m'ouvrir sur le domaine des procédés, pour m'avoir fait confiance, et pour l'intérêt qu'elle a montré pour les différentes parties de mon travail.

Je suis très reconnaissante à *Anne Bergeret*, professeur à l'Ecole des Mines d'Alès, *Françoise Silvestre*, Professeur à l'ENSIACET de Toulouse et *Yves Grohens*, professeur à l'Université Bretagne Sud d'avoir accepté le rôle de rapporteurs. Je remercie *Patrice Dole* du CTCPA, pour les réflexions et les conseils qu'il m'a prodigués depuis que nous nous sommes rencontrés en 2007, et *Rémy Bayard*, Maître de Conférences à L'INSA de Lyon, pour m'avoir accueillie au LGCIE (INSA-Lyon) pour réaliser les tests de biodégradation et d'avoir accepté d'examiner ce travail. Ma gratitude s'adresse aussi à *Nadia Oulahal* (IUTA de l'Université Lyon1) pour avoir accepté de faire partie du comité de suivi de cette thèse, je salue leur attitude proprement scientifique vis à vis d'un thème dont l'aspect appliqué reste actuellement une priorité absolue.

L'aboutissement de cette thèse a aussi été encouragé par de nombreuses discussions avec des collègues des laboratoires *LRGIA* et *LGCIÉ*. Je remercie *Catherine Joly* pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils. Plusieurs autres personnes (*Sandrine*, technicienne en microbiologie et *Zolalaina*, technicienne en biochimie) m'ont encouragé à finir ce travail par des gestes d'amitié dont je suis reconnaissante. Egalement, je ne peux pas oublier de remercier les six stagiaires qui m'ont accompagné durant cette aventure et dont une grande partie des résultats présentés dans ce manuscrit a été obtenue grâce à eux, merci beaucoup de m'avoir supportée.

Je veux aussi remercier ma famille et surtout mes parents, mon frère *Mohammed* et ma belle sœur *Anne* qui m'ont aidé à réaliser mon rêve.

Comment remercier mon mari, avec qui je partage ma vie, qui m'a soutenu pendant les moments difficiles.

Enfin, la réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce au financement octroyé par la région Rhône Alpes. Qu'elle soit vivement remerciée pour le support financier qu'elle m'a apportée durant ces trois ans.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS	1
CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
I. INTRODUCTION	8
II. LES POLYMERES BIODEGRADABLES	8
II.1. Polymères synthétiques d'origine fossile issus de la pétrochimie.....	9
II.2. Polymères d'origine naturelle	11
III. LES MATERIAUX UNIQUEMENT A BASE D'AMIDON.....	20
III.1. Procédés d'élaboration des matériaux à base d'amidon.....	20
III.2. Rôle des plastifiants.....	22
III.3. Interactions plastifiant-eau-amidon	24
III.4. Le vieillissement des matériaux à base d'amidon.....	25
IV. LES MELANGES A BASE D'AMIDON	26
IV.1. Amidon-zéine	26
IV. 2. Amidon-polymères synthétiques.....	28
V. DEGRADATION ET BIODEGRADATION DES MATERIAUX A BASE DE BIOPOLYMERES.....	30
V.1. Dégradation thermique	31
V.2. Dégradation par des microorganismes ou biodégradation	31
VI. METHODES DE MESURE DE LA BIODEGRADABILITE DES MATERIAUX	34
VI.1. Méthodes qualitatives	34
VI.2. Mesure de la biodégradation par voie aérobie en milieu liquide : méthode respirométrique (ISO 14851).....	36
VI.3. Compostage	37
VI.4. Mesure de la biodégradation par voie anaérobie.....	41
VI.5. Evaluation de la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique des biomatériaux.....	45
VII. CONCLUSION	48
CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES	50
I. ELABORATION DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS ET DE GLYCEROL	51
I.1. Matériels	51
I.2. Méthodes	51
II. ELABORATION DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS, DE GLYCEROL ET DE POLYBUTYLENE SUCCINATE	54
II.1. Matériels.....	54
II.2. Extrusion de la farine de maïs, du glycérol et du PBS.....	55
III. CARACTERISATION DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS	56
III.1. Mesure des propriétés mécaniques.....	56
III.2. Mesure de la porosité par adsorption/désorption	57
III.3. Activité de l'eau (a_w) des matériaux à base de farine de maïs.....	57
III.4. Détermination des isothermes de sorption de l'eau.....	58
III.5. Caractérisation par spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier.....	58
III.6. Calorimétrie différentielle à balayage.....	59
III.7. Diffraction des Rayons-X.....	59
III.8. Microscopie confocale à balayage laser	59
III.9. Observations en microscopie électronique à balayage de la structuration des matériaux composites à base de farine de maïs et du PBS.....	60
IV. EVALUATION DE LA BIODEGRADATION DES MATERIAUX.....	60
IV.1. Susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique	60
IV.2. Biodégradation par voie aérobie en milieu liquide	64
IV.3. Compostage	66
IV.4. Biodégradation par voie anaérobie en milieu liquide	69
V. ANALYSES STATISTIQUES	71
CHAPITRE III : MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS, D'EAU ET DE GLYCEROL.....	73

PARTIE I : EFFET DU COUPLE FORMULATION/PROCEDE SUR LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS	73
INTRODUCTION.....	74
I. COMPOSITION DE LA FARINE DE MAÏS.....	74
II. EFFET DU PROFIL DE CISAILLEMENT ET DU TAUX DE GLYCEROL SUR LA POROSITE DES MATERIAUX.....	75
III. INFLUENCE DU TRAITEMENT THERMOMECHANIQUE ET DU GLYCEROL SUR LES ISOTHERMES DE SORPTION DE L'EAU DES MATERIAUX	79
IV. CARACTERISATION STRUCTURALE DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS PAR SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER	80
V. MICROSCOPIE CONFOCALE A BALAYAGE LASER.....	83
VI. CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE ET DIFFRACTION DES RAYONS X	85
VII. RETROGRADATION DE L'AMIDON DE LA FARINE DE MAÏS ET STABILITE DES MATERIAUX DANS LE TEMPS.....	88
VIII. PROPRIETES MECANQUES	89
CHAPITRE III : MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS, D'EAU ET DE GLYCEROL.....	95
PARTIE II : EVALUATION DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS.....	95
INTRODUCTION.....	96
I. CHOIX DES ENZYMES	97
II. EFFET DE L'AIRE SPECIFIQUE	99
III. EFFET DU TRAITEMENT THERMOMECHANIQUE.....	105
III. 1. IDENTIFICATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR HPLC	106
III.2. EFFET DU PROFIL DE CISAILLEMENT EMPLOYE PENDANT L'EXTRUSION SUR LA SUSCEPTIBILITE DE L'AMIDON A L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	108
IV. SUSCEPTIBILITE DE L'AMIDON DE LA FARINE DE MAÏS A L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR DES ENZYMES AMYLOLYTIQUES : ROLE BARRIERE DES PROTEINES	110
V. CONCLUSION.....	111
CHAPITRE III : MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS, D'EAU ET DE GLYCEROL.....	113
PARTIE III : EVALUATION DE LA BIODEGRADATION DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS EN MODE AEROBIE ET ANAEROBIE	113
INTRODUCTION.....	114
1. LA BIODEGRADATION EN MILIEU AEROBIE.....	115
1.1. LE COMPOSTAGE	115
1.1.1 Evaluation de la biodégradation par mesure de la perte de poids	116
1.1.2. Observations visuelles de l'évolution du matériau à base de farine de maïs dans le compost.....	117
1.2.3. Observations en microscopie électronique à balayage environnementale des matériaux enfouis ..	118
1.1.4. Etude de l'influence de la formulation (taux de glycérol) et du cisaillement sur la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs dans le compost	120
1.2. RESPIROMETRIE AEROBIE EN MILIEU LIQUIDE PAR MESURE DE LA DEMANDE BIOLOGIQUE EN OXYGENE (DBO).....	122
1.2.1. Activité de l'inoculum selon la saison	122
1.2.2. Isolement de souches microbiennes dégradant les matériaux à base de farine de maïs à partir de la boue en utilisant la méthode des zones claires	123
1.2.3. Evaluation de la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs : influence du matériau et du procédé	124
2. LA BIODEGRADATION EN MILIEU ANAEROBIE.....	127

2.1. CARACTERISATION DU MATERIAU ET DE L'INOCULUM	127
2.2. EVALUATION DE LA BIODEGRADATION PAR MESURE DE PRODUCTION DE BIOGAZ DE MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS	128
2.2.1. <i>Influence du traitement thermomécanique</i>	128
2.2.2. <i>Influence de la formulation (taux de glycérol) et du procédé (taux de cisaillement) sur la biodégradation anaérobie</i>	130
2.2.3. <i>Adaptation de l'inoculum à son substrat</i>	134
2.2.4. <i>Influence de l'aire spécifique du matériau</i>	135
3. CONCLUSION GENERALE	136
CHAPITRE IV : MATERIAUX A BASE DE MELANGES DE FARINE DE MAÏS, DE GLYCEROL ET DE POLYBUTYLENE SUCCINATE (PBS).....	142
INTRODUCTION.....	143
I. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES MATERIAUX PBS-FARINE DE MAÏS-GLYCEROL.....	144
I.1. ISOTHERMES DE SORPTION DE L'EAU DES MATERIAUX.....	144
I.2. CRISTALLINITE DES MATERIAUX A BASE DE FARINE DE MAÏS, DE GLYCEROL ET DE PBS.....	145
I.3. PROPRIETES MECANIQUES	147
I.4. PROPRIETES MORPHOLOGIQUES DES MATERIAUX ELABORES A PARTIR DE PBS, DE FARINE DE MAÏS ET DE GLYCEROL.....	151
II. ETUDE DE L'EFFET DU POLYBUTYLENE SUCCINATE (PBS) SUR LA CINETIQUE D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE L'AMIDON DE LA FARINE DE MAÏS PAR DES ENZYMES AMYLOLYTIQUES.....	152
III. EVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE DES MATERIAUX COMPOSITES A BASE DE FARINE DE MAÏS ET DE PBS	157
III.1. PAR MINERALISATION DANS LE COMPOST	157
III.2. CINETIQUE DE BIODEGRADATION PAR RESPIROMETRIE EN MILIEU AEROBIE	158
III.3. CINETIQUE DE BIODEGRADATION PAR VOIE ANAEROBIE.....	159
IV. CONCLUSIONS.....	161
DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS GENERALES	164

Liste des abréviations et acronymes

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
AGV	Acides gras volatils
a_w	Activité de l'eau
CEN	Comité Européen de Normalisation
COT	Carbone organique total
DBO	Demande biologique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
DNS	Acide Dinitrosalicylique
DP	Degré de Polymérisation
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage
FNADE	Fédération Nationale des Activités de la Dépollution et de l'Environnement
HR	Humidité Relative
IR	Infra-rouge
MCBL	Microscopie Confocale à Balayage Laser
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
PBS	PolyButylène Succinate
PCL	PolyCaproLactones
PEA	PolyEsterAmides
PEP	Pôle Européen de Plasturgie
PET	PolyEthylène Téréphtalate
PHAs	PolyHydroxyAlkanoates
PHB	PolyHydroxyButyrate
PHBV	Poly(HydroxyButyrate-co-hydroxyValérate)
PHV	PolyHydroxyValérate
PLA	Acide PolyLactique
PVC	PolyChlorure de Vinyle
RX	Rayon-X
Tg	Température de transition vitreuse (glass transition)
UFC	Unités Formant Colonies
UV	Ultra-Violets
ΔH	Enthalpie endothermique

Listes des figures et des tableaux

Figure 1 : Différents types d’emballages (Sessi, 2006).....	1
Figure 2 : Quantité d’emballage mise sur les marchés français en 2002, 2004 et 2006 selon l’ADEME (Agence de l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie).	2
Figure 3 . Réduction de l’impact des emballages plastiques sur l’environnement (EN 13429 à 13432 sont des numéros correspondant à ceux des normes européennes (EN) concernant la réutilisation et la valorisation des déchets d’emballages plastiques). Les chiffres sont ceux des statistiques de l’ADEME (Agence de l’Environnement et de la Maîtrise de l’Energie) pour l’année 2006.	3
Figure 4 : Schéma représentant les différents partenaires impliqués dans le projet EMABIO et leurs missions.	5
Figure 5 . Classification des polymères biodégradables (Avérous, 2004).	9
Figure 6 : Formule chimique du PBS (Shah <i>et al.</i> , 2008).	10
Figure 7 : Formule de l’acide succinique.	10
Figure 8 : Formule du 1,4 butanediol.	11
Figure 9 : La structure de la cellulose	14
Figure 10 : Structure de l’amylopectine.....	15
Figure 11 : Structure de l’amylose	15
Figure 12 : Observations par microscopie électronique de grains d’amidon provenant de différentes sources : riz (a), blé (b), pomme de terre (c) et maïs (d) (Singh <i>et al.</i> , 2003).....	16
Figure 13 : Distribution de la taille des particules d’amidon de maïs (Sandhu <i>et al.</i> , 2004)..	17
Figure 14 : Différents niveaux d’organisation au sein d’un grain d’amidon	18
Figure 15 : Phénomènes intervenant au cours de la gélatinisation de l'amidon	19
Figure 16 : Représentation schématique de la phase de transition de l’amidon durant le processus de chauffage et de vieillissement. (d’après Yu <i>et al.</i> , 2005).....	20
Figure 17 : Transformation de l'amidon natif en amidon plastifié (d'après Poutanen et Forssell, 1996).....	22
Figure 18 : Evolution de la contrainte maximale (○) et de l’allongement à la rupture (□) de films d'amidon de pomme de terre plastifiés en fonction de la teneur en glycérol à 25°C (d’après Lourdin <i>et al.</i> , 1997).....	22
Figure 19 : Schématisation du mécanisme de plastification à l’échelle moléculaire (Trotignon <i>et al.</i> , 1996).....	24
Figure 20 : Isothermes de sorption d'eau d'amidon de blé à 20°C en fonction de la teneur en glycérol à différentes humidités relatives (HR) (○ 11% HR, ◆ 33% HR, □ 44% HR, Δ 58% HR, × 68% HR, *80%HR) d'après Godbillot <i>et al.</i> (2006).....	25
Figure 21 : Observations en microscopie confocale à balayage laser de l’effet du taux de cisaillement et de la quantité de zéine (couleur orange) sur la morphologie de matériau amidon-zéine extrudés à 95°C (Habeych <i>et al.</i> , 2008).....	27
Figure 22 : Observation en microscopie électronique à balayage du mélange amidon-zéine (90 :10) extrudé à 95°C (Habeych <i>et al.</i> , 2008).	28
Figure 23 : Représentation schématique de la morphologie des mélanges amidon plastifié/PCL en fonction de la teneur en PCL.....	29
Figure 24 : Zones claires autour des colonies ayant dégradé le PLA (Tokiwa <i>et al.</i> , 2006)...	35
Figure 25 : Evolution de la température et du pH au cours du compostage (d’après la Fédération Nationale des Activités de la Dépollution et de l’Environnement (FNADE)).	38
Figure 26 : Variations du taux de croissance relatif des microorganismes méthanogènes en fonction de la température (Batstone <i>et al.</i> , 2002).	44
Figure 27 : Les différentes étapes de dégradation anaérobie de la matière organique.....	45
Figure 28 : Les mécanismes d’action des enzymes amylolytiques (Feuillet <i>et al.</i> , 2000).....	47

Figure 29 : Les différents diamètres utilisés pour le tamisage de la farine de maïs.....	51
Figure 30 : Extrudeuse bi-vis corotative conçue pour traiter la matière à hautes pressions (jusqu'à 275 bars) en continu et à hautes températures (jusqu'à 400 °C). (PEP, Oyonnax, France).....	52
Figure 31 : Profil de vis avec A, une zone de cisaillement et B, 3 zones de cisaillement.....	53
Figure 32 : Le moule utilisé pour obtenir des matériaux sous forme d'éprouvettes PEP, Oyonnax, France).	53
Figure 33 : Etapes d'élaboration d'un matériau plastique à partir d'une farine de maïs	54
Figure 34 : Différentes étapes de l'extrusion	55
Figure 35 : Les différentes éprouvettes (de type 1A) et les granulés de PBS obtenus par le Pôle Européen de Plasturgie (PEP) pour les différentes formulations de farine de maïs, glycérol et PBS.	56
Figure 36 : Epreuve de type 1A.	56
Figure 37 : Principe du dosage du glucose par la glucose oxydase.....	63
Figure 38 : Différents éléments d'un respiromètre fermé	65
Figure 39 : Les jarres contenant du compost mélangé avec le matériau (LGCIE, EA n° 4126, INSA Lyon-Université Lyon1).	67
Figure 40 : Dispositif permettant une incubation en anaérobiose (LGCIE, EA n° 4126, INSA Lyon-Université Lyon1).....	71
Figure 41 : Les différentes fractions obtenues par tamisage de la farine de maïs brute.....	74
Figure 42 : Isothermes d'adsorption d'azote à 77K des matériaux à base de farine de maïs broyés et tamisés à 0,2 mm.	76
Figure 43 : Evolution de la surface spécifique des matériaux broyés et tamisés à 0,2 mm à base de farine de maïs en fonction du taux de glycérol et du type de cisaillement appliqué. (Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec n=3).	77
Figure 44 : Evolution du volume cumulé des pores en fonction de diamètre des pores pour les matériaux à base de farine de maïs broyés et tamisés à 0,2 mm (A). B correspond au grossissement de la région de diamètre de pores allant de 1,5 à 3 nm.	78
Figure 45 : Isothermes de sorption à 25°C de la farine de maïs native et des matériaux extrudés à base de farine de maïs (broyés et tamisés à 0,2 mm) à 5% et 10 % de glycérol cisailés une ou trois fois (A) et le B correspond au grossissement de la région des a_w comprises entre 0,8 et 0,9.....	79
Figure 46 : Spectres IR moyens normalisés de la farine de maïs et des matériaux extrudés à 10% de glycérol cisailés 1 (10G1C) ou 3 fois (10G3C). La figure 47A représente la région spectrale de 800 à 1350 cm^{-1} et la figure 47B représente la région spectrale de 1500 à 1700 cm^{-1} qui correspond aux bandes amide I et amide II caractéristiques de la structure secondaire des protéines.	81
Figure 47 : Spectres IR moyens normalisés de la farine de maïs et des matériaux extrudés à 10% de glycérol cisailés une (5G1C) ou 3 fois (5G3C). La figure 48A représente la région spectrale de 800 à 1350 cm^{-1} et la figure 48B représente la région spectrale de 1500 à 1700 cm^{-1} qui correspond aux bandes amide I et amide II caractéristiques de la structure secondaire des protéines.....	83
Figure 48 : Observations en microscopie confocale à balayage laser de la farine de maïs native (a (grossissement x10) et b (grossissement x 25)) et des matériaux à 5 et 10% de glycérol (5G1C (c (grossissement x10) et d (grossissement x 25)), 5G3C (e (grossissement x10) et f(grossissement x 25)), 10G1C (g (grossissement x10) et h (grossissement x 25)) et 10G3C (i (grossissement x10) et j (grossissement x 25))).	84
Figure 49 : Thermogrammes de la farine de maïs native (a), et des échantillons (matériaux obtenus par extrusion puis injection d'un mélange de farine de maïs et de glycérol) 5G1C (b), 10G1 C (c), 5G3C (d) et 10G3C (e).....	86

Figure 50 : Diagrammes de diffraction des rayons X de la farine de maïs native(a), 5G1C (b), 10G1C (c), 5G3C (d) et 10G3C (e).	87
Figure 51 : Evolution de l'enthalpie de gélatinisation (ΔH) des matériaux durant 16 jours de stockage à 60°C et 70% d'humidité relative (HR).	88
Figure 52 : Module de Young pour les matériaux 5G1C, 10G1C, 5G3C et 10G3C à 50% HR et à 23°C. Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec n=3 et les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher ($P < 0,05$).	90
Figure 53 : Contrainte à la rupture pour les matériaux 5G1C, 10G1C, 5G3C et 10G3C à 50% HR et à 23°C. Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec n=3 et les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher ($P < 0,05$).	91
Figure 54 : Pourcentage d'allongement pour les matériaux 5G1C, 10G1C, 5G3C et 10G3C à 50% HR et à 23°C. Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec n=3 et les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher ($P < 0,05$).	92
Figure 55 : Evolution du pourcentage d'hydrolyse en sucres réducteurs de l'amidon de la farine de maïs par des enzymes amylolytiques (50U.mL ⁻¹) à 50°C et à pH 5,5 en fonction du temps.	97
Figure 56 : Evolution dans le temps de la concentration en sucres réducteurs (en g sucres réducteurs .L ⁻¹) au cours de l'hydrolyse à 50°C et pH 5,5 d'une suspension à 30g.L ⁻¹ du matériau à base de 92 % de farine de maïs et 8 % de glycérol à différentes aires spécifiques par une préparation enzymatique commerciale Hazyme® DCL (α -amylase et amyloglucosidase à 50 U.mL ⁻¹).	99
Figure 57 : Effet de l'aire spécifique des matériaux à base de farine de maïs sur la vitesse initiale (g de sucres réducteurs libérés .L ⁻¹ .min ⁻¹) d'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques.	100
Figure 58 : Représentation du logarithme de la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique en fonction de l'inverse de l'aire spécifique au carré des matériaux.	101
Figure 59 : Représentation des résultats d'hydrolyse des matériaux à différents aires spécifiques selon une réaction d'hydrolyse enzymatique du premier ordre. a : >30 mm ⁻¹ ($\emptyset < 0,2$ mm), b : >3 mm ⁻¹ ($\emptyset < 2$ mm) et c : >2 mm ⁻¹ ($\emptyset < 3$ mm).	103
Figure 60 : Représentation de 1/ki en fonction de l'aire accessible.	104
Figure 61 : Evolution du pourcentage de sucres réducteurs libérés pendant 24h de séjour dans un tampon acétate (pH 5,5 et à 50°C) sous agitation avec ou sans enzyme. Les hydrolyses enzymatiques sont effectuées par une préparation enzymatique commerciale Hazyme® DCL (α -amylase et amyloglucosidase à 50 U.mL ⁻¹) d'une suspension à 30g.L ⁻¹ de la farine de maïs et du matériau extrudé (92% de farine de maïs et 8% glycérol) broyés et tamisés à 0,2mm.	105
Figure 62 : Les chromatogrammes HPLC (séparation des sucres sur colonne PL HI-Plex Na) du matériau extrudé-injecté (92% farine de maïs et 8% glycérol) avant et après hydrolyse par une préparation enzymatique commerciale Hazyme® DCL (α -amylase et amyloglucosidase à 50 U.mL ⁻¹) d'une suspension à 30g.L ⁻¹ dans un tampon acétate pH 5,5.à 50°C.	107
Figure 63 : Vitesses initiales d'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques seules ou associées à des enzymes protéolytiques à 50°C, pH 5,5 de la farine de maïs native et des matériaux extrudés-injectés broyés et tamisés à 0,2 mm (n=3). Les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher ($P < 0,05$).	110
Figure 64 : Suivi de la perte de poids des éprouvettes du matériau extrudé-injecté (à base de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol) pour différentes aires spécifiques dans le compost à 40°C et 90% d'humidité relative en fonction du temps d'enfouissement.	116
Figure 65 : Observations microscopiques du matériau à base de farine de maïs à différents stades d'enfouissement dans le compost. AB : avant enfouissement, CD : après 15 jours, EF : après 30 jours et GH : après 45 jours d'enfouissement (grossissement x 100).	118

Figure 66 : Observation de la colonisation du matériau par des moisissures de couleur vertes.	119
Figure 67 : Evolution de la biodégradation d'un matériau à base de farine de maïs, de glycérol et de l'eau par mesure du CO ₂ libéré en fonction du nombre de cisaillements après 24 jours de compostage à 35°C (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3). 10G1C et 10G3C : matériaux extrudés-injectés à base de 10% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement. 5G1C et 5G3C : matériaux extrudés-injectés à base de 5% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement.	121
Figure 68 : Evolution de la demande biologique en oxygène de la boue aérobie en fonction des périodes de l'année.	122
Figure 69 : Apparition des zones claires autour des colonies dégradant le matériau (à base de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol). (a) Boîte de Petri après 2 jours d'incubation, (b) après 5 jours et (c) après 6 jours d'incubation.....	123
Figure 70 : Apparition d'une zone claire après 2 jours d'incubation autour de la colonie hydrolysant l'amidon.....	124
Figure 71 : Evolution du pourcentage de biodégradation de la farine de maïs avant et après le traitement thermomécaniques d'extrusion et d'injection.	125
Figure 72 : Evolution de la demande biologique en oxygène à 23°C des matériaux 5G1C, 5G3C, 10G1C et 10G3C broyés et tamisés avec un tamis de diamètre 0,2 mm. 10G1C et 10G3C: matériaux extrudés-injectés à base de 10% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement. 5G1C et 5G3C: matériaux extrudés-injectés à base de 5% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement.....	126
Figure 73 : Evolution de la production de biogaz durant 48 jours lors de la biodégradation anaérobie à 35°C de la farine de maïs non extrudée et des matériaux élaborés par extrusion puis injection d'un mélange de 92% (m/m) de farine de maïs et de 8% (m/m) de glycérol. (Les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3).....	128
Figure 74 : Evolution de la production de CO ₂ et de CH ₄ durant 48 jours de la biodégradation anaérobie à 35°C en fonction du traitement thermomécanique.	129
Figure 75 : Evolution de la production de biogaz durant 48 jours de biodégradation anaérobie à 35°C des matériaux extrudés-injectés en fonction du taux de cisaillement appliqué. A correspond au matériau à 10% glycérol cisailé 1 (10G1C) ou 3 fois (10G3C) et B correspond au matériau à 5% glycérol cisailé 1 (5G1C) ou 3 fois (5G3CC). (les valeurs de biogaz reportées correspondent à la moyenne de 3 essais et les barres d'erreur correspondent à l'écart type).....	131
Figure 76 : Evolution du ratio CH ₄ / CO ₂ produit durant 48 jours lors de la biodégradation anaérobie à 35°C en fonction du taux de glycérol et du nombre de cisaillements (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3).....	132
Figure 77 : Evolution de la production de biogaz durant 21 jours de biodégradation anaérobie à 35°C en fonction du nombre de cisaillements et du pourcentage de glycérol après un 2 ^{ème} rajout de matériau (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3).	134
Figure 78 : Evolution du ratio CH ₄ / CO ₂ produit durant 21 jours de la biodégradation anaérobie à 35°C en fonction des traitements thermomécaniques (1 ou 3 zones de cisaillement) et de la formulation (mélange de farine de maïs-glycérol à 5 ou 10%) des matériaux après le 2 ^{ème} rajout de matériau.	135
Figure 79 : Evolution de la biodégradation anaérobie en fonction de l'aire spécifique du matériau (à base de 92% de farine de maïs et de 8% glycérol) extrudé-injecté après 48 jours d'incubation à 35°C en conditions anaérobies (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3).	136

Figure 80 : Temps nécessaire pour atteindre 50% de biodégradation des matériaux à base de farine de maïs en fonction de leurs aires spécifiques pour la biodégradation anaérobie, le compostage et enzymatique.....	138
Figure 81 : Evolution de l'activité résiduelle du lysozyme en fonction de la température (90, 100, 110 et 120°C) d'extrusion et du taux de glycérol dans la farine de maïs (25 et 30 % de glycérol). La farine de maïs est pré-conditionnée à 50% HR avant extrusion.....	140
Figure 82 : Evolution de l'activité résiduelle du lysozyme en fonction du pourcentage d'humidité relative (HR) des matériaux à 20 et 25% glycérol extrudé à 90°C.....	141
Figure 83 : Isotherme de sorption à 25°C des matériaux broyés et tamisés à 0,2 mm.....	144
Figure 84 : Evolution du taux d'hydratation en fonction de la teneur en PBS à différentes humidités relatives (à 25°C).....	145
Figure 85 : Thermogrammes des matériaux à base de farine de maïs et de PBS obtenus par extrusion et injection.....	146
Figure 86 : Evolution du module de Young en fonction de la quantité de PBS ajoutée à la farine de maïs plastifiée.....	148
Figure 87 : Evolution de la contrainte à la rupture en fonction de la quantité de PBS ajoutée à la farine de maïs plastifiée.....	148
Figure 88 : Evolution du logarithme (Log) de l'allongement à la rupture en fonction de la quantité de PBS ajoutée à la farine de maïs plastifiée (A). B présente l'évolution de l'allongement à la rupture (%).....	150
Figure 89 : Observations en microscopie électronique à balayage des matériaux composés d'un mélange de farine de maïs, de glycérol et de PBS en proportions variables.....	151
Figure 90 : Evolution des sucres réducteurs libérés pendant 24h au cours de l'hydrolyse enzymatique des matériaux à base de farine de maïs et de PBS (à 50°C, pH 5,5) par un cocktail d'enzymes amylolytiques (α -amylase et amyloglucosidase 50U.mL ⁻¹ DSM Food Specialties, Seclin, France) et lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (50U.mL ⁻¹). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n= 3).....	153
Figure 91 : Profils chromatographiques des produits d'hydrolyse des matériaux par la lipase au temps 0 h (a) et après 24 h (b). Les échantillons sont analysés par HPLC sur colonne Metacarb 87H à 35 °C avec 0,01N acide sulfurique/méthanol (9 :1 v:v) pour un débit de 0,45 mL.min ⁻¹	156
Figure 92 : Evolution du pourcentage de biodégradation des matériaux (broyés puis tamisés à 0,2 mm) à base de farine de maïs et de PBS à différents pourcentages compris entre 30 et 100 après 33 jours d'incubation à 35°C et 50% d'humidité relative dans du compost.....	157
Figure 93 : Evolution de la DBO à 23°C entre 0 et 42 jours d'une suspension à 0,34 g.L ⁻¹ des matériaux broyés et tamisés à 0,2 mm. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages de PBS dans les matériaux.....	158
Figure 94 : Evolution du volume de biogaz produit durant l'incubation des matériaux à base de farine de maïs et de PBS à 35 °C en conditions anaérobies. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages de PBS dans les matériaux.....	160
Figure 95 : Evolution du volume de méthane produit durant l'incubation des matériaux à base de farine de maïs et du PBS à 35 °C en conditions anaérobies. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages respectifs de PBS dans les matériaux.....	160
Figure 96 : Pourcentage de biodégradation des matériaux à base de farine de maïs plastifiée à 25% de glycérol mélangée à du PBS en pourcentages variables (de 30 à 100%) après 33 jours d'incubation à 35°C en milieu liquide anaérobie. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages de PBS dans les matériaux.....	161
Figure 97 : Schéma explicatif des différents liens entre le matériau, son accessibilité à l'hydrolyse enzymatique et sa biodégradation.....	166

Tableau 1 : Les principaux secteurs d'utilisation des matériaux plastiques (Revue de l'industrie française de l'emballage, 2008).	8
Tableau 2 : Les différents types de protéines utilisées pour la fabrication de bioemballages	13
Tableau 3 : Différentes sources d'enzymes amylolytiques.....	47
Tableau 4 : Formulations utilisées pour les matériaux à base de farine de maïs.....	54
Tableau 5 : Les différentes formulations réalisées.....	55
Tableau 6 : Composition élémentaire (en carbone, hydrogène, azote et soufre) des particules de la farine de maïs en fonction de leur taille (fraction I ($D > 0,4\text{mm}$), fraction II ($0,2 < D < 0,4\text{mm}$), fraction III ($0,1 < D < 0,2\text{mm}$) et fraction IV ($D < 0,1\text{mm}$))......	75
Tableau 7 : Evolution des vitesses initiales d'hydrolyse de la farine de maïs en fonction des enzymes utilisées.....	98
Tableau 8 : Pourcentage d'hydrolyse de l'amidon présent dans le matériau à base de farine de maïs par des enzymes amylolytiques des matériaux (broyé et tamisé à $0,2\text{mm}$) après 6 heures d'hydrolyse par une préparation enzymatique (Hazyme [®] DCL contenant 50 U.mL^{-1} à 50°C pH 5,5.....	108
Tableau 9 : Evolution du matériau (à base de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol) de dimension $45\text{mm} \times 18\text{mm} \times 4\text{mm}$ et de la qualité du compost durant l'enfouissement.....	117
Tableau 10 : Evolution du nombre de bactéries (sur milieu PCA) et de champignons (sur milieu Sabouraud) et du pH avant et après la dégradation des matériaux en compost.....	120
Tableau 11 : Pourcentages de biodégradation ultimes après 25 jours d'incubation en compost à 35°C	122
Tableau 12 : Evolution de la biodégradation dans le temps selon le profil de cisaillement .	126
Tableau 13 : Pourcentages de matière sèche et de matière volatile sèche des échantillons et de la boue anaérobie.....	127
Tableau 14 : Evolution du pourcentage de biodégradation en fonction du traitement thermomécanique (les pourcentages de biodégradation correspondent à la moyenne de 3 essais et sont suivis de l'écart type).	130
Tableau 15 : Evolution du pourcentage de biodégradation en fonction de la formulation et du profil de cisaillement.....	133
Tableau 16 : Enthalpie de fusion et taux de cristallinité du PBS en fonction du taux de PBS incorporé dans le matériau.	147
Tableau 17 : Evolution du pourcentage de solubilisation des sucres réducteurs de l'amidon des matériaux à base de farine de maïs et de PBS au bout de 24h d'hydrolyse à 50°C selon la nature des enzymes utilisées. (moyenne +/- écart type ($n=3$))......	154
Tableau 18 : Pourcentage de biodégradation des matériaux après 33 jours d'incubation évalué par respirométrie.	159
Tableau 19 : Pourcentage de biodégradation atteint après 33 jours d'incubation en fonction de la méthode utilisée.....	163

Introduction générale et objectifs

Les emballages font partie de notre quotidien, en effet, en France la consommation d'emballages par habitant était estimée à 200 kg par an en 2002 (ADEME). Ils sont présents dans plusieurs domaines en raison de leurs multiples fonctions. Selon la directive 94/62/CE du 20 décembre 1994, un objet peut être qualifié d'emballage s'il remplit les fonctions suivantes : contenir et protéger un produit tout au long de son cycle de vie. Les emballages sont constitués de différents types de matériaux (le verre, le carton, le bois, le plastique et le métal) (figure 1).

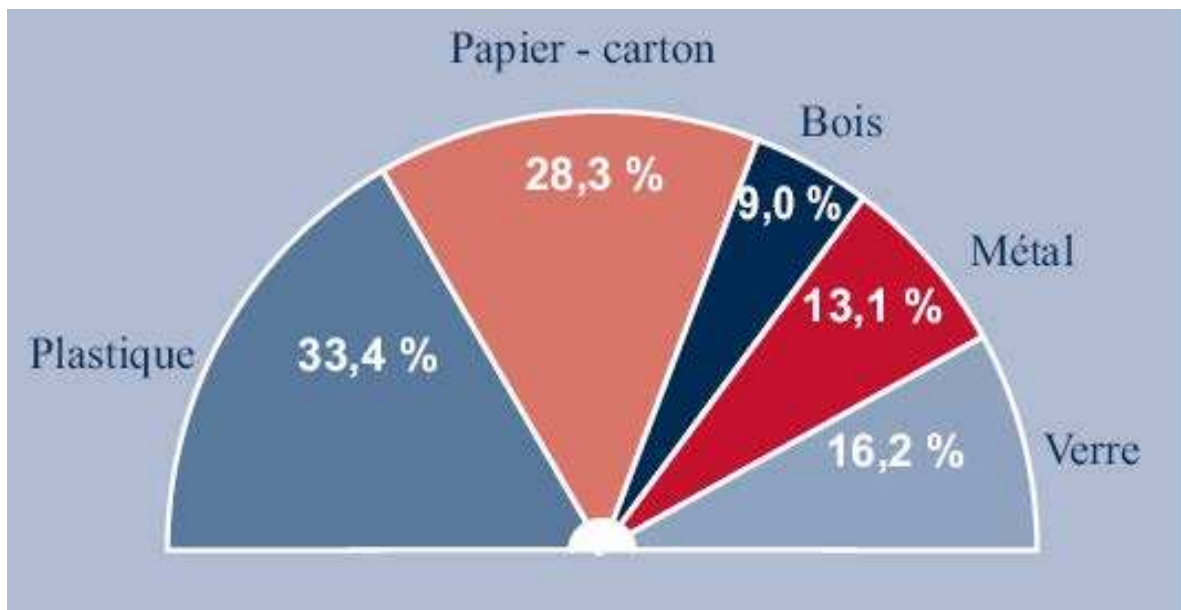


Figure 1 : Différents types d'emballages (Sessi, 2006).

Ces dernières décennies, la production d'emballages a connu une augmentation rapide dans le monde occidental (Aarnio *et al.*, 2008). Le marché mondial des emballages est estimé à 560 milliards US\$ (433 milliards €) en 2009. En France, l'emballage est le premier domaine qui utilise le plastique, environ 38 % de la consommation française annuelle (figure 2).

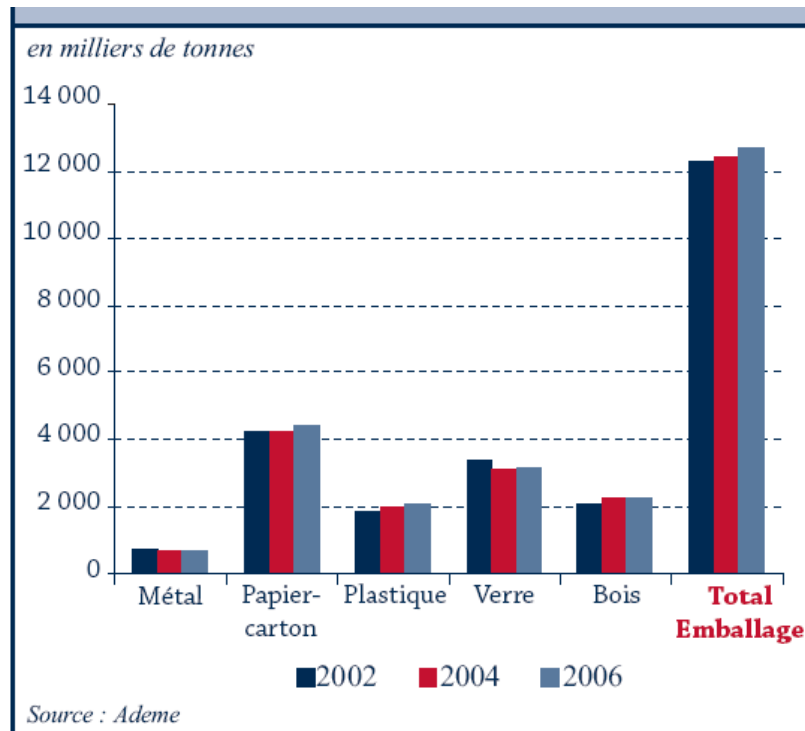


Figure 2 : Quantité d'emballage mise sur les marchés français en 2002, 2004 et 2006 selon l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie).

Les matériaux polymères nommés aussi plastiques sont très utilisés dans plusieurs domaines d'application en raison de leurs propriétés mécaniques. En revanche, l'augmentation considérable de l'utilisation d'emballages plastiques d'origine synthétique et leur exploitation intensive pour des usages courants a pour conséquence l'accumulation de déchets non biodégradables dans l'environnement. Ceci a causé un encombrement des décharges, une pollution des sols et des milieux marins. Plusieurs solutions ont alors été mises en place pour réduire leur impact sur l'environnement. Par exemple, il a été donné une nouvelle vie à ces polymères par recyclage pour la fabrication de nouveaux matériaux ou encore en valorisant le produit par incinération afin de produire de l'énergie (Figure 3). Cependant, la première méthode se heurte aux difficultés de tri et de nettoyage des matières rejetées. La valorisation énergétique par incinération se confronte quant à elle à la nécessité du retraitement des fumées, en particulier pour les plastiques contenant des halogènes ou du soufre et à la réduction des émissions de dioxyde de carbone issu de matières carbonées fossiles.

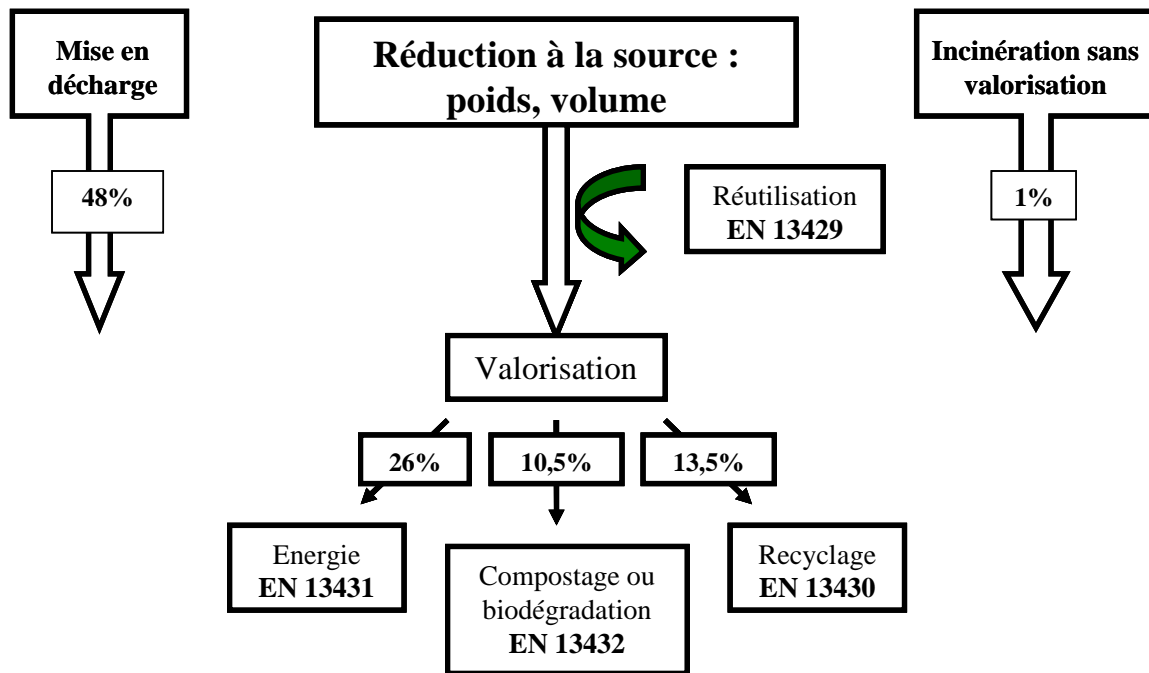


Figure 3 . Réduction de l'impact des emballages plastiques sur l'environnement (EN 13429 à 13432 sont des numéros correspondant à ceux des normes européennes (EN) concernant la réutilisation et la valorisation des déchets d'emballages plastiques). Les chiffres sont ceux des statistiques de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) pour l'année 2006.

De nombreux travaux de recherche tendent à développer une alternative visant la minimisation des quantités de matières plastiques non dégradables en les substituant par des polymères biodégradables. L'utilisation des biopolymères à base de ressources renouvelables doit viser l'obtention non seulement d'un produit biodégradable mais aussi d'un plastique à faible coût. Plusieurs normes ont fixé des méthodes pour évaluer la biodégradabilité des matériaux plastiques avant leur mise sur le marché. En revanche, les performances des emballages à base de biopolymères restent très inférieures à celle des emballages synthétiques notamment au niveau de leurs propriétés mécaniques et barrière aux gaz.

Objectif de ce travail

L'utilisation de l'amidon dans le domaine de la plasturgie a connu un grand essor ces dernières années dans l'objectif de substituer les polymères d'origines synthétiques. Cependant, l'obtention de l'amidon nécessite le passage par plusieurs étapes d'amidonnerie consommant beaucoup d'énergie et d'eau donnant naissance à une matière première plus chère (300-500 euros/tonne). Pour pallier cela, le projet « EMABIO » (Emballage Alimentaire Actifs et Biodégradable) labellisé par le pôle de compétitivité de la plasturgie Plastipolis a

choisi de développer un matériau d'emballage biodégradable à base de farine de maïs (105 euros/tonne) peu ou pas transformée. Il serait ainsi possible de proposer des matériaux à bas coût pour venir concurrencer les matériaux déjà commercialisés à base d'amidon purifié, au coût nettement plus élevé que celui d'une farine brute (selon la littérature, la farine de maïs est composée d'environ 80 % d'amidon, 11 % de protéines (la zéine est la protéine majoritaire de l'endosperme de maïs) et de 9 % de cellulose ([Argos et al., 1982](#))).

Le projet EMABIO a eu pour objectifs principaux :

- ✓ d'obtenir des matériaux biodégradables à base de farine de maïs et d'améliorer leurs propriétés mécaniques en jouant sur le couple formulation/procédé.
- ✓ de comparer les méthodes normalisées d'évaluation de la biodégradabilité aérobie ou anaérobie avec des tests de dégradabilité par des enzymes amylolytiques pour des matériaux à base d'amidon.

Ce projet collaboratif a associé un ensemble de partenaires industriels pour répondre à ces objectifs ([figure 4](#)):

- La société **Cérégrain** qui a fourni la matière première. Elle commercialise des produits transformés à base de céréales.
- Les entreprises **Clextral**, **MPR Polymères**, **ROVIP** et **Plastique RG** qui sont respectivement une entreprise spécialisée dans le domaine de l'extrusion en particulier des produits céréaliers, une société spécialisée de compoundage (le compoundage est un procédé permettant le mélange par fusion de matières plastiques et d'additifs) et des entreprises de la plasturgie spécialistes de l'injection soucieuses d'innover pour diversifier leur production.

Pour compléter ce partenariat industriel, des partenaires scientifiques et techniques ont été associés à ce projet :

- Le Pôle Européen de Plasturgie (PEP) qui est un centre technique intervenant à tous les stades (formulation, extrusion et injection), de la phase de recherche, en passant par l'étape de validation, jusqu'au produit fini.
- L'Unité Mixte de Recherche INRA-Université de Reims Champagne Ardennes Fractionnement des Agro-Ressources et Emballage (UMR FARE) qui a pour mission la production de granulés ciblés pour le thermoformage et l'optimisation du procédé.
- Le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (LRGIA) de l'Université Claude Bernard Lyon 1 qui a pour objectifs l'évaluation de la biodégradabilité des matériaux développés en fonction du couple formulation-procédé d'élaboration et

l'élaboration de matériaux antimicrobiens. Pour l'évaluation de la biodégradabilité, le LRGIA a fait appel au LGCIE qui est spécialisé dans le domaine de l'évaluation de la biodégradabilité et de l'impact environnemental des déchets industriels.

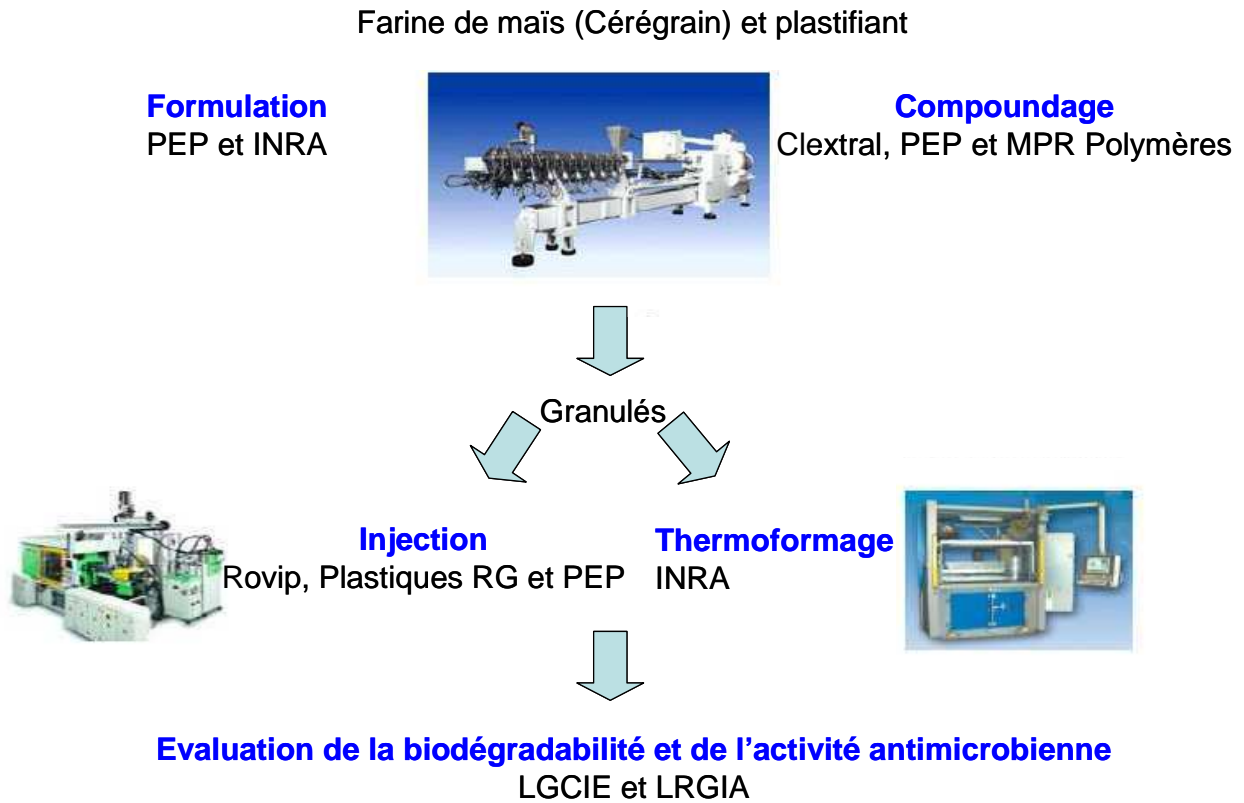


Figure 4 : Schéma représentant les différents partenaires impliqués dans le projet EMABIO et leurs missions.

Dans le cadre de ce projet, deux thèses ont été préparées :

- Une thèse réalisée au sein de l'UMR-FARE à Reims a porté sur les matériaux à base de biopolymères du maïs : interactions amidon-eau-plastifiant et fibres cellulosiques
- Une seconde réalisée au LRGIA a constitué le cadre de ce travail de thèse. Elle a eu pour objectifs de comprendre dans un premier temps comment le couple formulation-procédés influence les propriétés physico-chimiques des matériaux à base de farine de maïs et dans un second temps d'étudier les différents paramètres jouant un rôle dans la susceptibilité de la farine de maïs à l'hydrolyse enzymatique en fonction du taux de déstructuration, du taux de plastifiant et de la taille des particules. Finalement, l'estimation de la biodégradabilité des matériaux a été évaluée en utilisant différentes méthodes normalisées. Ces tests normalisés ont permis d'évaluer la biodégradabilité aérobie en milieu liquide ou solide (compost) et la

biodégradabilité par voie anaérobie en milieu liquide afin d'essayer de comprendre comment le couple formulation-procédé influence la cinétique de la biodégradation de ces matériaux. La réalisation de la plupart de ces tests nécessite des durées longues (plusieurs semaines à plusieurs mois). Il est donc intéressant d'évaluer leur corrélation avec les cinétiques d'hydrolyse par des enzymes dégradant de façon spécifique les principaux biopolymères constituant et structurant ces matériaux (l'amidon, la cellulose et les protéines de la farine de maïs).

Les aspects concernant l'élaboration de matériaux antimicrobiens à base de farine de maïs étant moins aboutis, ils seront simplement évoqués au niveau de la partie consacrée aux perspectives de ces travaux de thèse. En cohérence avec ce choix, la bibliographie très abondante sur le sujet des emballages antimicrobiens n'est donc pas présentée au niveau de la synthèse bibliographique qui est donc centrée sur les matériaux biodégradables et leurs propriétés physico-chimiques en focalisant sur les matériaux contenant de l'amidon, le composant majeur de la farine de maïs.

Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres :

Le premier chapitre sera consacré à l'étude bibliographique sur les différents biopolymères utilisées pour la synthèse d'emballages biodégradables et leurs propriétés. Etant donné que les matériaux à base de farine de maïs élaborés dans le cadre de ce travail sont essentiellement composés d'amidon, une grande partie sera dédiée à sa composition, sa structure, ses propriétés et sa mise en œuvre.

Le deuxième chapitre présentera les différents matériels et méthodes employés dans cette étude.

Le troisième chapitre s'intéressera à l'étude des propriétés physico-chimiques, la susceptibilité de l'amidon à l'hydrolyse enzymatique et la biodégradabilité des matériaux à base de farine de maïs. Il va être divisé en trois parties :

- La partie I concernera la compréhension de l'effet du couple formulation/procédé sur les caractéristiques physico-chimiques des matériaux à base de farine de maïs et de glycérol.

- La partie II présentera les différents facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique des matériaux à base de farine de maïs. L'effet du traitement thermomécanique et de l'aire spécifique des matériaux sur la cinétique d'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques sera notamment mis en évidence. Un cocktail d'enzymes spécifiques de l'amidon et des protéines a été employé pour comprendre la relation entre la déstructuration-structuration (provoquée par le traitement

thermomécanique) de la farine de maïs et la sensibilité de l'amidon de la farine de maïs à l'hydrolyse par des enzymes amylolytiques.

- La partie III sera consacrée à l'évaluation de la biodégradabilité des matériaux à base de farine de maïs par des tests normalisés. Un objectif de cette partie est d'étudier la relation entre la cinétique de biodégradation en milieu aérobie liquide ou solide et anaérobie et les conditions d'élaboration (couple formulation-procédé) de ces matériaux.

Les matériaux à base de farine de maïs ne manqueront pas de présenter certaines faiblesses des matériaux à base d'amidon pur : (i) un caractère fortement hygroscopique, (ii) des performances mécaniques limitées, (iii) et une évolution au cours de la conservation des matériaux qui peut être reliée pour partie à la rétrogradation de l'amidon. L'élaboration des matériaux constitués de mélange de la farine de maïs et de polyester sera une voie possible pour améliorer les propriétés mécaniques, réduire le caractère hygroscopique et ralentir le phénomène de vieillissement.

Le quatrième chapitre s'intéressera à l'étude des propriétés physico-chimiques des mélanges farine de maïs-glycérol-polybutylène succinate (PBS) en fonction du taux de PBS ajouté dans la formulation. Des hydrolyses enzymatiques de ces matériaux par des enzymes amylolytiques et une lipase ont été menées dans le but de comprendre la relation entre le taux de PBS et par conséquent la morphologie et la cristallinité du PBS sur la sensibilité de l'amidon à l'hydrolyse enzymatique. En parallèle, la cinétique de biodégradation de ces matériaux sera évaluée par des tests normalisés dans différents milieux liquide ou solide par voie aérobie ou anaérobie afin d'évaluer la corrélation entre le taux de PBS et la biodégradabilité de ces matériaux.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I. Introduction

A l'heure actuelle, les matières plastiques sont utilisées dans plusieurs secteurs (l'automobile, l'emballage, le bâtiment, la cosmétique, le biomédical, la pharmacie...) (tableau 1). L'amélioration de la qualité des matériaux plastiques est un sujet qui occupe actuellement un grand nombre de chercheurs et de plasturgistes. C'est dans cette optique que s'inscrivent les différentes recherches pour obtenir de nouveaux matériaux performants et mieux adaptés aux besoins et aux exigences de la société tout en préservant l'environnement. Ces recherches ont permis le développement de matières plastiques à base de polymères biodégradables pouvant remplacer des matériaux à base de pétrole non biodégradables.

Tableau 1 : Les principaux secteurs d'utilisation des matériaux plastiques (Revue de l'industrie française de l'emballage, 2008).

Secteurs	Part du tonnage français des matériaux plastiques employés par secteur
Emballage	25%
Bâtiment	21%
Industrie électronique et électrique	15%
Divers	11%
Colles, peintures, vernis	10%
Industrie automobile	7%
Ameublement	5%
Agriculture	4%
Articles ménagers	3%

II. Les polymères biodégradables

Il existe plusieurs types de polymères revendiquant la propriété de biodégradabilité que l'on peut classer selon leurs origines (figure 5):

- Les polymères synthétiques d'origine fossile issus de la pétrochimie ;

- Les polymères d'origine naturelle, issus des agro-ressources ou synthétisés par des microorganismes ;
- Les polymères composites (mélange de polymères différents).

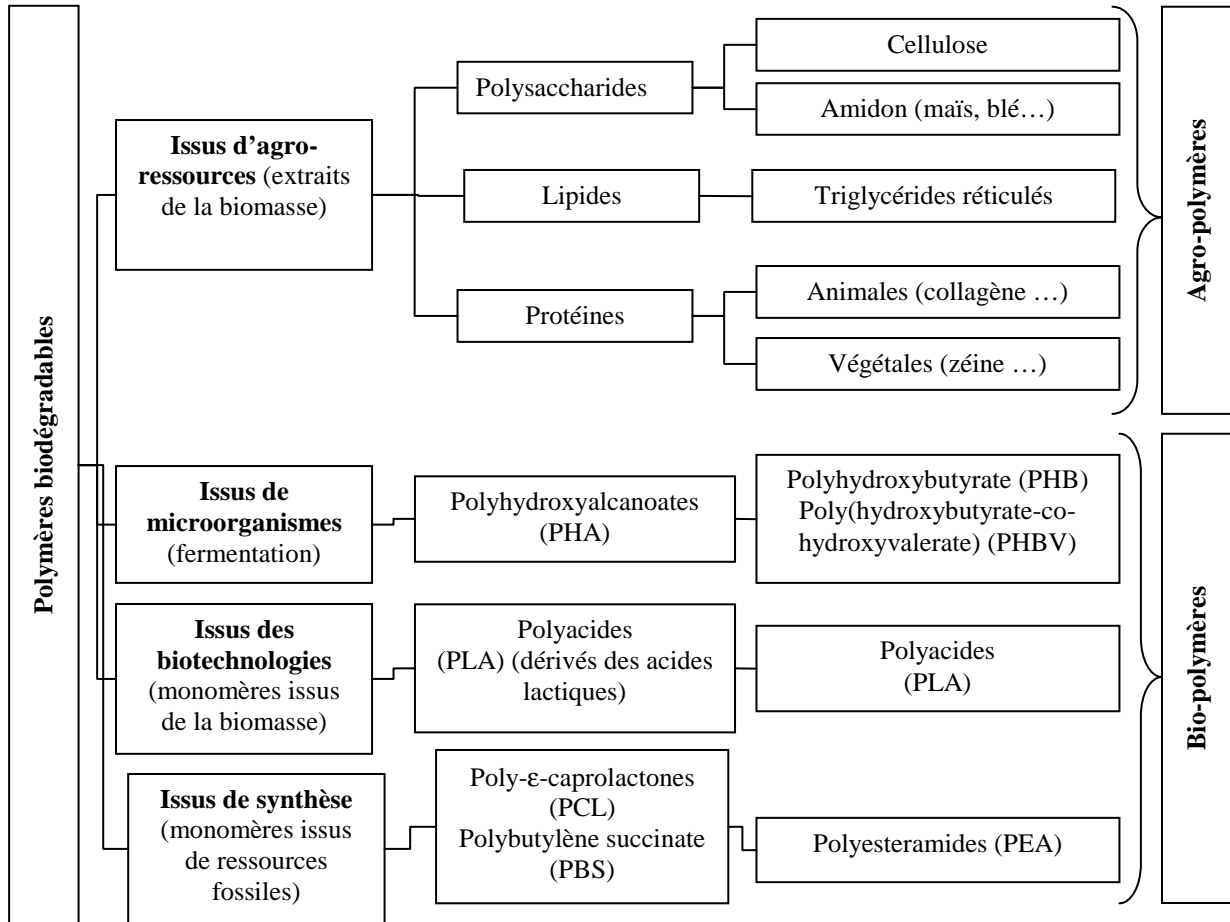


Figure 5. Classification des polymères biodégradables (Avérous, 2004).

II.1. Polymères synthétiques d'origine fossile issus de la pétrochimie

Les premiers développements de ces matériaux datent du début des années 70. Il s'agissait de développer des matériaux polymères combinant les bonnes propriétés des matériaux polymères conventionnels (ex : PVC, PET...) et la propriété d'être dégradés par les microorganismes. Parmi une large gamme de ces produits, on cite le PCL qui est très utilisé dans la littérature et le PBS qui va être utilisé dans cette étude.

II.1.1. Le poly(ϵ -caprolactone) PCL

Le Poly(ϵ -caprolactone) est obtenu par polymérisation du ϵ -caprolactone extrait à partir du pétrole. Ce polymère linéaire possède une propriété caoutchoutique à température ambiante et sa température de transition vitreuse est d'environ $-61\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le PCL est semi-cristallin, relativement hydrophobe et sa température de fusion est de l'ordre de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Avérous, 2004; Bastioli *et al.*, 1998).

II.1.2. Les polyesters aliphatiques : exemple du poly(butylène succinate) (PBS)

Le PBS (figure 6) appartient à la famille des polyesters aliphatiques, il est obtenu par polycondensation du 1,4-butanediol avec le diméthyle succinate (Taniguchi *et al.*, 2002). La synthèse du PBS se fait en deux étapes : une esterification suivie d'une polycondensation. Le polybutylène succinate est un polymère cristallin de couleur blanche et sa température de fusion est comprise entre 90 et $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sa température de transition vitreuse varie de -10 à $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ et sa masse moléculaire est d'environ 53000 Da . Il est principalement commercialisé sous le nom de Bionolle[®] par la société Showa High Polymer au Japon (Avérous, 2004).

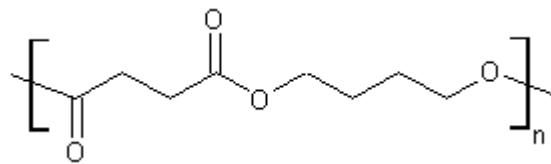


Figure 6 : Formule chimique du PBS (Shah *et al.*, 2008).

L'acide succinique (figure 7), nommé aussi acide butanedioïque, est un dérivé du pétrole utilisé pour la synthèse du PBS et du PBSA (Polybutylène Succinate Adipate). Récemment, plusieurs industriels (DSM et Roquette Frères) se sont intéressés à la production de cet acide en utilisant des matières premières renouvelables à faible coût. L'acide succinique bio-sourcé peut ainsi être obtenu par fermentation de la biomasse (canne, betterave à sucre, maïs, blé...).

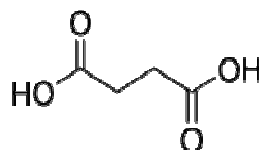


Figure 7 : Formule de l'acide succinique.

Le 1,4 butanediol est constitué d'une chaîne de butane portant deux groupements hydroxyle à chaque extrémité (figure 8). Il est obtenu par hydrogénation du but-2-yne-1,4 diol ou par hydrogénation en phase vapeur des esters et des anhydres des acides maléique et succinique.



Figure 8: Formule du 1,4 butanediol.

Des travaux ont montré que la biodégradabilité du PBS est influencée par la proportion d'unités butylène succinate. Pour une concentration élevée en butylène succinate, les microorganismes dégradent difficilement le PBS (Ahn *et al.*; 2001, Zhao *et al.*, 2005). En revanche, une meilleure dégradation a été observée dans un environnement liquide à pH 10,6 sans microorganismes (Ahn *et al.*, 2001). Une autre étude a montré qu'un taux de dégradation de 30% est atteint après 30 jours d'enfouissement du PBS dans du compost (Liu *et al.*, 2009). D'après les résultats obtenus par Doi *et al.* (1992), le PBS est facilement dégradable par hydrolyse enzymatique par des poly-(hydroxybutyrate) dépolymérase et par des lipases qui sont capables de rompre les liaisons esters en libérant le 4-hydroxybutyl succinate, des traces de l'acide succinique et du 1-4 butane diol.

II.2. Polymères d'origine naturelle

Les polymères naturels appelés aussi biopolymères sont issus de plantes, des microorganismes et des animaux. Selon l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie), ils peuvent être classés en deux grandes familles :

II.2.1. Les biopolymères synthétisés par des microorganismes

Plusieurs polyesters aliphatiques ayant des propriétés comparables aux plastiques conventionnels ont été développés ces dernières années. Ces polymères sont obtenus principalement par fermentation bactérienne. Il s'agit d'une synthèse « *in situ* » de polymères qui s'accumulent dans le cytoplasme de certaines bactéries mises en culture. Les matières premières fermentescibles sont principalement les sucres et l'amidon. Parmi ces polymères, les plus connus sont le PHB (PolyHydroxyButyrate), le PHV (PolyHydroxyValérate), et le PHBV (3-PolyHydroxyButyrate 3-HydroxyValérate) (Tokiwa *et al.*, 2004).

II.2.2. Les biopolymères issus des agroressources

Les agro-polymères sont issus principalement des plantes. Cette famille de polymères regroupe la lignine, les protéines et les polysaccharides. A cause de leurs propriétés hydrophiles, ils ne peuvent pas être utilisés seuls et sont souvent mélangés avec d'autres polymères plus hydrophobes.

a. La lignine :

La lignine est un polymère aromatique amorphe. Sa structure dépend de la ressource botanique. Elle est souvent associée avec la cellulose donnant naissance à un polymère composite dont la matrice est composée de lignine renforcée avec des fibres de cellulose (Avérous, 2004).

b. Les protéines :

Au début du XX^{ème} siècle, les protéines d'origine végétale ou animale (tableau 2) sont devenues très intéressantes en tant que matières premières pour la fabrication des films ou des matériaux plastiques (Guilbert et Biquet, 1986). La mise en œuvre des matériaux à base de protéines repose sur la formation d'un réseau macromoléculaire continu. Des études ont montré que les protéines de masse moléculaire élevée présentent des propriétés filmogènes intéressantes. Cependant, les protéines globulaires doivent être dépliées avant la formation d'un réseau (Guilbert et Graille, 1994).

Avoir un matériau à base de protéines nécessite l'ajout d'un plastifiant entraînant généralement une diminution de sa résistance, de sa rigidité et de ses propriétés barrières. Les propriétés mécaniques de ce type de matériau dépendent essentiellement de la distribution et de l'intensité des interactions intra-, et inter-protéiques d'une part et d'autre part avec d'autres constituants comme les lipides qui jouent un rôle dans la stabilité du réseau protéique (Farnum *et al.*, 1976).

Tableau 2 : Les différents types de protéines utilisées pour la fabrication de bioemballages

Protéines	Poids moléculaire (kDa)	Références
Gluten de blé	30-80	Sosulski et Imafidon (1990)
Zéine de maïs	21-25	Sosulski et Imafidon (1990)
Protéines de soja	185	Blodwell et Hopkins (1985)
Protéines d'arachide	330	Blodwell et Hopkins (1985)
Protéines de coton	10-25	Defromont (1985)
Kératine	10	Fraser <i>et al.</i> (1972)
Collagène	300	Veis (1964)
Caséines	19-25	Sosulski et Imafidon (1990)
Protéines de lactosérum	18	Braunitzer <i>et al.</i> (1972)
Gélatine (type A)	3-200	Rose (1987)

c. Les polysaccharides :

Ce groupe de biopolymères est représenté principalement par l'amidon et la cellulose qui sont des polymères composés d'un enchaînement de molécules de glucose.

- La cellulose : La cellulose est un long polymère linéaire constitué de résidus de D-glucose dans lequel les molécules de glucose sont liées entre elles par des liaisons glucosidiques β -(1-4) (Figure 9). Le degré de polymérisation varie de quelques centaines à quelques milliers selon l'origine botanique de la plante. Les chaînes de cellulose sont associées par des liaisons hydrogènes et des forces de van der Waals et forment des structures solides ordonnées (Odiar, 1985). La partie amorphe est d'environ 15% de la microstructure de la cellulose alors que la fraction cristalline est variable selon l'origine de la cellulose (Balley, 1986).

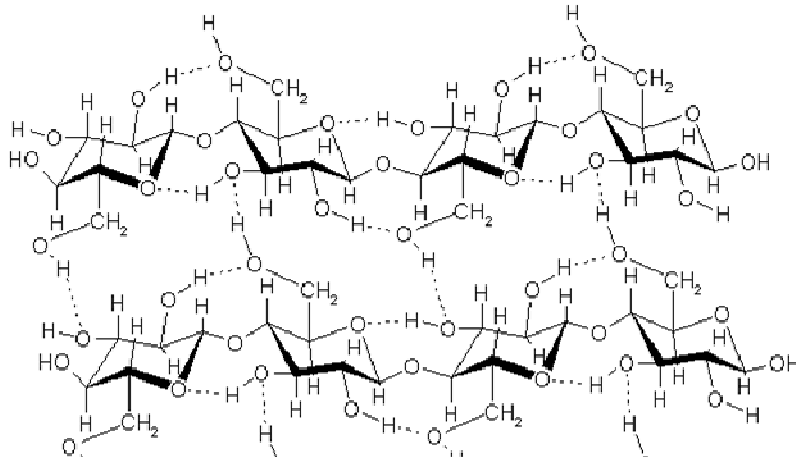


Figure 9 : La structure de la cellulose

L'amidon : L'amidon constitue l'élément majeur des glucides du grain de maïs (72-73%) (Watson, 1991). Il est composé de deux macromolécules nommées amylopectine et amylose. La composition de l'amidon varie considérablement selon l'origine botanique de la plante (Avérous, 2004). Généralement, l'amidon de maïs contient 25-30% d'amylose et 70-80% d'amylopectine. Ce dernier a une structure ramifiée contrairement à l'amylose qui se présente sous une forme linéaire.

L'amylopectine est un polymère composé de molécules de glucose liées en $\alpha(1-4)$ avec des ramifications assurées grâce à des liaisons $\alpha(1-6)$ (5-6%) toutes les 20 unités de glucose (Gaspar *et al.*, 2005) (figure 10). La masse moléculaire de l'amylopectine est de l'ordre de 10^6 à 10^8 g.mol^{-1} (Bello-Pérez *et al.*, 1998). Généralement, il y a deux types de chaînes dans l'amylopectine : des chaînes courtes (de degré de polymérisation (DP) d'environ 15) et des chaînes plus longues (DP d'environ 45). Contrairement à l'amylose, l'amylopectine est insoluble dans l'eau bouillante (Chandra *et al.*, 1998).

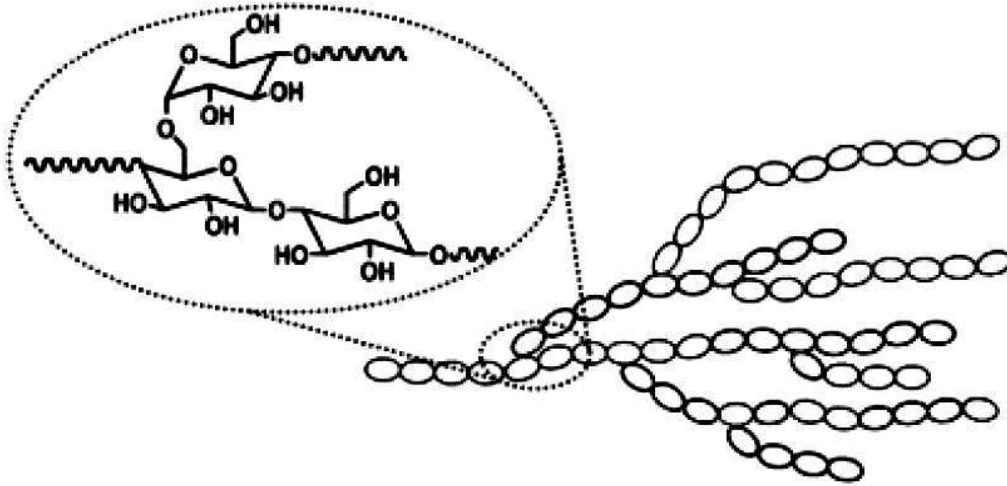


Figure 10 : Structure de l'amylopectine.

L'amylose est un polymère cristallin composé d'un enchaînement linéaire de molécules de glucose (600 à 1000 molécules) liées en α (1-4) (figure 11). Il a une masse molaire moyenne de 10^5 à 10^6 g.mol^{-1} et un DP compris entre 300 et 500 (Suortti *et al.*, 1998). Les unités glycosidiques sont organisées selon une forme hélicoïdale, avec six unités par tour d'hélice. Grâce à cette structure, l'amylose est capable de former un complexe avec différents composés comme les lipides, les alcools et l'iode. La quantité d'amylose dans l'amidon peut être déterminée en se basant sur la formation du complexe amylose-iode (Hayashi *et al.* 1981). Dans le complexe amylose-lipide, l'amylose forme deux à trois tours d'hélice entourés de la partie non polaire des lipides (Hayashi *et al.* 1981).

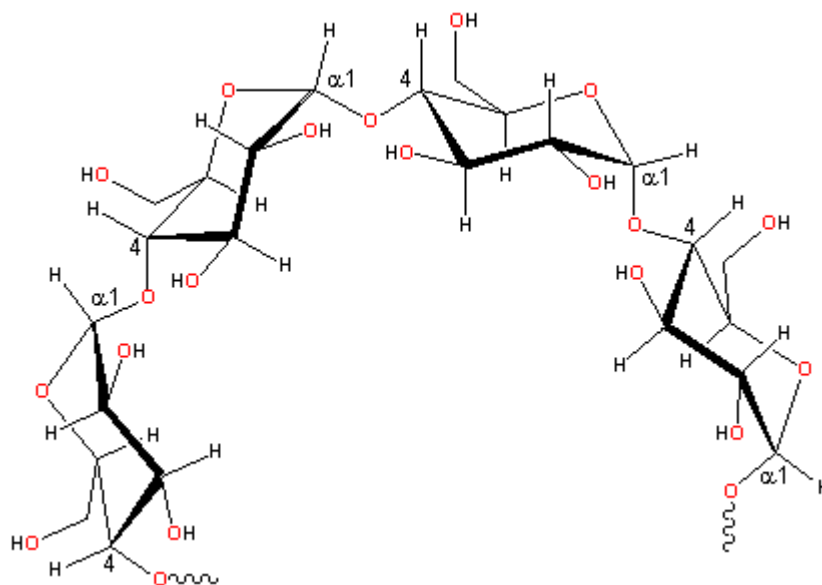


Figure 11 : Structure de l'amylose

La taille des grains d'amidon varie selon l'origine botanique (figure 12). Selon les images obtenues par microscopie électronique à balayage, la taille des grains d'amidon est comprise entre 0,5 et 175 μm (Avérous, 2004). Pour l'amidon de maïs, la taille varie de 1 à 7 μm pour les petites particules et de 15 à 20 μm pour les grandes (figure 13) (Sandhu *et al.*, 2004).

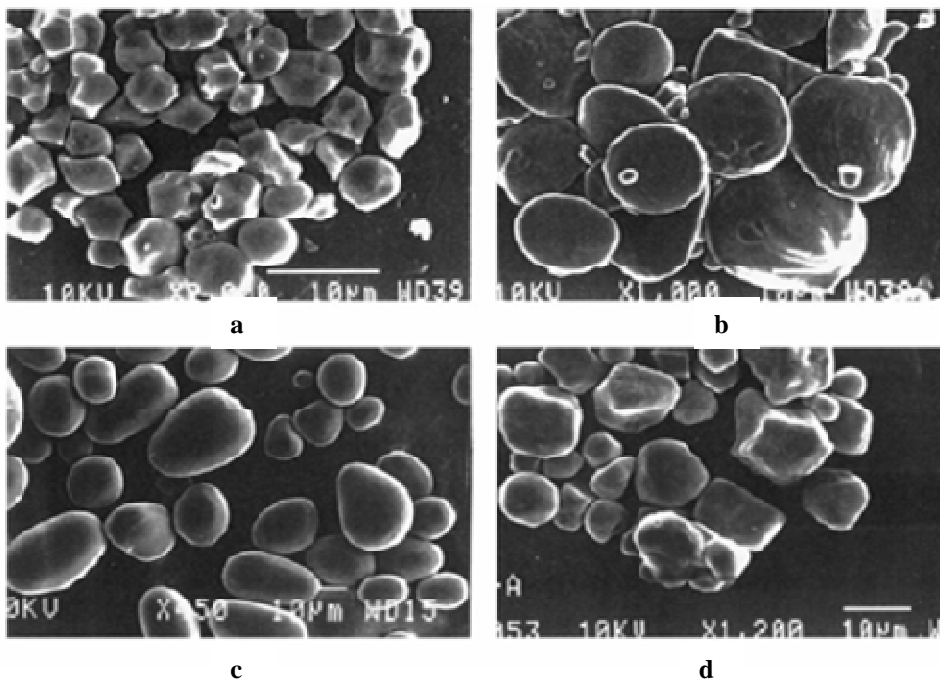


Figure 12 : Observations par microscopie électronique de grains d'amidon provenant de différentes sources : riz (a), blé (b), pomme de terre (c) et maïs (d) (Singh *et al.*, 2003).

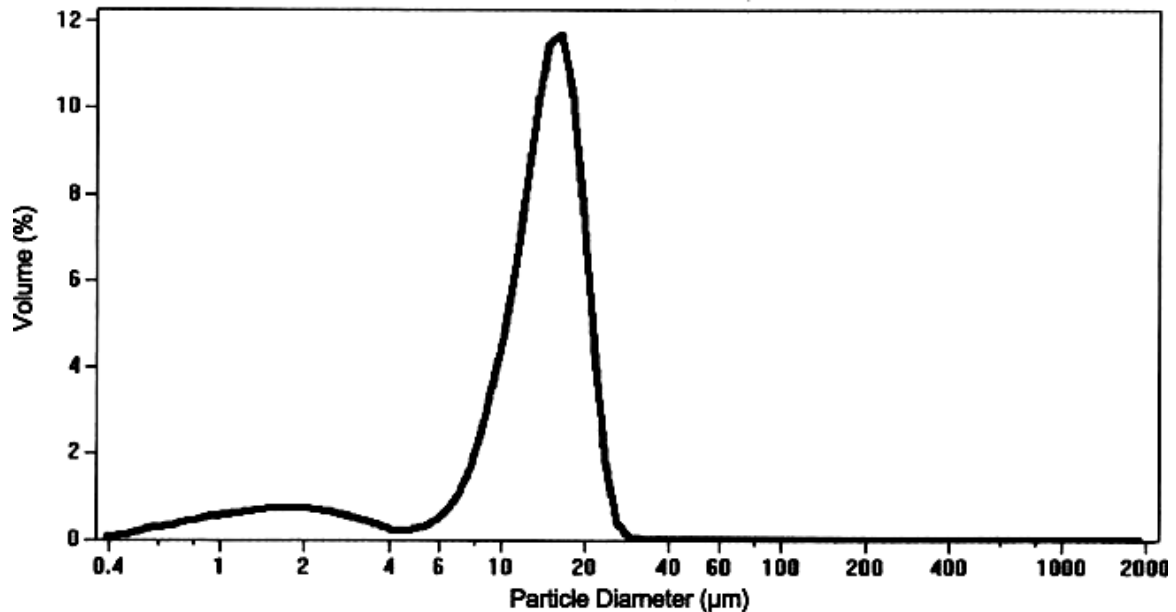


Figure 13 : Distribution de la taille des particules d'amidon de maïs (Sandhu *et al.*, 2004).

La microscopie électronique à balayage a également mis en évidence l'existence de pores au niveau de la surface des granules d'amidon de maïs, de sorgho, de blé, de seigle et d'orge (Fannon *et al.*, 1992). La taille de ces pores est comprise entre 0,1 et 1 µm (Helbert *et al.*, 1996). Fannon *et al.* (1993) ont montré que les pores sont ouverts sur des canaux de forme serpentine ayant un diamètre allant de 0,07 à 0,1 µm. Ces canaux relient la cavité interne (8 nm de diamètre) à l'environnement extérieur (Huber *et al.*, 1997). Cette cavité interne a été détectée par microscope optique et électronique au niveau de l'amidon de maïs et de sorgho (Hall *et al.*, 1970).

Concernant la forme physique, à l'état natif, l'amidon est semi-cristallin et présente généralement un degré de cristallinité compris entre 20 et 40% (Hizukuri *et al.*, 1996). Des observations au microscope électronique ont montré que l'amidon est constitué de couches concentriques dans les régions amorphes et semi-cristallines. L'amylopectine est située dans la région cristalline (figure 14) alors que ses ramifications sont dans la partie amorphe de l'amidon. En revanche, la plupart de l'amylose est localisée dans la zone amorphe (Jenkins *et al.*, 1995). L'analyse aux rayons X a montré que dans le grain d'amidon, le complexe amylose-lipide n'est pas cristallin mais il apparaît mieux ordonné que les ramifications de l'amylopectine (Morgan *et al.*, 1995). L'état cristallin de l'amidon dépend de sa teneur en eau et du traitement thermique qu'il subit (Cagiao *et al.*, 2003).

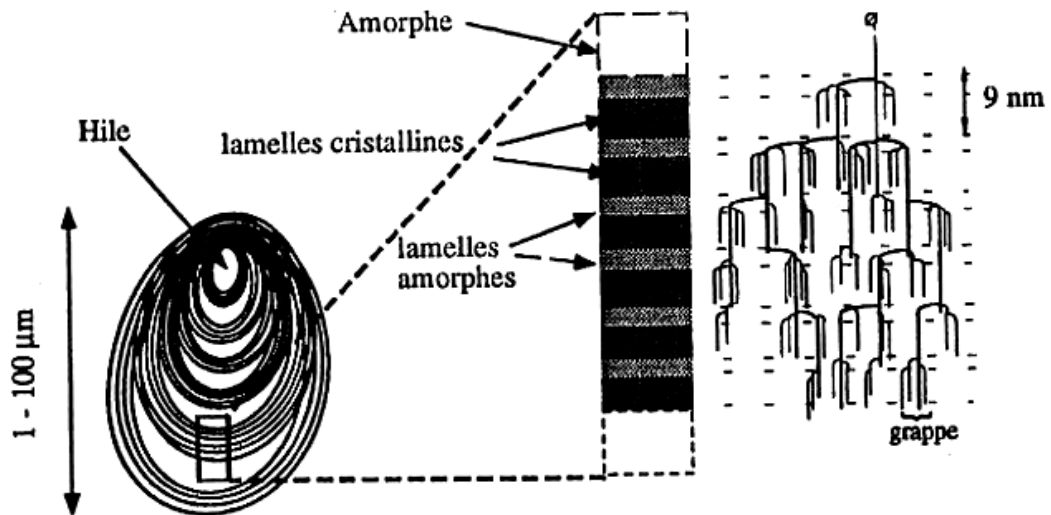


Figure 14 : Différents niveaux d'organisation au sein d'un grain d'amidon (Jenkins et Donald, 1995).

Le chauffage d'une suspension d'amidon à des températures entre 55 et 80 °C conduit à une gélatinisation de l'amidon qui est due à une pénétration de l'eau dans les grains (figure 15) (Ahromit *et al.*, 2007). Ce phénomène de gélatinisation se traduit par un gonflement des grains d'amidon, une augmentation de la viscosité et une diminution du degré de cristallinité (Arambula *et al.*, 1998). Une fois que le gonflement atteint son maximum, la rupture des grains commence ce qui engendre une diminution de la viscosité (Bertuzzi *et al.*, 2007). Pour des températures allant de 80 à 200 °C, le degré de polymérisation de l'amidon diminue progressivement. Les changements des propriétés de l'amidon durant la gélatinisation ont notamment été déterminés par des observations micro- et macro-scopiques, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la diffraction des rayons-X (Arambula *et al.*, 1998).

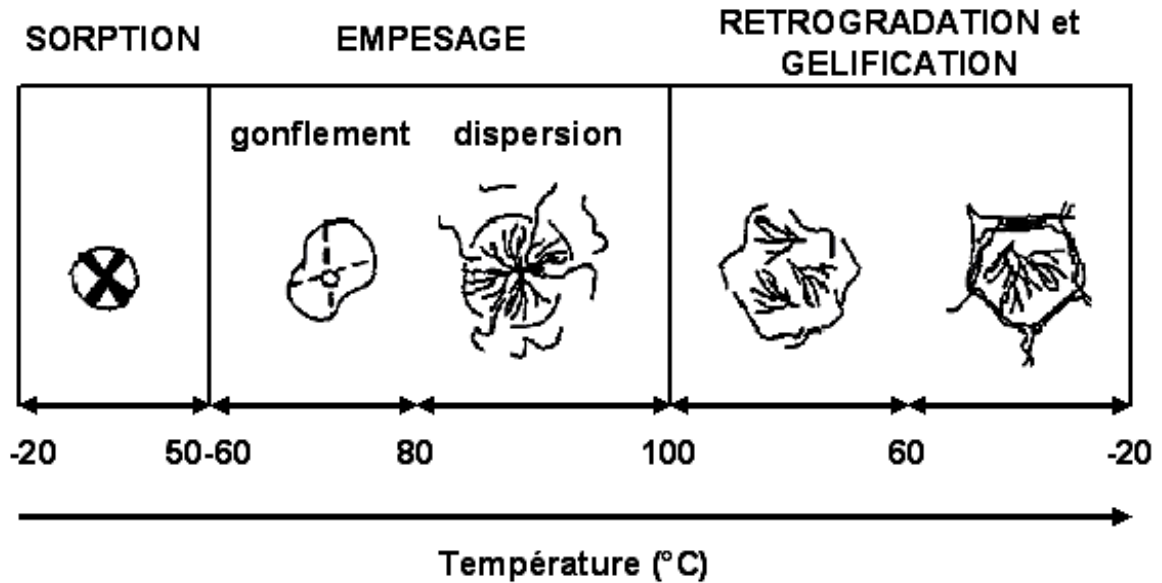


Figure 15 : Phénomènes intervenant au cours de la gélatinisation de l'amidon

L'ensemble des changements qui surviennent dans l'amidon gélatinisé lors du refroidissement s'appelle rétrogradation. Celle-ci est principalement due à une réassociation des macromolécules (figure 16). La rétrogradation est accompagnée par une augmentation du degré de cristallinité, une formation d'un gel ferme et un relargage d'eau (appelé synérèse) (Hoover *et al.*, 1995, 2010). Pour l'amylopectine, la rétrogradation implique une recristallisation complètement réversible. En revanche, la recristallisation de l'amylose est partiellement irréversible (Wu Yue, 2009).

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour évaluer le degré de rétrogradation des matériaux à base d'amidon (Karim *et al.*, 2000). La DSC, la turbidimétrie, la diffraction des rayons-X, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la microscopie électronique à balayage (MEB) permettent de mettre en évidence les changements survenus dans la structure de l'amidon suite aux traitements thermomécaniques (Karim *et al.*, 2000). Par exemple la DSC a permis d'avoir des informations sur la cristallisation de l'amylopectine et le changement de la mobilité de l'eau durant la rétrogradation de l'amidon. Il a été montré aussi que la rétrogradation de l'amylopectine est liée à la cristallisation des branches externes (DP 14-18) à des températures allant de 40 à 100 °C (Karim *et al.*, 2000).

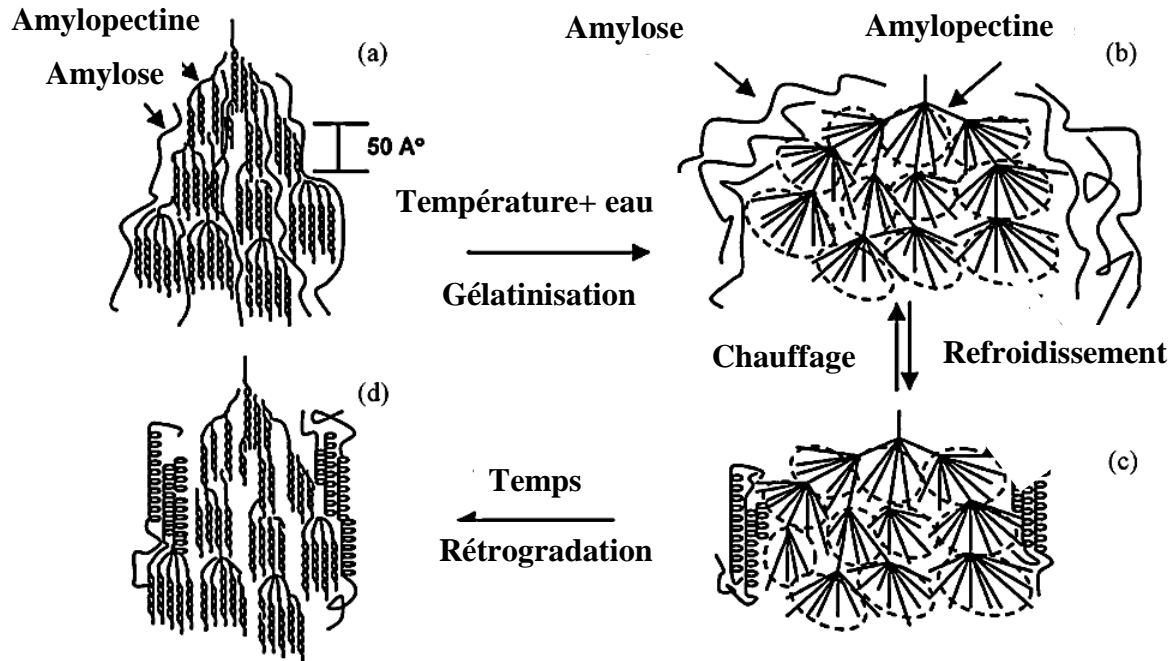


Figure 16 : Représentation schématique de la phase de transition de l'amidon durant le processus de chauffage et de vieillissement. (d'après Yu *et al.*, 2005)

III. Les matériaux uniquement à base d'amidon

III.1. Procédés d'élaboration des matériaux à base d'amidon

L'élaboration de matériaux à base d'amidon nécessite une déstructuration de sa structure granulaire. Dans ce but, deux méthodes ont principalement été développées afin d'obtenir un matériau homogène et dense en recourant à l'ajout de plastifiants. Ces deux méthodes se basent principalement sur la fusion des zones cristallines de l'amidon. Le choix de la technique est fondé sur la teneur en eau utilisée dans la formulation:

III.1.1. Le casting

Le casting est une technique qui nécessite l'utilisation d'un excès d'eau dans la formulation. Elle permet l'obtention des films par chauffage de l'amidon au-delà de sa température de gélatinisation (Lourdin *et al.*, 1997). A des teneurs faibles en eau, la fusion des zones cristallines est aussi possible mais en utilisant d'autres techniques plus puissantes comme l'extrusion.

III.1.2. L'extrusion

L'extrusion est un procédé de fabrication mettant en jeu un traitement thermomécanique lors du passage forcé de la matière le long d'une vis sans fin. Cette

technique est utilisée pour obtenir des matériaux thermoplastiques mais aussi dans l'industrie alimentaire pour obtenir des pâtes. En fonction de l'intensité et du type de contraintes thermomécaniques appliquées lors de l'extrusion, la matière subit des changements de structure et par conséquent de ses propriétés physiques.

Dans le cas des matériaux à base d'amidon, la contrainte thermomécanique appliquée lors de l'extrusion conduit à la gélatinisation de l'amidon et à la fragmentation des polymères (Chao-Chi *et al.*, 2004). D'autres études ont montré que l'augmentation de l'intensité du cisaillement provoque une diminution significative de la masse moléculaire et par conséquent la diminution de la viscosité intrinsèque de l'amidon (Willett *et al.*, 1997). De plus, Diosady *et al.* (1985) ont mis en évidence l'existence d'une corrélation du premier ordre entre la masse moléculaire de l'amidon et le degré de cisaillement employé lors de l'extrusion. L'augmentation de la température durant l'extrusion fait augmenter considérablement la solubilité des sucres dans l'eau, ce qui se traduit par une accélération de son hydrolyse enzymatique par l' α -amylase (Mercier *et al.* 1975).

L'amidon thermoplastique présente plusieurs avantages par rapport aux polymères synthétiques grâce à son caractère biodégradable. Cependant, sa sensibilité à l'eau et ses faibles propriétés mécaniques limitent son utilisation. Pour cela, de nombreux travaux ont été engagés pour améliorer ces propriétés en le mélangeant avec d'autres polymères synthétiques de type polyesters (Avérous, 2000). D'autres travaux ont montré que le mélange de 10% de PCL avec l'amidon thermoplastique n'améliore que peu les propriétés mécaniques mais augmente la résistance à l'eau et accélère sa biodégradation (Gaspar *et al.*, 2005). La même étude a montré qu'un mélange amidon-zéine donne de meilleures propriétés mécaniques.

L'amidon partiellement dépolymérisé, amorphe, est utilisé dans le domaine des matériaux plastiques en présence de plastifiants ou en mélange avec d'autres biopolymères ou polymères synthétiques. L'obtention de l'amidon thermoplastique nécessite sa déstructuration pour obtenir une phase amorphe (Avérous, 2004). La déstructuration des grains d'amidon peut être réalisée par voie chimique ou thermomécanique (extrusion). La transformation de granules semi-cristallins d'amidon natif en polymère plastique (figure 17) dépend des conditions d'extrusion (température, pression..) et du taux de plastifiants utilisé (eau, glycérol...) (Gaspar *et al.*, 2005). Après le traitement thermomécanique (extrusion), l'amidon perd une partie ou la totalité de sa cristallinité selon sa composition (amylose/amylopectine).

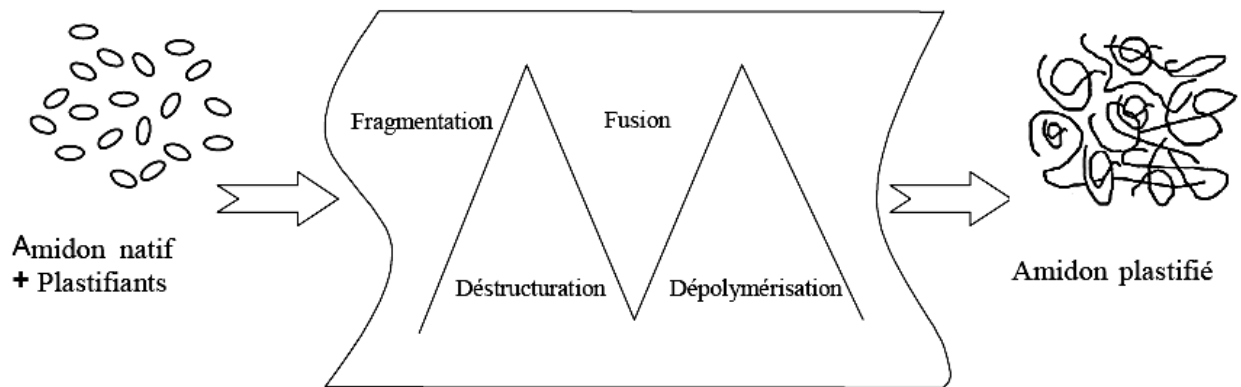


Figure 17 : Transformation de l'amidon natif en amidon plastifié (d'après Poutanen et Forssell, 1996).

III.2. Rôle des plastifiants

Un plastifiant est défini comme étant une substance incorporée dans un matériau pour augmenter sa maniabilité et sa flexibilité. L'addition du plastifiant à un autre matériau engendre des changements au niveau de ses propriétés physiques et mécaniques (figure 18). Son utilisation conduit dans la plupart des cas à une diminution de la contrainte à la rupture, du module d'élasticité et à l'augmentation de l'allongement à la rupture (Gontard *et al.*, 1993).

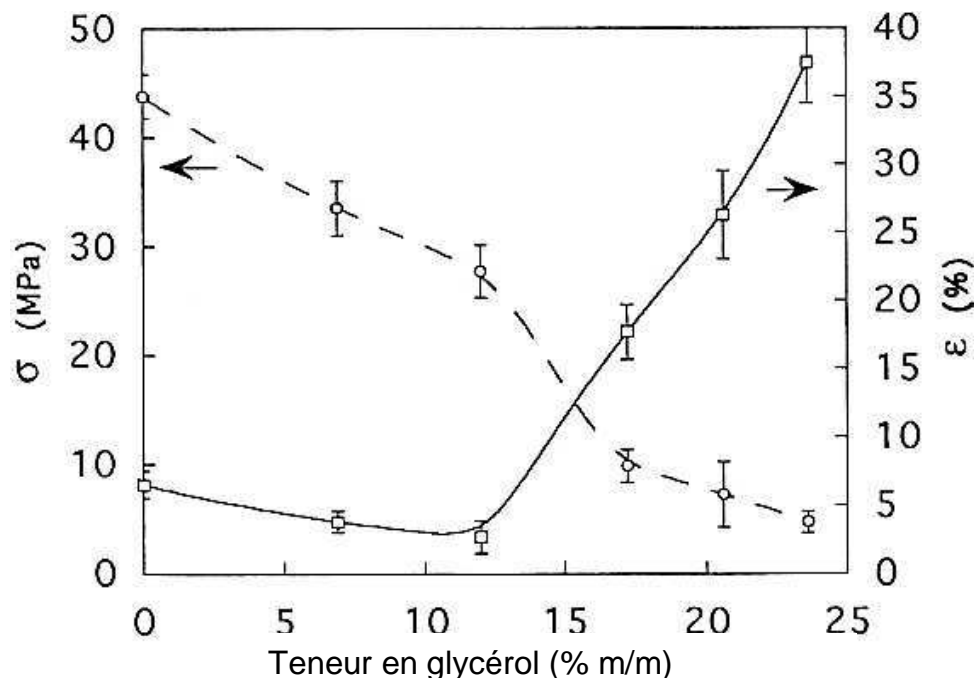


Figure 18 : Evolution de la contrainte maximale (\circ) et de l'allongement à la rupture (\square) de films d'amidon de pomme de terre plastifiés en fonction de la teneur en glycérol à 25°C (d'après Lourdin *et al.*, 1997).

Dans les systèmes alimentaires, l'eau est le principal agent plastifiant (Johari *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2004). La Tg d'une substance hydrophile (comme les glucides) diminue lorsque la teneur en eau augmente. Pour l'amidon, l'eau est le plastifiant le plus "efficace" (Van Soest *et al.*, 1996). Néanmoins, l'eau est un plastifiant volatil susceptible de s'évaporer lors de la mise en œuvre ou pendant le stockage des matériaux. Pour cela, d'autres plastifiants moins volatils sont utilisés comme les composés comportant des groupements hydroxyles. D'après la littérature, outre l'eau (Tomka *et al.*, 1991; Van Soeust *et al.*, 1996) et le glycérol (Lourdin *et al.*, 1997, 1998) qui est le plastifiant le plus utilisé, les glycols (Shogren *et al.*, 1992), les polyols comme le sorbitol (Gaudin *et al.*, 2000) ou le xylitol (Lourdin *et al.*, 1995), le fructose (Kalichevsky et Blanshard, 1993), des mélanges de maltose et de glycérol (Follin *et al.*, 2006) ou d'éthylènebisformamide et sorbitol (Yang *et al.*, 2006) ont également été employés.

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes d'action des plastifiants à l'échelle moléculaire (Verrier, 2005 ; Guilbert, 1999) (figure 19):

- La lubrification : l'insertion du plastifiant entre deux chaînes de polymères conduit à une réduction des interactions intermoléculaires.
- La théorie de Gels : le plastifiant empêche un certain nombre d'interactions intermoléculaires en masquant les centres de forces attractives du polymère.
- La théorie du volume libre : Le plastifiant augmente le volume libre d'un cristal en facilitant les mouvements des chaînes principales par introduction chimique dans ces chaînes de segments de faible encombrement stérique, donc de grande mobilité (plastification interne), en augmentant le nombre ou la longueur des chaînes latérales (plastification interne) et par insertion entre les chaînes d'un composé ayant une bonne affinité pour le polymère (plastification externe). Cette théorie permet d'expliquer la diminution de la température de transition vitreuse (Tg) d'un polymère suite à l'addition d'un plastifiant.

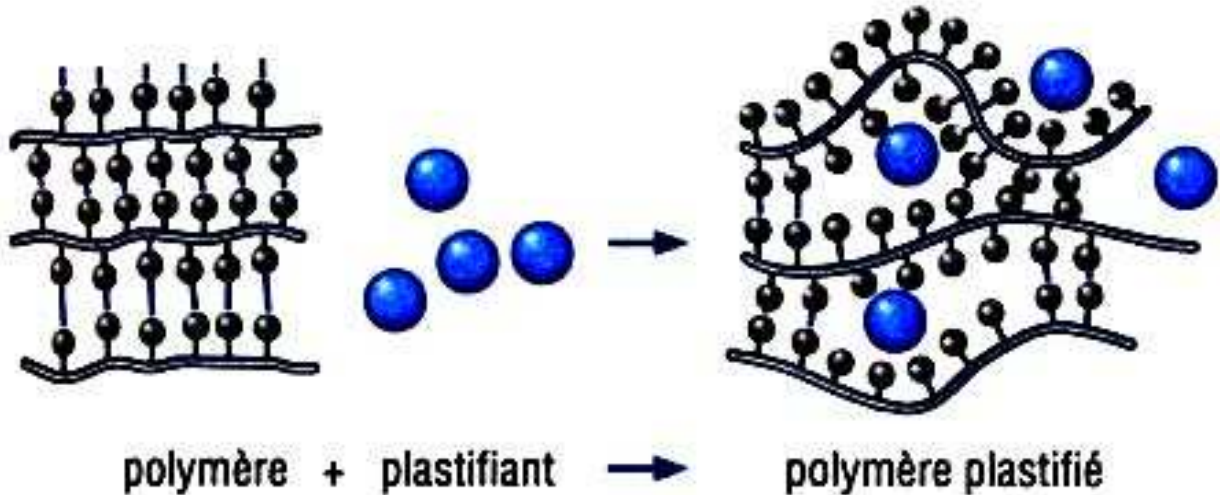


Figure 19 : Schématisation du mécanisme de plastification à l'échelle moléculaire (Trotignon *et al.*, 1996).

III.3. Interactions plastifiant-eau-amidon

Dans le cas de l'amidon, l'eau est toujours présente au sein du matériau et influence ses propriétés. On peut donc parler d'un système ternaire présentant différentes phases. Certaines études ont montré qu'à forte teneur en glycérol, il y a une apparition de domaines enrichis ou appauvris en glycérol (Lourdin *et al.*, 1997, 1998). Godbillot *et al.* (2006) ont proposé un diagramme de phase pour le système amidon/eau/glycérol en fonction de la teneur en plastifiants. Cette étude a permis de mettre en évidence les différentes interactions pouvant exister entre les trois composants du système amidon/eau/glycérol. D'après la [figure 20](#), le plastifiant peut se trouver sous différents états selon sa concentration et selon l'humidité relative. A faible teneur en humidité, le glycérol occupe les sites de sorption de l'amidon empêchant ainsi l'absorption d'eau. A forte humidité relative, le plastifiant se trouve libre car les sites de sorption sont saturés. En revanche pour des humidités relatives intermédiaires, les différents composés du système amidon/eau/glycérol interagissent entre eux.

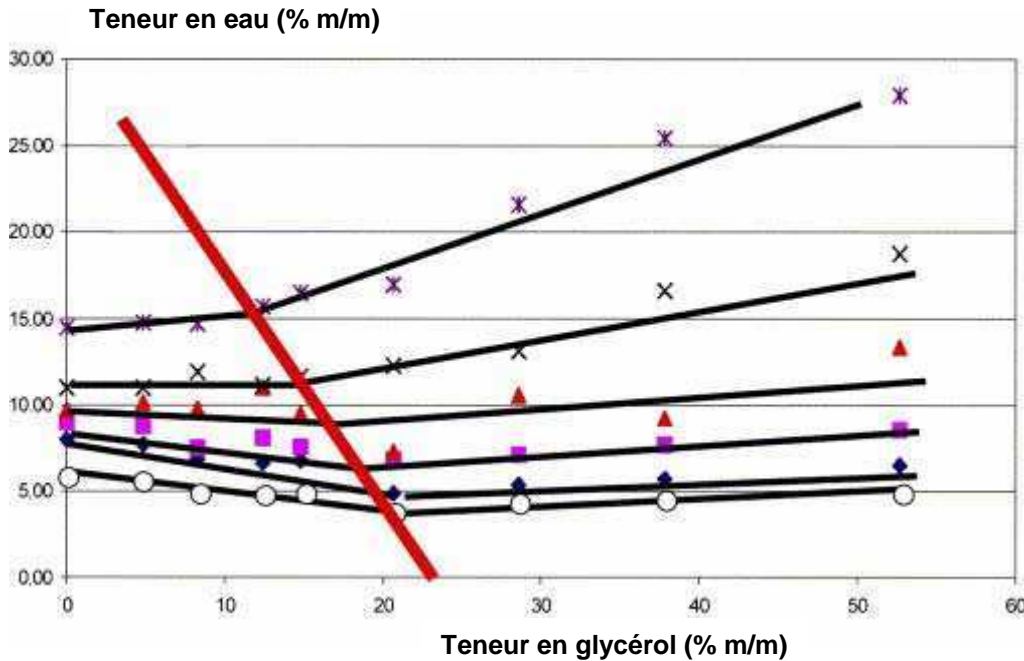


Figure 20 : Isothermes de sorption d'eau d'amidon de blé à 20°C en fonction de la teneur en glycérol à différentes humidités relatives (HR) (o 11% HR, ♦ 33% HR, □ 44% HR, Δ 58% HR, × 68% HR, *80%HR) d'après [Godbillot et al. \(2006\)](#).

III.4. Le vieillissement des matériaux à base d'amidon

En plus du taux de plastifiant utilisé, les propriétés mécaniques des matériaux à base d'amidon sont influencées par les conditions de stockage. Trois facteurs sont susceptibles de provoquer des modifications au niveau de la structure de l'amidon:

- La température
- Le temps
- L'humidité relative du conditionnement

L'amidon peut subir deux types de vieillissement en fonction de la température de stockage :

- Vieillissement physique ;
- Vieillissement par rétrogradation.

Plusieurs auteurs ont montré que le vieillissement physique pour des matériaux à base d'amidon se produit à des températures inférieures à la température de transition vitreuse (T_g) contrairement à la rétrogradation qui est observée à des températures supérieures à la T_g ([Kalichevsky et al., 1992](#)). Selon [Thiewes et al. \(1997\)](#), le phénomène de vieillissement physique de l'amidon est le même que celui observé dans le cas des polymères d'origine

synthétique. Cette évolution physique des matériaux est possible grâce à des mouvements locaux macromoléculaires permettant aux molécules de retourner vers leurs états d'équilibre. [Van Soest et al. \(1996\)](#) ont montré que le vieillissement physique se traduit par une diminution de l'élongation à la rupture et une augmentation de la rigidité.

Dans le cas où les matériaux sont stockés dans un environnement à forte humidité relative, la température de transition vitreuse se trouve au dessous de la température du lieu de stockage. Ces conditions provoquent la rétrogradation des matériaux à base d'amidon qui deviennent caoutchoutiques ([Smits et al., 2003](#)). Selon [Avérous et al. \(2003\)](#), la recristallisation (rétrogradation) dure plusieurs semaines avant la stabilisation. Comme pour le vieillissement physique, la rétrogradation est accompagnée par des changements au niveau des propriétés mécaniques provoqués par la formation de structures cristallines de type B ([Van Soest et al., 1996](#)).

De ces deux phénomènes de vieillissement résulte une densification ou une recristallisation conduisant à une diminution des propriétés mécaniques et à la rupture des matériaux à base d'amidon.

IV. Les mélanges à base d'amidon

L'amidon et les protéines (principalement la zéine) constituent respectivement 80 % et 11% de la farine de maïs. Il est donc particulièrement intéressant de présenter les résultats de travaux concernant l'élaboration de matériaux à base d'amidon de maïs et de zéine.

IV.1. Amidon-zéine

Pour le maïs, la zéine est la protéine majoritaire (60%) ([Lending 1989](#)). Elle appartient à la famille des prolamines et est divisée en 4 classes (α -, β -, γ -, et δ -zéine). L' α zéine représente 75 à 85% de la zéine. Grâce à son caractère hydrophobe, la zéine présente un grand intérêt dans les propriétés des films obtenus sans aucun plastifiant ([Lai et al., 1997](#)). Pour cette propriété, la zéine est mélangée avec de l'amidon pour réduire sa sensibilité à l'eau ([Habeych et al., 2008](#)). La zéine a été mélangée avec l'amidon à différents ratios (0-20%) afin d'étudier son influence sur les propriétés mécaniques du matériau obtenu par extrusion. L'augmentation du pourcentage de zéine dans le mélange conduit à une augmentation de la force d'élongation et à une diminution de la force de traction. De plus, l'augmentation de l'intensité de la contrainte mécanique (cisaillement) appliqué lors de l'extrusion améliore nettement la force de traction du mélange. Les observations en microscopie confocale montrent que l'utilisation d'un cisaillement fort conduit à une bonne dispersion et agrégation

des protéines (Figure 21) dans la matrice d'amidon ce qui diminue la fragilité du matériau causée par la non miscibilité de la zéine (Habeych *et al.*, 2008). L'incompatibilité entre l'amidon et la zéine a été observée à l'aide de la microscopie électronique à balayage (figure 22) par Habeych *et al.* (1996).

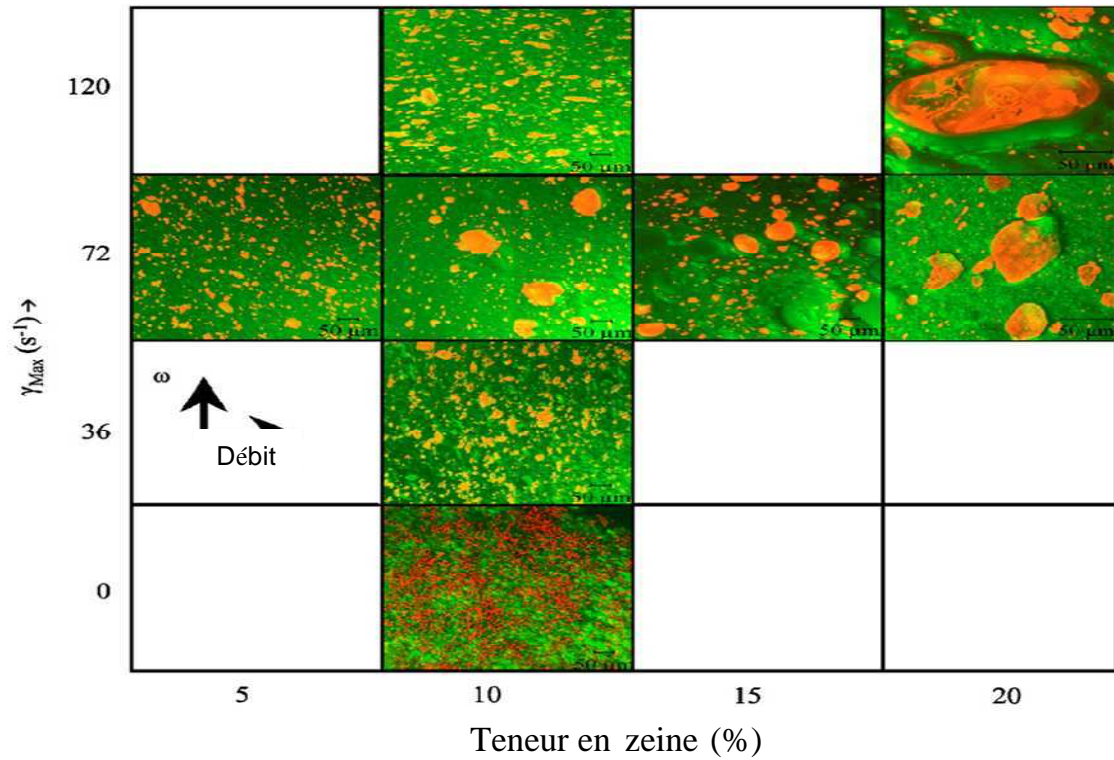


Figure 21: Observations en microscopie confocale à balayage laser de l'effet du taux de cisaillement et de la quantité de zéine (couleur orange) sur la morphologie de matériau amidon-zéine extrudés à 95°C (Habeych *et al.*, 2008).

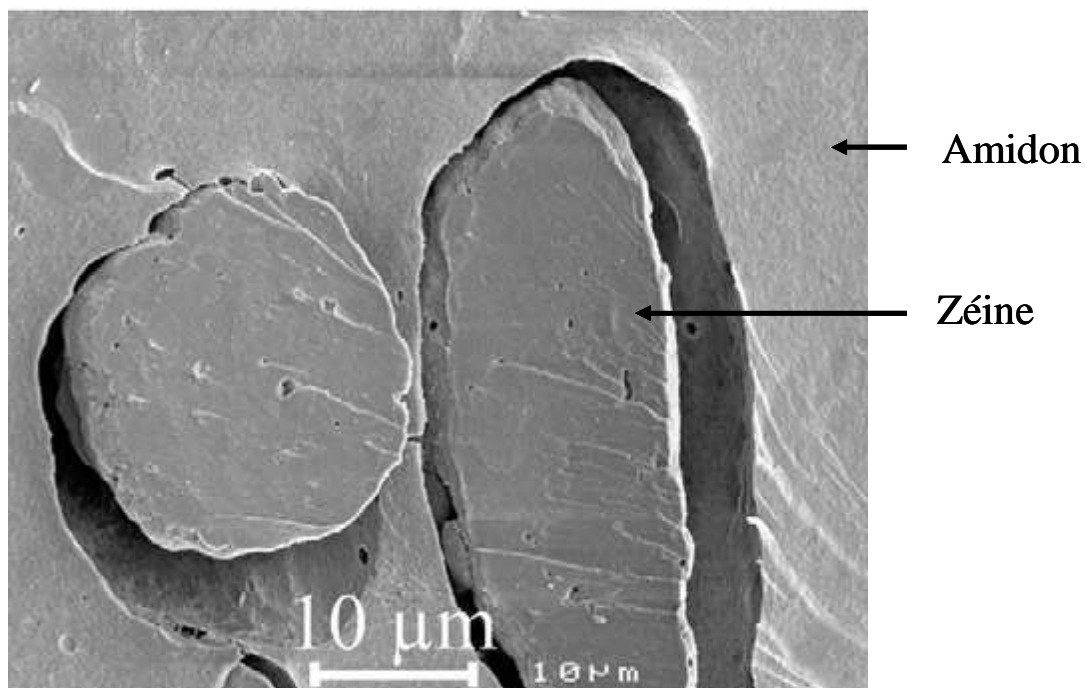


Figure 22: Observation en microscopie électronique à balayage du mélange amidon-zéine (90 :10) extrudé à 95°C ([Habeych et al., 2008](#)).

IV. 2. Amidon-polymères synthétiques

Des polymères composites attirent beaucoup d'attention ces dernières années grâce à leurs propriétés mécaniques, leur large utilisation et leur biodégradabilité ([Han and Yan, 2010](#)). Ce type de polymère est obtenu par un mélange de polymères synthétiques et de polymères naturels comme l'amidon et la cellulose.

IV.2.1. Amidon-PCL

Afin d'obtenir de bonnes propriétés mécaniques et d'avoir un matériau biodégradable, [Chen et al. \(2010\)](#) ont élaboré un matériau par extrusion d'un mélange amidon-PCL qui a montré une incompatibilité entre les deux polymères ([figure 23](#)). La présence majoritaire de l'amidon dans le matériau composite accélère significativement la dégradation du PCL.

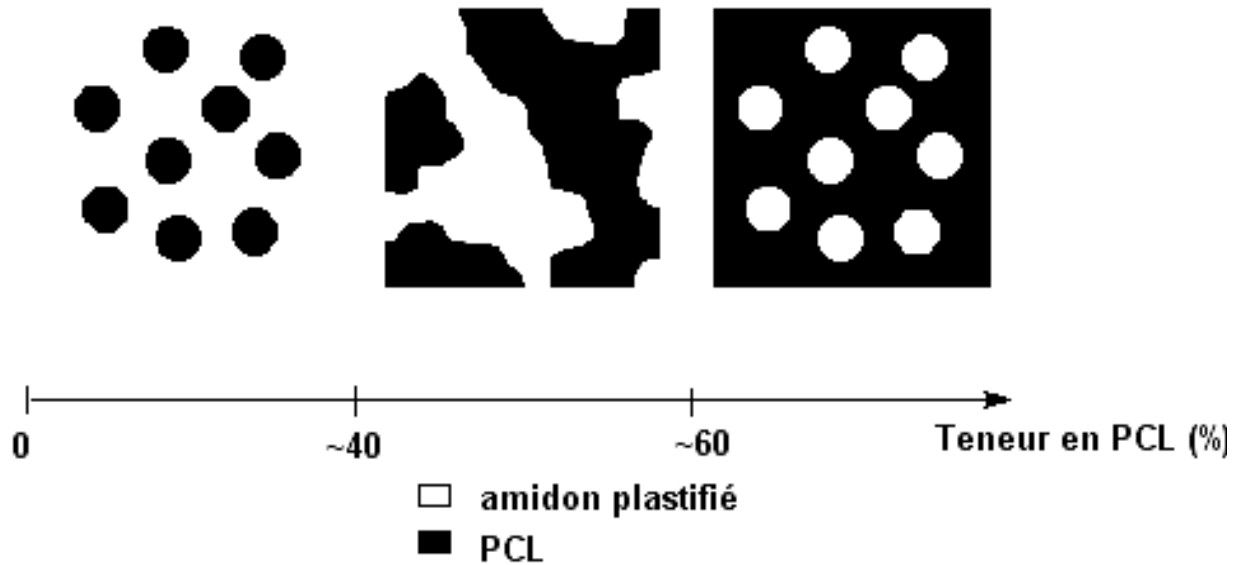


Figure 23 : Représentation schématique de la morphologie des mélanges amidon plastifié/PCL en fonction de la teneur en PCL.

IV.2.2. Amidon-PBS

Ces dernières années plusieurs études se sont intéressées à des mélanges amidon-PBS pour réduire l'hygroscopicité, diminuer la rétrogradation et avoir des propriétés mécaniques plus intéressantes. Les travaux de [Sen *et al.* \(2000\)](#) ont permis d'observer que l'ajout de PBS à l'amidon conduit à une diminution du module de Young et de l'élongation. [Jayasekara *et al.* \(2003\)](#) ont montré que l'ajout de l'amidon au PBS conduit à une accélération et une augmentation du pourcentage de biodégradation dans le compost.

IV.2.3. Propriétés physico-chimiques des mélanges de polymères-compatibilité entre polymères

Les mélanges de polymères peuvent présenter trois comportements différents en fonction de la compatibilité entre leurs constituants :

- Les deux polymères forment deux phases bien distinctes dans le mélange quelles que soient les proportions de chacun et la température: les polymères sont dits « non-miscibles ».
- Les deux polymères forment soit une seule phase homogène, soit deux phases distinctes où chacune des deux est enrichie en l'un des constituants : les polymères sont dits « partiellement miscibles ».
- les polymères forment une phase unique dans le mélange en toutes proportions: les polymères sont dits « totalement miscibles ».

Le nombre de polymères compatibles est faible. Dans le cas d'une compatibilité, les propriétés des mélanges sont déterminées par la somme pondérée des propriétés des constituants. Dans le cas contraire, le comportement s'éloigne de la linéarité et des effets de synergie ou d'antagonisme peuvent apparaître.

IV.2.4. Propriétés mécaniques des mélanges

Les propriétés mécaniques d'un matériau résultant d'un mélange de polymères dépendent de sa composition et de sa morphologie. De nombreux modèles ont été proposés pour rendre compte de l'évolution du module de Young (E) d'un mélange en fonction de sa composition (Willemse *et al.*, 1999).

IV.2.5. Propriétés thermiques des mélanges

La température de transition vitreuse (T_g) est une grandeur caractéristique d'un polymère. Pour les matériaux composites trois cas peuvent être distingués selon la compatibilité entre les deux polymères utilisés :

- Polymères "compatibles" : le mélange présente une T_g unique peu étalée en température ;
- Polymères "incompatibles" : le mélange présente deux T_g différentes ;
- Polymères partiellement miscibles : les températures de transition vitreuse des deux composants sont visibles avec un décalage par rapport à chaque température du polymère seul.

V. Dégradation et biodégradation des matériaux à base de biopolymères

Selon le Comité Européen de Normalisation (CEN), la dégradation est un processus entraînant des changements significatifs et irréversibles dans la structure physique ou chimique du matériau impliquant ainsi des modifications de ses propriétés. Ce changement se manifeste par une altération et une perte des propriétés initiales comme le poids moléculaire, la structure moléculaire, la résistance à la traction et/ou une fragmentation. Le terme dégradation réunit donc l'ensemble des facteurs abiotiques et biotiques responsables des changements au niveau du matériau. Les polymères peuvent être dégradés par différents mécanismes pouvant interagir entre eux (Decriaud-Calmon *et al.*, 1998) :

V.1. Dégradation thermique

Selon [Jacubowicz et al. \(2003\)](#), les températures élevées favorisent les réactions abiotiques pour l'oxydation des films en polyéthylène. La dégradation abiotique (dans de l'eau stérile) de l'acide polylactique (communément appelé PLA) à différentes températures (40 °C, 50 °C, 60 °C) a montré une diminution importante du pH à 60 °C ([Agarwal et al., 1998](#)). Cette baisse du pH est due à une désorption de l'acide lactique durant la dégradation du PLA ([Williams et al., 1981](#)). [Agarwal et al. \(1998\)](#) ont montré que l'absorption de l'eau par le PLA augmente lorsque la température du milieu (60°C) dépasse la température de transition vitreuse du polymère favorisant ainsi l'hydrolyse chimique.

V.2. Dégradation par des microorganismes ou biodégradation

Le terme biodégradation est réservé au processus de dégradation d'un composé organique mettant en jeu des microorganismes (bactéries, moisissures,...) qui agissent à travers leurs systèmes enzymatiques. Les produits finaux de la biodégradation sont des composés simples tels que H₂O, CO₂, CH₄, H₂, ou encore des produits organiques simples (métabolites) tels que des acides organiques etc... Si la biodégradation du substrat organique est totale, c'est à dire qu'elle résulte uniquement de la formation de produits inorganiques tels que H₂O, CO₂, CH₄, H₂, on parle de minéralisation ([Atlas, 1988](#); [Pelmont et al., 1993](#)). Le terme biodégradabilité regroupe les qualités nécessaires à une substance pour subir un processus d'altération microbienne.

L'altération microbienne ou bioaltération est une dégradation superficielle qui provoque des modifications des propriétés mécaniques, physiques et chimiques des matériaux. Elle concerne non seulement les substances organiques mais aussi les substances inorganiques et résulte soit des attaques enzymatiques (action directe des micro-organismes), soit des modifications chimiques de l'environnement telles qu'une variation de pH qui ont pour conséquence l'altération physique et/ou chimique (action indirecte) ([Gourdon, 2002](#)).

V.2.1. Les différents facteurs influençant la biodégradation

Quelle que soit l'origine du matériau, les facteurs limitant sa dégradation peuvent être liés à ses propriétés intrinsèques (structure et composition) et aux paramètres physico-chimiques de l'environnement de dégradation. Pour cela, avant toute évaluation de la dégradation, il est important de bien étudier le matériau (la nature des molécules qui le constituent, sa porosité, sa cristallinité...) et le milieu de dégradation (température, pH, humidité...).

V.2.2. Mécanisme de la biodégradation : l'hydrolyse enzymatique

L'assimilation des substrats organiques par des microorganismes n'est possible que si ces substrats pénètrent à l'intérieur de la cellule. Pour cette raison, les microorganismes synthétisent des enzymes permettant la dépolymérisation des polymères jusqu'à l'obtention de substrats utilisables directement comme le glucose à partir de l'amidon.

a. Propriétés du matériau :

La composition chimique : La biodégradabilité dépend de la composition chimique du matériau. Dans la mesure du possible, il est donc recommandé de procéder à une caractérisation chimique du matériau. Cependant, ces techniques sont souvent très coûteuses. La caractérisation chimique permet d'estimer théoriquement le taux de biodégradabilité potentielle du matériau.

La cristallinité : L'organisation structurale du polymère influence sa susceptibilité d'être dégradé. Selon [Agarwal et al. \(1998\)](#), les régions amorphes d'un polymère se dégradent en premier, ce qui se traduit par une augmentation des résidus cristallins non dégradés au cours des tests de dégradation. Cela est dû au degré d'organisation élevé des chaînes de polymères dans la région cristalline du matériau limitant l'accessibilité des liaisons à l'attaque enzymatique. Les régions cristallines de l'amidon sont à titre d'exemple 20 fois moins accessibles à l'hydrolyse enzymatique que les régions amorphes ([Timmins 1994](#)). [Li et al. \(1995\)](#) ont montré que la pénétration de l'eau dans la partie amorphe du PLA est meilleure et favorise sa dégradation.

La porosité : [Nakazawa et al. \(2003\)](#) ont montré qu'en plus du caractère amorphe d'une partie de l'amidon, la structure poreuse de l'amidon permet une hydrolyse enzymatique rapide. Un diamètre de pore d'environ au moins 50 Å est nécessaire pour permettre la diffusion des enzymes dans le substrat ([Coma, 1992](#)). L'attaque enzymatique commence à partir d'une dépression au niveau du grain d'amidon avant la pénétration de l'enzyme. L'hydrolyse enzymatique prolongée provoque le développement d'un trou, au niveau de la dépression, qui s'élargit dans la partie interne et est suivi d'une disparition de la partie extérieure de la surface ([Wang et al., 1997](#)).

L'hygroscopie : L'absorption de l'eau par les polymères est une étape clé pour la bioassimilation du poly (α -hydroxyacide) par les microorganismes ([Hakkarainen et al., 2002](#)). En revanche, tous les polymères hydrosolubles ne sont pas biodégradables et l'eau à titre

d'exemple n'influence que peu le processus de la biodégradation du Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate (PHBV) dans le compost (Eldsäter *et al.*, 1999).

La surface spécifique : La taille du matériau est directement liée à la surface de contact spécifique microorganismes-polymère. Gattin *et al.* (2000) ont mis en évidence que la vitesse de dégradation en milieu liquide des plaques d'amidon extrudées broyées est nettement supérieure par rapport aux plaques entières.

b. Les microorganismes :

De nombreux microorganismes présents dans le milieu naturel sont capables d'hydrolyser les polymères naturels ou synthétiques par l'intermédiaire de leurs enzymes. La plupart des études menées sur la biodégradation des matériaux ont privilégié l'utilisation de souches fongiques (Coma *et al.*, 1995). Deux raisons ont principalement guidé ce choix :

- Les matériaux sont facilement envahis par les moisissures qui sont mieux équipées pour l'hydrolyse des polymères et leurs hyphes leur permettent de pénétrer profondément dans les tissus ;
- Les bactéries présentent pour la plupart des cas des caractères pathogènes nécessitant un équipement plus particulier et rendant plus difficile leur utilisation pour les tests de biodégradabilité.

c. Le milieu de dégradation :

La température : La température du milieu est un facteur déterminant pour le développement des microorganismes. Selon la tolérance à la température, quatre classes microbiennes peuvent être distinguées. Les microorganismes psychrophiles se développent à des températures inférieures à 1° C, les psychrotrophes entre 5 et 15 °C, les mésophiles entre 20 et 40 °C et les thermophiles au-delà de 60 °C. Il est donc nécessaire de réaliser les tests de dégradations dans des conditions propices au développement des microorganismes. Pour une dégradation dans le sol, la température doit être comprise entre 25 et 27 °C (Grima, 2002). En revanche, pour une dégradation qui se déroule dans du compost, plusieurs travaux ont relaté une meilleure dégradation du PLA à 60 °C (Agarwal *et al.*, 1998). Il est fortement recommandé de travailler à des températures inférieures à 65 °C. Au delà de cette valeur la plupart des microorganismes meurent (Grima, 2002).

L'activité de l'eau (a_w) : L'activité de l'eau est un indicateur de la quantité d'eau énergétiquement disponible dans un milieu donné. La teneur relative en eau est potentiellement un autre facteur limitant de l'hydrolyse enzymatique d'un matériau et de la

croissance des microorganismes et donc du taux de dégradation d'un polymère dans n'importe quel milieu. La plupart des réactions d'hydrolyse ne démarrent par exemple que si l' a_w du milieu est supérieure à 0,2. Le pourcentage d'humidité relative de l'air environnant favorise ou non la colonisation des matériaux par des microorganismes et par la suite leur biodégradation. Pour la plupart des microorganismes, l'optimum de croissance est observé pour des valeurs d'activité de l'eau comprises entre 0,92 et 0,99 (Atlas, 1988). Les activités d'eau minimales requises sont différentes selon les microorganismes : 0,91 pour les bactéries, 0,88 pour les levures et 0,80 pour les moisissures. Cependant, certaines espèces adaptées peuvent présenter une croissance à des a_w plus faibles comme les bactéries halophiles, les moisissures xérophiles et les levures osmophiles qui se développent à partir d'une a_w respectivement égale à 0,75, 0,65, et 0,60.

Le pH : Le pH optimal pour le développement des bactéries est proche de la neutralité. Seules les bactéries acidogènes sont capables de croître dans des milieux à pH inférieurs à 6. Cependant, pour les champignons, le pH de croissance est compris entre 3 et 6. Le pH est un facteur clé pour la survie des microorganismes et par conséquent la biodégradation des substrats. Plusieurs travaux suggèrent d'utiliser un milieu à pH neutre ou faiblement basique (Day *et al.*, 1998).

VI. Méthodes de mesure de la biodégradabilité des matériaux

Ces méthodes permettent l'évaluation de la biodégradabilité des matériaux par des microorganismes aérobies ou anaérobies qualitativement en se basant sur l'observation visuelle ou quantitativement en mesurant la perte de masse, la quantité d'O₂ ou de CO₂ consommée par les microorganismes lors de l'assimilation du substrat à dégrader. Pour cela différentes méthodes peuvent être utilisées :

VI.1. Méthodes qualitatives

Ce sont des méthodes qui se basent sur le développement microbien pour déterminer la capacité des microorganismes (bactéries ou champignons) à dégrader un polymère particulier. Dans ce but, la croissance de ces microorganismes est mise en évidence en mesurant l'utilisation du polymère comme source de carbone.

VI.1.1. La méthode des «zones claires»

C'est une méthode utilisée pour les tests réalisés sur un milieu gélosé. Le polymère constitue la seule source de carbone dans le milieu de culture et il peut être déposé à la surface

sous forme de film (Calmon *et al.*, 1998) ou ajouté à la gélose sous forme de poudre (Tokiwa *et al.*, 2006), ce qui rend dans ce cas la gélose opaque (figure 24). Après inoculation avec le surnageant d'une boue active ou d'un sol, la croissance des souches ayant le pouvoir de dégrader le polymère provoquera l'apparition de zones claires. En utilisant cette méthode, Jarerat *et al.* (2003) ont pu isoler *Saccharothrix waywayandensis* qui a la capacité de dégrader jusqu'à 95% l'acide polyLactique (PLA) après 7 jours d'incubation dans un milieu liquide.

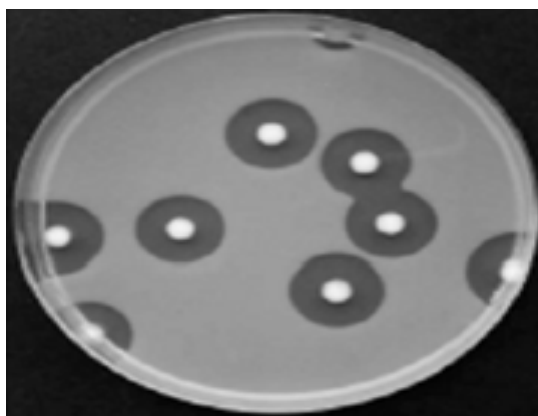


Figure 24 : Zones claires autour des colonies ayant dégradé le PLA (Tokiwa *et al.*, 2006).

VI.1.2. La méthode d'envahissement

L'envahissement des polymères par les microorganismes permet de mettre en évidence la sensibilité des matériaux étudiés à l'attaque microbienne. Le film plastique à tester est déposé à la surface d'un milieu gélosé après étalement d'une suspension microbienne à une concentration d'environ 10^7 UFC/mL (Unités Formant Colonies) (Coma *et al.*, 1992). Grâce à cette méthode, il a été démontré que la souche ATCC 3118 appartenant au genre *Amycolatopsis* est capable de dégrader 50% d'un film de PLA après 8 semaines d'incubation à 30 °C (Ikura *et al.*, 1999). L'estimation de la biodégradabilité basée sur la méthode d'envahissement est fondée sur l'observation directe du matériau envahi par les microorganismes.

Que ce soient les zones claires ou l'envahissement, ces méthodes restent qualitatives mais sont faciles à mettre en œuvre. Elles constituent un test rapide qui permet l'orientation des formulations polymériques vers du biodégradable et la sélection des souches dégradant ces matériaux.

VI.2. Mesure de la biodégradation par voie aérobie en milieu liquide : méthode respirométrique (ISO 14851)

Les mesures respirométriques permettent de quantifier, en conditions aérobies, la dégradation du matériau plastique dans un milieu liquide jusqu'à sa disparition grâce à son assimilation par des microorganismes. La durée du test est de 28 jours, en revanche, selon l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique), le test peut être prolongé si nécessaire (Calmon-Decriaud *et al.*, 1998). Des études ont montré qu'avec cette méthode la cellulose est biodégradée à 100% après 50 jours en utilisant une boue issue d'une station d'épuration d'une usine (Mezzanotte *et al.*, 2005).

La qualité, la source et la quantité de l'inoculum microbien affectent énormément les résultats de la biodégradabilité d'un polymère. Les sources de l'inoculum utilisées pour les méthodes respirométriques sont très variées : boue activée d'une station d'épuration d'une usine, effluent secondaire, éluat de compost ou d'un sol, voire d'un mélange d'inoculums (Calmon-Decriaud *et al.*, 1998) ou des microorganismes sélectionnés par la méthode d'envahissement ou des zones claires. L'inoculum peut être introduit directement ou après un prétraitement par filtration ou décantation afin d'éliminer les grosses particules. Une aération est toujours nécessaire pour purger le système du carbone organique présent dans l'inoculum. Une concentration supérieure à 10^5 UFC/mL donne une meilleure minéralisation (CEN, 2002).

VI.2.1. Mesure de la consommation d'oxygène

Les microorganismes aérobies consomment de l'oxygène pour oxyder le carbone du polymère sous forme de dioxyde de carbone. La mesure de la quantité d'oxygène consommée permet d'évaluer le pourcentage de minéralisation. Cette quantité peut être mesurée par une électrode à oxygène en l'introduisant dans le milieu de culture (Mezzanotte *et al.*, 2005) ou par un respiromètre (Reuschenbach *et al.*, 2003). Dans le deuxième cas, le pourcentage de minéralisation (Dtm) est calculé en utilisant la formule suivante :

$$Dtm = \frac{\text{Net DBO}}{\text{Total ThOD}} \times 100$$

Avec :

DBO est la demande biologique en oxygène ;

Net DBO : Différence entre la quantité d'oxygène consommée dans le flacon contenant le matériau et le blanc (inoculum sans matériau pour soustraire la consommation d'oxygène endogène par l'inoculum) ;

Total ThOD : Demande d'oxygène théorique.

VI.2.2. Mesure de la production de dioxyde de carbone

La mesure de la quantité de dioxyde de carbone produit pendant la respiration des microorganismes en utilisant le matériau comme seule source de carbone est la technique la plus utilisée dans les tests respirométriques. Le dioxyde de carbone issu de la biodégradation du polymère est utilisé pour le calcul du pourcentage de minéralisation. Lors de cette méthode, l'inoculum microbien utilisé produit naturellement du dioxyde de carbone pendant la respiration endogène, cette valeur doit être retranchée en utilisant un témoin sans polymère. De nombreux dispositifs pilotes ont été développés pour la mise en place de ce test de biodégradation.

a. Mesure de CO₂ par piégeage chimique :

C'est le moyen le plus simple de capter le CO₂ libéré pendant la minéralisation durant la biodégradation d'un polymère. Le CO₂ est piégé dans une solution alcaline de soude (Mohee *et al.*, 2007) ou d'hydroxyde de baryum (Vázquez-Rodríguez *et al.*, 2006; Iovino *et al.*, 2008) en large excès de concentration connue. Le dosage acido-basique de la solution permet de quantifier la soude ou l'hydroxyde de baryum n'ayant pas réagi avec l'acide. Par conséquent, la quantité totale de CO₂ dégagée déduite permet de calculer le pourcentage de minéralisation.

b. Mesure de CO₂ par infra-rouge (IR) :

La quantité de CO₂ libéré peut être mesurée automatiquement en utilisant un détecteur infra-rouge (IR). Au moment de la mesure, l'air présent dans le milieu est purgé puis envoyé vers l'analyseur IR qui comptabilise la quantité de CO₂ en ppm dans le milieu d'essai (Grima, 2002).

VI.3. Compostage

VI.3.1. Généralités sur la méthode

Le compostage aérobie est un processus de dégradation contrôlée de la matière organique en présence d'oxygène sous l'action des microorganismes. Le compostage se déroule en deux phases bien distinctes : phase de décomposition et phase de maturation.

La phase de décomposition correspond à la dégradation des molécules les plus facilement biodégradables qui seront utilisables par les microorganismes ce qui favorisera ainsi leur croissance dans le milieu. L'augmentation de la température liée à la forte activité de ces microorganismes va provoquer une augmentation de la température jusqu'à 60°C. Cette phase est caractérisée par une forte consommation d'oxygène et un dégagement du dioxyde de carbone qui dure environ trois mois.

La phase de maturation d'environ deux mois est caractérisée par une diminution de l'humidité au sein du compost et une baisse de la température jusqu'à 55°C. Elle est favorable au développement d'une flore microbienne mésophile.

Au cours du compostage, la température et le pH varient en fonction du stade de maturation et de l'activité des microorganismes présents dans le compost. Ces variations se déroulent en 4 étapes distinctes qui sont illustrées au niveau de la [figure 25](#).

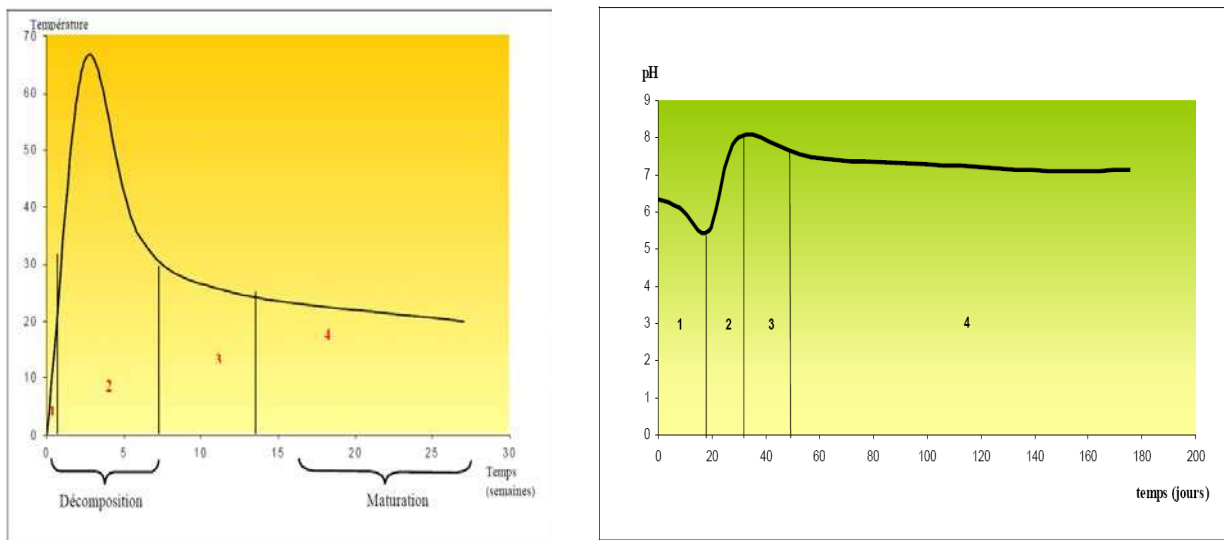


Figure 25 : Evolution de la température et du pH au cours du compostage (d'après la Fédération Nationale des Activités de la Dépollution et de l'Environnement (FNADE)).

Pour la température

- Etape 1 : une phase mésophile caractérisée par le développement d'une flore bactérienne mésophile qui commence le processus en libérant des enzymes pour hydrolyser les parois cellulaires des végétaux;

- Etape 2 : une phase thermophile caractérisée par la dominance des microorganismes thermophiles et la neutralisation des germes pathogènes à cause de la montée en température au delà de 60 °C pendant plusieurs jours ;
- Etape 3 : une phase mésophile caractérisée par une chute de la température jusqu'à 30°C favorisant la colonisation des champignons ;
- Etape 4 : Pendant cette phase la température reste en dessous de 30 °C et l'activité des microorganismes est complétée par celle des organismes de plus grandes tailles comme les vers et les acariens.

Pour le pH

- Etape 1 : une phase d'acidocétose durant laquelle le pH diminue grâce à une intense production de gaz carbonique et d'acides organiques ;
- Etape 2 : une phase d'alcalinisation caractérisée par une augmentation du pH et une production d'ammoniac ;
- Etape 3 : Durant cette phase le pH se stabilise au dessus de 8 grâce à l'utilisation de l'ammoniac par les microorganismes pour la biosynthèse des matières humiques ;
- Etape 4 : Phase où le pH est proche de la neutralité grâce au pouvoir tampon de l'humus. Elle correspond à la phase de maturation où les réactions deviennent lentes.

Selon la norme ISO 14855, le compost utilisé pour les tests de dégradation doit réunir les critères suivants :

- Mature : âgé de 2 à 4 mois ;
- Taille des particules comprise entre 0,5 à 1 cm ;
- Porosité suffisante pour assurer une bonne aération ;
- Teneur en matières sèches comprise entre 50 et 55% ;
- Teneur en matières volatiles d'environ 15% de matières humides.

La teneur en humidité dans le compost utilisé influence significativement la vitesse de biodégradation des matériaux. Pour des taux d'humidité de 60, 50 et 40%, le temps nécessaire

pour la dégradation totale de films d'acétate de cellulose est respectivement de 6, 16 et 30 jours (Gu *et al.*, 1993).

La température préconisée selon la norme est $58 \pm 2^\circ\text{C}$, elle correspond à la température optimale du développement des microorganismes thermophiles. Agarwal *et al.* (1998) ont étudié l'impact de la température sur la dégradation du PLA. Pour cela ils ont étudié la dégradation à trois températures différentes (40, 50, 60°C). Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de la température conduit à une dégradation thermique des chaînes de polymères et donc à une diminution de la masse moléculaire. Day *et al.* (1998) ont imposé une température extérieure de 35°C , alors que Pagga *et al.* (1995) ont utilisé le profil de températures suivant variant le long du test comme suit : 35°C (1 jour), 58°C (4 jours), 50°C (23 jours) et 35°C jusqu'à la fin du test.

Le pH est un facteur déterminant pour le développement des microorganismes dans le compost. Sa valeur initiale doit être neutre et comprise entre 7 et 8. Cependant, sa valeur varie en fonction des métabolites présents dans le milieu (Calmon-Decriaud, 1998).

VI.3.2. Les changements de morphologie et la perte de poids du matériau

La mesure de la biodégradabilité par perte de poids consiste à peser la masse de l'échantillon avant et après son incubation. Pour avoir des résultats satisfaisants, il est nécessaire de soumettre le polymère à un nettoyage parfait après son prélèvement pour ne pas fausser la mesure de la masse. Le polymère est susceptible d'absorber de l'eau, il est donc aussi nécessaire de le sécher avant la pesée (Agarwal *et al.*, 1998). Il est important de noter que cette mesure ne reste valable que tant que l'intégrité du matériau est conservée.

Une comparaison de la structure de surface d'un film plastique avant et après le test donne une information sur la dégradation de la morphologie liée à l'action des microorganismes. Le microscope électronique à balayage (MEB) permet d'observer le développement des colonies microbiennes provoquant une dégradation importante au niveau de la surface (Tokawa *et al.*, 2004).

VI.3.3. Mesure du CO_2 libéré par les microorganismes

Au cours de la dégradation des matériaux plastiques dans le compost, les microorganismes consomment de l'oxygène et libèrent du dioxyde de carbone. Pour mesurer ce CO_2 dégagé plusieurs travaux se sont basés sur un dosage titrimétrique. A titre d'exemple, Szàraz *et al.* (2003) ont piégé le CO_2 dans une solution de NaOH qui est ensuite titrée avec de l'HCl.

VI.4. Mesure de la biodégradation par voie anaérobie

Les tests de biodégradation anaérobie ont été développés pour déterminer la biodégradabilité anaérobie de composés organiques (Owen *et al.*, 1979 ; Bayard *et al.*, 2001). Ils sont également employés en tant que tests d'évaluation du Potentiel de Bio-Méthanisation (PBM) des déchets ménagers (Harries *et al.*, 2001). Harries *et al.* (2001) ont fourni une description détaillée des conditions opératoires à mettre en œuvre pour le test PBM.

VI.4.1. Les étapes de la méthanogenèse

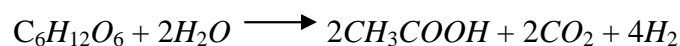
La dégradation anaérobie de la matière organique comporte quatre phases distinctes:

a. Phase d'hydrolyse :

En conditions anaérobies, l'étape d'hydrolyse est réalisée par des bactéries acidogènes hydrolytiques par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaires (Chynoweth & Pullamannappallil, 1996). Il s'agit en quelque sorte d'une étape de préparation du substrat pour la phase suivante d'acidogenèse, réalisée par les mêmes bactéries. Sur déchet solide, cette première phase de la dégradation est souvent considérée comme l'étape cinétiquement limitante du processus méthanogène dans son intégralité (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991), notamment dans le cas de taux élevés en hydrates de carbone qui sont les composants organiques les plus lents à hydrolyser (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991).

b. Phase d'acidogenèse :

L'acidogenèse est définie comme une réaction biologique anaérobie productrice d'acides sans accepteurs ou donneurs d'électrons additionnels inorganiques (Batstone *et al.*, 2002 ; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991). C'est le cas de la dégradation des sucres et des acides aminés convertis principalement en formate (HCOO^-), acétate (CH_3COO^-), dioxyde de carbone et dihydrogène. La dégradation du glucose en acétate, par exemple, est schématisée par la réaction suivante (Batstone *et al.*, 2002) :



Les composés avec un squelette à nombre impair d'atomes de carbone peuvent toutefois être à l'origine d'autres acides organiques tels que le propionate ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$). De plus, dans le cas d'une accumulation du dihydrogène (en cas de faible activité des bactéries l'utilisant, les méthanogènes notamment, *cf.* ci dessous), la dégradation des sucres va conduire à la formation de nombreux autres produits tels que le butyrate, le lactate ainsi que des alcools (Chynoweth & Pullamannappallil, 1996 ; Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991).

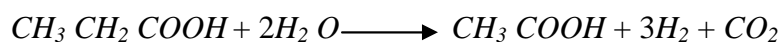
La flore acidogène, responsable de ces deux premières étapes (hydrolyse et acidogénèse) se développe rapidement comparativement aux flores suivantes. De plus, les bactéries qui la constituent sont en grande partie anaérobies facultatives et tolèrent des pH relativement bas (jusqu'à 5) ce qui en fait des organismes à développement peu contraignant (Gourdon, 2002).

Les acides gras formés au cours de l'acidogénèse en condition d'accumulation d'H₂ et ceux provenant de l'hydrolyse des lipides sont métabolisés par un tout autre groupe bactérien, les bactéries acétogènes, par oxydation anaérobie essentiellement (Batstone *et al.*, 2002).

c. Phase d'acétogénèse :

Cette phase est nommée ainsi car l'acétate est son principal produit carboné. Contrairement aux réactions décrites précédemment, les réactions mises en jeu ici nécessitent la présence d'un accepteur d'électron inorganique : l'hydrogène (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991) sous sa forme ionique (Batstone *et al.*, 2002). Ces réactions génèrent de l'H₂ et les bactéries qui les réalisent sont dites « productrices obligées d'hydrogène » (Mata-Alvarez, 2003).

Acides et alcools formés précédemment sont transformés en acétate, CO₂ et H₂. Les acides gras avec un squelette à nombre impair (C³ 5) d'atomes de carbone (le valérate par exemple) sont toutefois en partie convertis en propionate (Chynoweth & Pullammanappallil, 1996 ; Batstone *et al.*, 2002) qui sera à son tour converti en acétate, CO₂ et H₂. La dégradation du propionate est schématisée par la réaction suivante (Batstone *et al.*, 2002) :



Les micro-organismes acétogènes sont anaérobies stricts, très sensibles au pH, et possèdent un développement lent. Ils réalisent de plus une réaction métabolique thermodynamiquement peu favorable. L'hydrogène produit ne doit pas s'accumuler sous peine d'inhiber toute conversion. Il doit donc être soustrait du milieu au fur et à mesure de sa production d'où un lien très étroit nécessaire, un développement syntrophique, entre ces bactéries et les suivantes qui l'utilisent. (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991 ; Chynoweth & Pullammanappallil, 1996 ; Mata Alvarez, 2003).

d. Phase de méthanogénèse :

Cette étape correspond à la production de méthane et de dioxyde de carbone à partir des produits organiques issus des étapes métaboliques précédentes. La méthanogénèse est assurée par les bactéries méthanogènes qui sont des bactéries anaérobies strictes et font partie

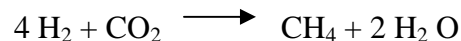
de la classe des Archaeobactéries. Elles ne sont capables d'utiliser qu'un petit nombre de substrats organiques nécessaires pour leur croissance et leur développement tels que le formate, l'acétate et le méthylamine.

Les bactéries méthanogènes constituent un groupe d'organismes si particulier qu'elles font partie d'un règne spécifique, les archéobactéries, séparé du règne des bactéries procaryotes par des caractéristiques métaboliques et une structure membranaire particulières. (Chynoweth & Pullammanappallil, 1996). De nombreux substrats (mais très spécifiques) peuvent être utilisés (Chynoweth & Pullammanappallil, 1996). Cependant, deux voies de production du méthane sont prédominantes (Batstone *et al.*, 2002) :

- l'acétoclastie, à partir de l'acétate, selon la réaction :



- la réduction du dioxyde de carbone par l'hydrogène selon :



En digesteur anaérobie, l'acétoclastie est à l'origine de 65 à 70% du méthane produit (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991). Les bactéries responsables de cette étape finale se caractérisent, tout comme les acétogènes, par, un développement lent, un caractère anaérobie strict et une forte sensibilité au pH (Gourdon, 2001). L'optimum se situe autour de la neutralité. La fourchette optimale admise est plus ou moins large selon les sources : entre 6,8 et 7,4 selon Barlaz (1996) et entre 6 et 8 selon El-Fadel (1996).

VI.4.2. Les facteurs influençant et inhibant la méthanogenèse

Il existe de nombreux facteurs susceptibles d'influencer l'activité biologique au cours de la biodégradation anaérobie de la matière organique, tels que l'humidité, le pH, la température (figure 26), et les acides gras volatils (AGV). Ces facteurs influencent la croissance des microorganismes et leur développement dans le milieu. Les processus biochimiques sont sensibles aux conditions du milieu (Reinhart, 1996).

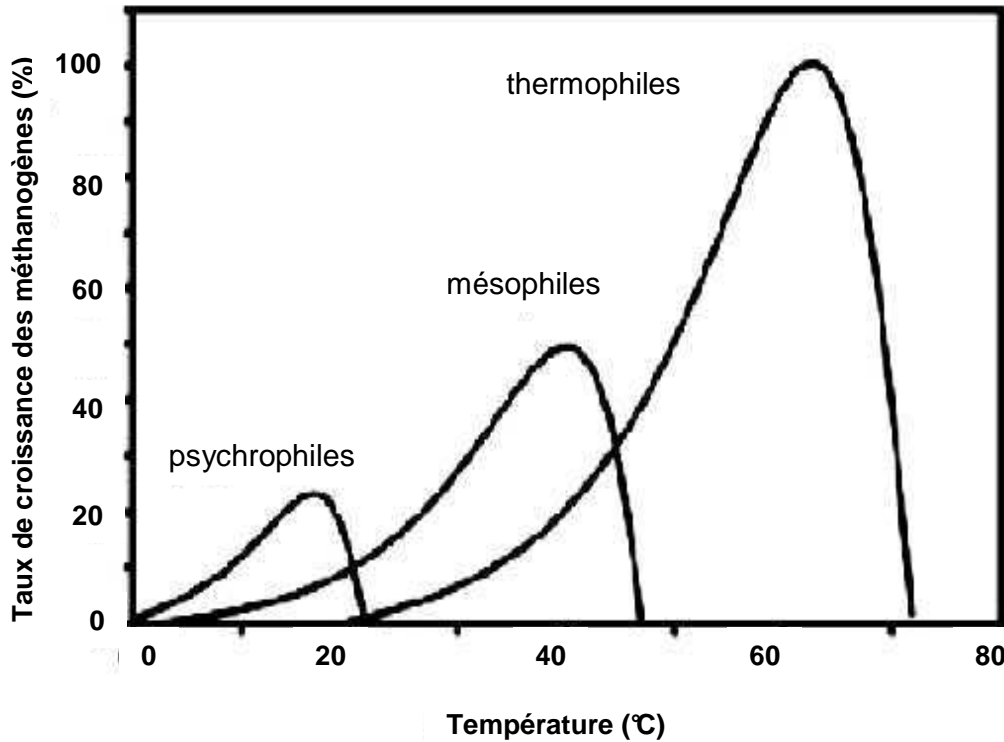


Figure 26 : Variations du taux de croissance relatif des microorganismes méthanogènes en fonction de la température (Batstone *et al.*, 2002).

La méthanogenèse peut être inhibée par les acides gras volatils (AGV), l'azote ammoniacal et le sulfure d'hydrogène. Les AGV sont des produits intermédiaires de la dégradation anaérobie de la matière organique (figure 27). L'effet inhibiteur des AGV n'est pas uniquement dû à l'acidification du milieu, mais également la toxicité de certains acides organiques volatils (Mata-Alvarez, 2003). L'azote ammoniacal produit au cours de la biodégradation de la matière organique azotée devient toxique pour les microorganismes à forte concentration (Burton & Watson-Craik, 1998). Le pH du milieu joue un rôle important dans la forme inhibitrice de l'azote et de sa concentration inhibitrice. L'inhibition de la méthanogenèse par le sulfure d'hydrogène n'est pas due à un effet inhibiteur mais à une compétition pour le substrat entre les bactéries méthanogènes et les bactéries sulfato-réductrices (Barlaz, 1996).

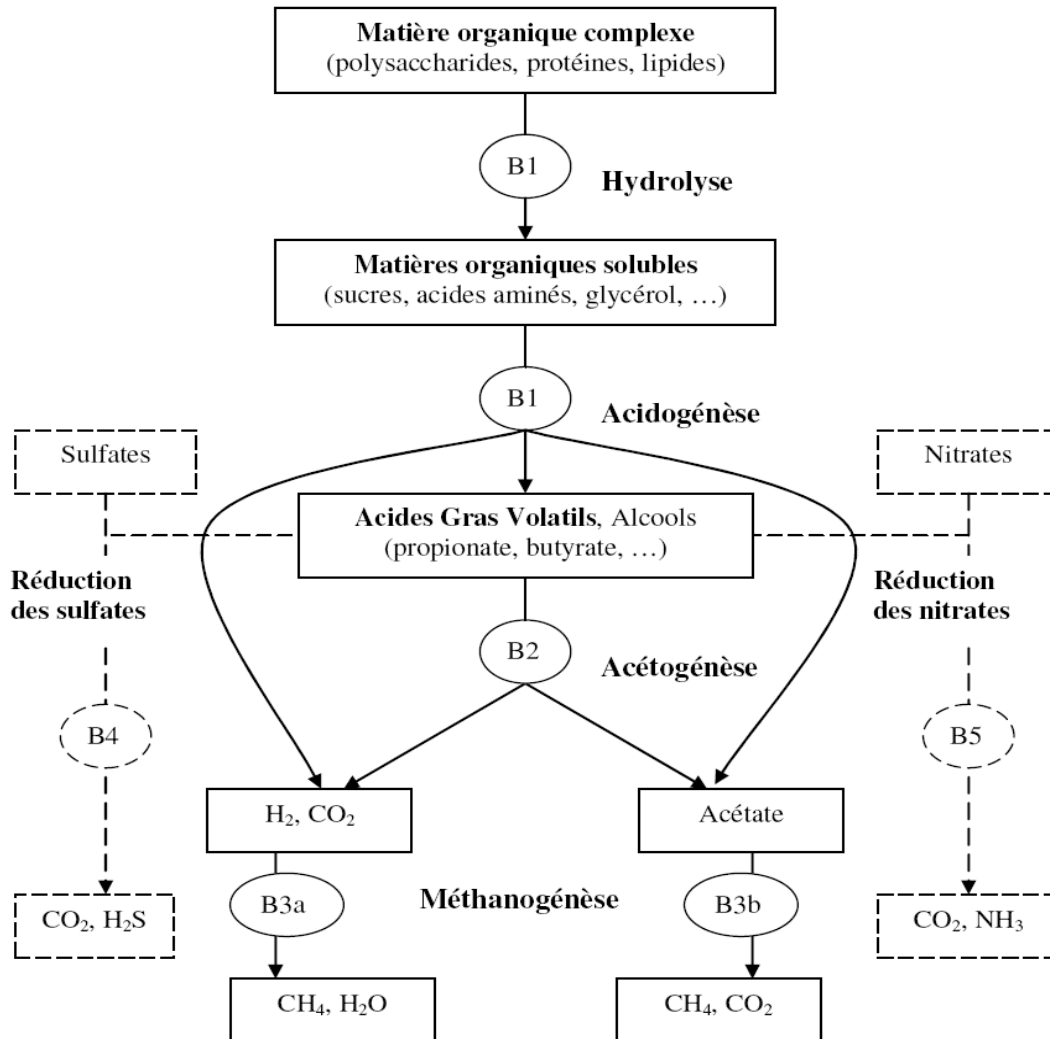


Figure 27 : Les différentes étapes de dégradation anaérobie de la matière organique. (B1= Bactérie hydrolytique acidogènes ; B2= Bactéries acétogènes ; B3= Populations méthanogènes (a, hydrogénophiles ; b, acétoclastiques) ; B4=Bactéries sulfato-réductrices ; B5= Bactéries dénitrifiantes.

VI.5. Evaluation de la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique des biomatériaux

L'approche enzymatique est utilisée essentiellement pour obtenir des informations sur la susceptibilité d'un substrat à l'hydrolyse par des enzymes spécifiques dans des conditions de concentration enzymatique, de température et de pH mieux contrôlées par rapport au développement microbien. Ces méthodes sont relativement faciles à optimiser et peuvent constituer des tests accélérés pour l'évaluation de la dégradabilité d'un matériau.

VI.5.1. Généralités sur les méthodes

Ce sont des méthodes qui donnent des informations sur la sensibilité du polymère à subir une hydrolyse enzymatique. Elles sont basées sur l'utilisation directe d'enzymes pures ou

d'un surnageant issu d'une culture microbienne ayant démontré la capacité à dégrader le polymère. La sélection des souches peut être effectuée par la méthode des zones claires. Une fois que l'isolement de la colonie formant la zone la plus grande est réalisé, l'hydrolyse enzymatique du polymère peut être réalisée en utilisant seulement le surnageant de la culture microbienne (Li *et al.*, 2007) ou par application directe des enzymes responsables de l'hydrolyse du polymère après leur purification.

VI.5.2. Les étapes d'hydrolyse enzymatique de l'amidon

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon par l' α amylase commence par une érosion de la surface du substrat suivie par une diffusion de l'enzyme à l'intérieur de la molécule puis une association entre l'enzyme et son substrat (Spiridon *et al.*, 2008).

a. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1-4) : les α amylases

Ce sont des enzymes d'origine animale, végétale ou microbienne qui, hydrolysent au hasard les liaisons α (1-4) des chaînes d'amylose et d'amylopectine (figure 28). Elles sont aussi appelées endo-amylases, amylases liquéfiantes ou dextrinisantes. Ces produits d'hydrolyse sont principalement constitués d'oligoholosides de degré de polymérisation (DP) de 6 à 7 et du maltose. Selon leur origine, leur température d'activité optimale se situe entre 50 et 55 °C et leur pH optimum varie entre 4,7 et 5,9.

b. Les enzymes spécifiques des liaisons α (1-4) et α (1-6) : les amyloglucosidases

Ce sont des enzymes appelées aussi glucoamylases, elles hydrolysent les liaisons α (1-4) et α (1-6) de l'amylose et de l'amylopectine en libérant du D-glucose. Elles sont extraites généralement des moisissures et agissent rapidement tant sur les longues chaînes que sur les courtes.

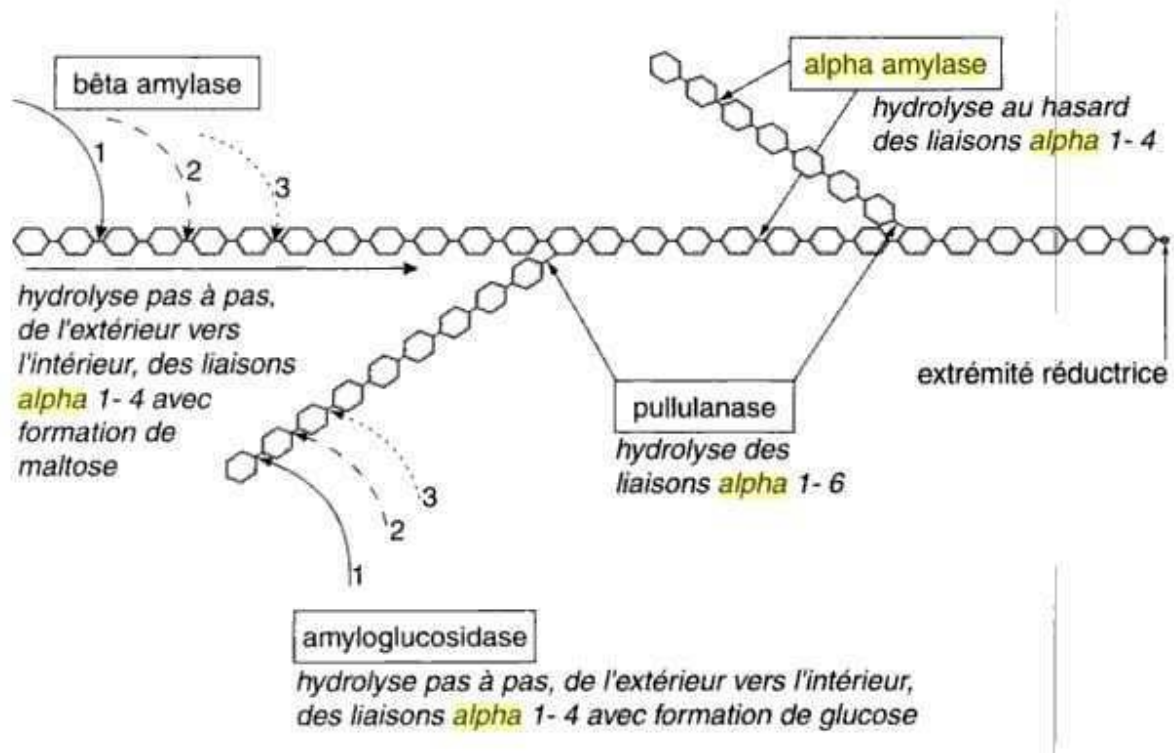


Figure 28 : Les mécanismes d'action des enzymes amyolytiques (Feuillet *et al.*, 2000).

Tableau 3 : Différentes sources d'enzymes amyolytiques.

Enzymes amyolytiques	Source de microorganismes	Température optimale (°C)
α -amylase (endoenzyme hydrolyse la liaison α 1-4)	- <i>Bacillus subtilis</i>	50
	- <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70
	- <i>Bacillus licheniformis</i>	90
amyloglucosidase (hydrolyse les liaisons α 1-4 et α 1-6)	- <i>Aspergillus niger</i>	50
	- <i>Aspergillus awamori</i>	60
	- <i>Mucor rouxianus</i>	55
	- <i>Penicillium oxalicum</i>	55-60
	- <i>Rhizopus delemar</i>	40

VI.5.3. Dosage des produits d'hydrolyse

Pour la méthode enzymatique, l'évaluation de la biodégradabilité se base sur le dosage des produits d'hydrolyse (Li *et al.*, 2007) par dosage colorimétrique à l'acide dinitrosalicylique (Miller, 1959), par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou l'identification de la structure des différents composés solubles par RMN.

En ce qui concerne les polymères à base d'amidon ou de cellulose, le pourcentage de biodégradabilité est évalué par dosage des sucres réducteurs (Copinet *et al.*, 2001) après une hydrolyse enzymatique par la formule suivante :

$$\% \text{ de biodégradabilité} = \frac{\text{Nombre de moles d'équivalent glucose produit}}{\text{Nombre de moles d'équivalent glucose théorique}} \times 100$$

La méthode au DNS (Acide Dinitrosalicylique) est la plus utilisée pour doser les oses réducteurs présents dans le milieu (Miller, 1959). Cependant, cette méthode ne permet pas d'identifier la nature de ces oses et leur degré de polymérisation (DP), pour cela une séparation par HPLC avec une détection réfractométrique est généralement utilisée. La quantité des sucres réducteurs dosée en utilisant le DNS passe de 0% à 16% après 100 jours, suite à l'hydrolyse d'un polymère à base d'amidon de maïs par une α amylase à 50U.mL⁻¹ à pH 7,4 et à 37°C (Alberta Araùjo *et al.*, 2004). Après 48 jours de réaction enzymatique, le pourcentage d'hydrolyse de l'amidon thermoplastique (TPS) par l' α amylase et l'amyloglucosidase atteint 58% (Gàspar *et al.*, 2005).

VII. Conclusion

Pour limiter les impacts des emballages non biodégradables à base de polymères d'origine fossile, plusieurs recherches visant le développement de matériaux à base de polymères naturels extraits d'agro-ressources ont été menées ces dernières années. D'après cette étude bibliographique, la plupart de ces travaux se sont intéressés à l'amidon. Néanmoins l'hydrophilie, les faibles propriétés mécaniques et l'instabilité dans le temps (vieillessement) constituent les principaux facteurs limitant aujourd'hui l'utilisation de l'amidon pour la fabrication de matériaux d'emballage. Cependant, plusieurs auteurs ont mis en évidence le fait que le mélange de l'amidon avec d'autres polymères synthétiques donne naissance à des matériaux composites ayant des propriétés mécaniques intéressantes. D'autres études ont montré également une diminution de l'hydrophilie des matériaux à base d'amidon mélangés avec la zéine (protéine majoritaire du maïs). Cette amélioration des propriétés mécaniques a pour conséquence une diminution de la biodégradabilité des matériaux composites par rapport aux matériaux à base d'amidon pur.

Un matériau d'emballage est qualifié de biodégradable si son exposition dans l'environnement mène à sa disparition complète par dégradation due à des microorganismes.

Pour estimer cette biodégradabilité, différentes méthodes sont utilisées mais aucune n'est standardisée. L'envahissement et la méthode des zones claires permettent d'estimer qualitativement et de donner une idée rapide sur la sensibilité d'un polymère à l'attaque microbienne. Ces deux méthodes peuvent constituer des tests accélérés pour estimer l'aptitude d'un biopolymère à être biodégradé ou encore pour orienter le choix des microorganismes pour constituer l'inoculum utilisé dans la méthode respirométrique. Quant à la méthode enzymatique, elle donne une idée sur la capacité d'un polymère à être fragmenté sous l'action d'une ou plusieurs enzymes d'origine microbienne.

La biodégradabilité d'un matériau plastique ne peut être estimée par une seule méthode du fait de la complexité biologique impliquée dans le phénomène de biodégradation et du nombre de paramètres à prendre en compte. Cependant, les tests rapides de biodégradation par voie enzymatique doivent être confirmés par des tests de biodégradation par voie microbienne qui sont plus longs à réaliser. De plus, les tests menés dans un laboratoire (conditions *in vitro*) ne peuvent pas exclure la réalisation de tests dans des conditions naturelles (conditions *in vivo*).

Chapitre II. Matériels et méthodes

Ce chapitre présente les différentes techniques employées pour caractériser les matériaux à base de farine de maïs élaborés dans le cadre de ce travail, les différents tests enzymatiques et les méthodes d'évaluation de la biodégradation. L'élaboration des ces matériaux a été effectuée par extrusion de la farine de maïs, du PBS et de l'eau et ou glycérol comme plastifiant. L'hygroscopie et la porosité de ces matériaux ont été respectivement évaluées en déterminant leurs isothermes de sorption d'eau et l'adsorption/désorption d'azote. La calorimétrie différentielle à balayage et la diffraction aux rayons X, ont permis d'analyser l'influence du couple formulation/procédé sur la cristallinité de l'amidon de la farine de maïs. La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier, et la microscopie confocale à balayage laser ont permis d'avoir une idée plus précise sur la structure des différents composants de la farine de maïs (amidon et protéines) et leur organisation suite aux traitements thermomécaniques. La morphologie des mélanges farine de maïs-glycérol et PBS a été analysée en effectuant des observations par microscopie électronique à balayage. Des tests d'hydrolyses enzymatiques ont permis d'évaluer la susceptibilité de l'amidon de la farine de maïs aux enzymes amylolytiques en fonction du couple formulation/procédé employé. Les cinétiques de biodégradation de ces matériaux ont été mesurées par des méthodes normalisées en milieu liquide ou solide par voie aérobie ou anaérobie.

I. Elaboration des matériaux à base de farine de maïs et de glycérol

I.1. Matériels

I.1.1. Farine de maïs

La farine de maïs utilisée dans cette étude a été fournie par la société Cérégrain (Bourg en Bresse, France). Elle a été obtenue par simple broyage des grains de maïs. La farine a été soumise à un fractionnement par tamisage en utilisant des tamis avec différents diamètres de façon à évaluer la dispersion de sa granulométrie (figure 29). La fraction I ($D > 0,4$ mm) est riche en particules jaunes ainsi qu'en résidus cellulosiques bruns. La fraction IV est constituée de fines particules blanches. Les fractions II et III présentent des compositions intermédiaires.

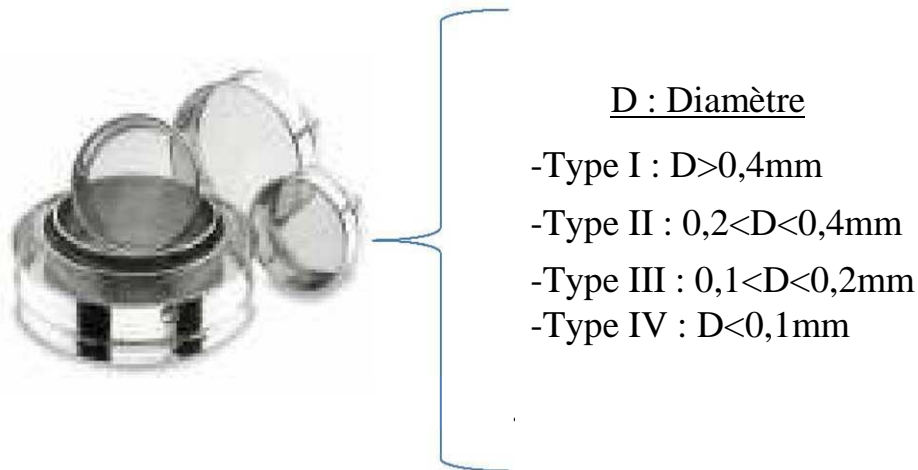


Figure 29 : Les différents diamètres utilisés pour le tamisage de la farine de maïs.

I.1.2. Glycérol

Le glycérol d'une pureté de 99,5% utilisé pour plastifier la farine de maïs a été fourni par la société Grosseron (Saint-Herblain, France).

I.2. Méthodes

I.2.1. Extrusion des mélanges farine de maïs-glycérol-eau

Les matériaux utilisés dans cette étude ont été obtenus au PEP (Pôle Européen de Plasturgie, Oyonnax), sous forme d'éprouvettes, par extrusion et injection d'un mélange de farine de maïs (pré-conditionnée à 23 °C et 50% HR pendant au moins une semaine), de glycérol et d'eau dans des proportions variables. L'extrusion a été effectuée à l'aide d'une extrudeuse bi-vis HT Evolum 32 (Clextal, Firminy) d'un diamètre de 32 mm et un rapport

Longueur/Diamètre de 44 (figure 30). Un profil de température d'extrusion de 80 à 110 °C a été utilisé.



Figure 30 : Extrudeuse bi-vis corotative conçue pour traiter la matière à hautes pressions (jusqu'à 275 bars) en continu et à hautes températures (jusqu'à 400 °C). (PEP, Oyonnax, France)

Lors de l'extrusion, le mélange peut subir des étapes de cisaillement au fur et à mesure que la matière avance dans le fourreau. Le cisaillement a pour but la déstructuration de l'amidon et la dispersion des protéines de la farine de maïs. Suite à ce traitement, la matière obtenue est davantage amorphe et homogène. A la sortie de l'extrudeuse, les joncs obtenus ont été débités en granulés utilisés par la suite pour l'injection des éprouvettes de type 1A. Dans notre cas, le cisaillement a été assuré grâce à des vis disposant d'espaces de passage de matière très étroits. Ces vis ont été intercalées entre les vis sans fin de l'extrudeuse selon deux profils (figure 31):

- Une seule zone de cisaillement ;
- Trois zones de cisaillement.

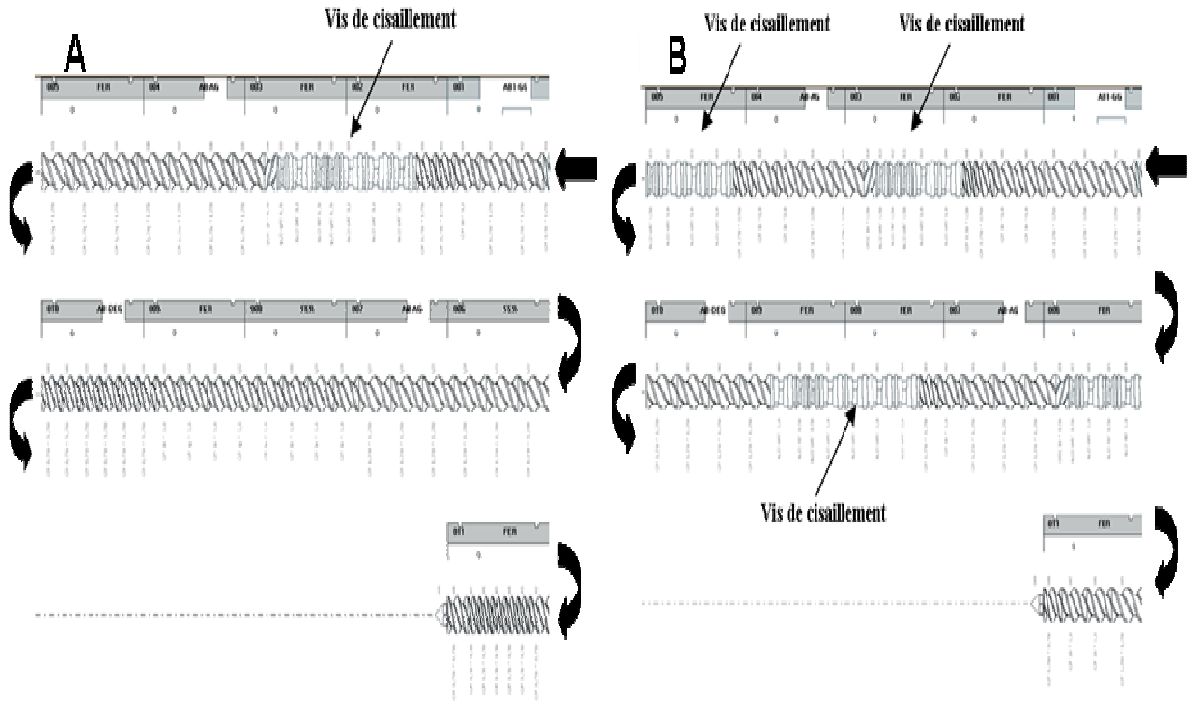


Figure 31 : Profil de vis avec A, une zone de cisaillement et B, 3 zones de cisaillement.

I.2.2. Injection des granulés

Les granulés ont été conditionnés à 23 °C et 50% HR pendant une semaine avant l'injection. Après reconditionnement des granulés de la farine déstructurée (5 % glycérol), l'injection a été réalisée sur une presse à injecter ENGEL (Allemagne).

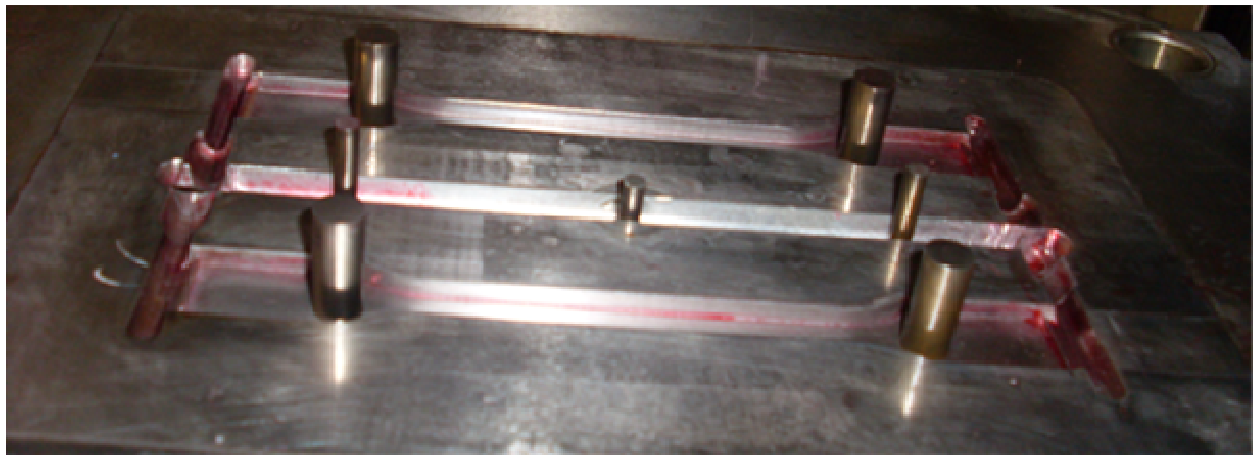


Figure 32 : Le moule utilisé pour obtenir des matériaux sous forme d'éprouvettes PEP, (Oyonnax, France).

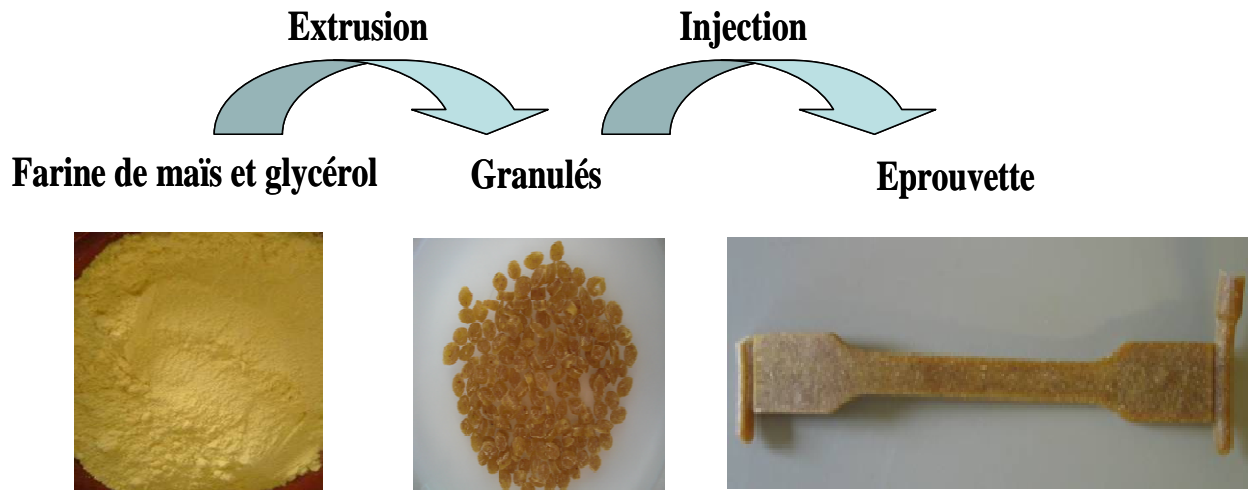


Figure 33 : Etapes d'élaboration d'un matériau plastique à partir d'une farine de maïs

Tableau 4 : Formulations utilisées pour les matériaux à base de farine de maïs.

Formulation	Farine de maïs (m/m%)	Glycérol (m/m%)	Eau ajoutée(m/m%)
1	92	8	0
2	75	10	15
3	75	5	20

Seules les formulations 2 et 3 ont subi deux types de cisaillement : un profil avec une seule zone de cisaillement et un deuxième profil avec 3 zones de cisaillement.

II. Elaboration des matériaux à base de farine de maïs, de glycérol et de polybutylène succinate

II.1. Matériels

Le polybutylène succinate (PBS) utilisé dans les différentes formulations est le PBE 001 fourni par la société Natureplast (Caen, France).

Tableau 5: Les différentes formulations réalisées

Formulation	Farine de maïs (% m/m)	Glycérol (% m/m)	PBS (% m/m)
1	52,5	17,5	30
2	37,5	12,5	50
3	22,5	7,5	70
4	0	0	100

II.2. Extrusion de la farine de maïs, du glycérol et du PBS

Pour ce matériau, l'extrusion est réalisée en utilisant le même type d'extrudeuse avec un profil de vis constitué d'une succession de plusieurs zones courtes de convoyage et de cisaillement. La température d'extrusion est comprise entre 100 et 135 °C. Les étapes de l'extrusion sont schématisées dans la figure 34.

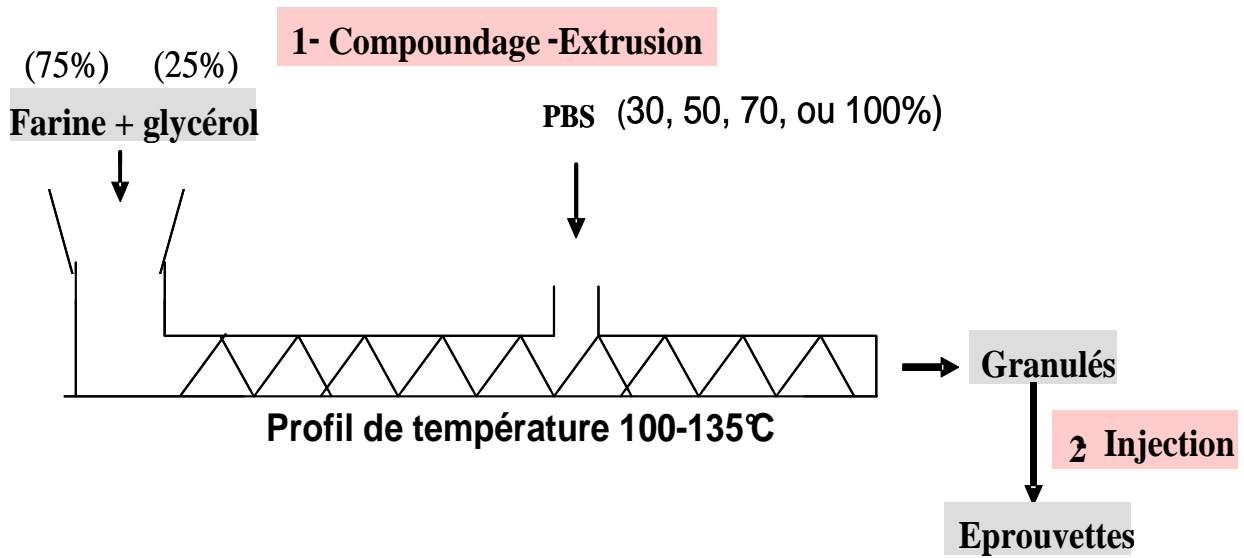


Figure 34 : Différentes étapes de l'extrusion

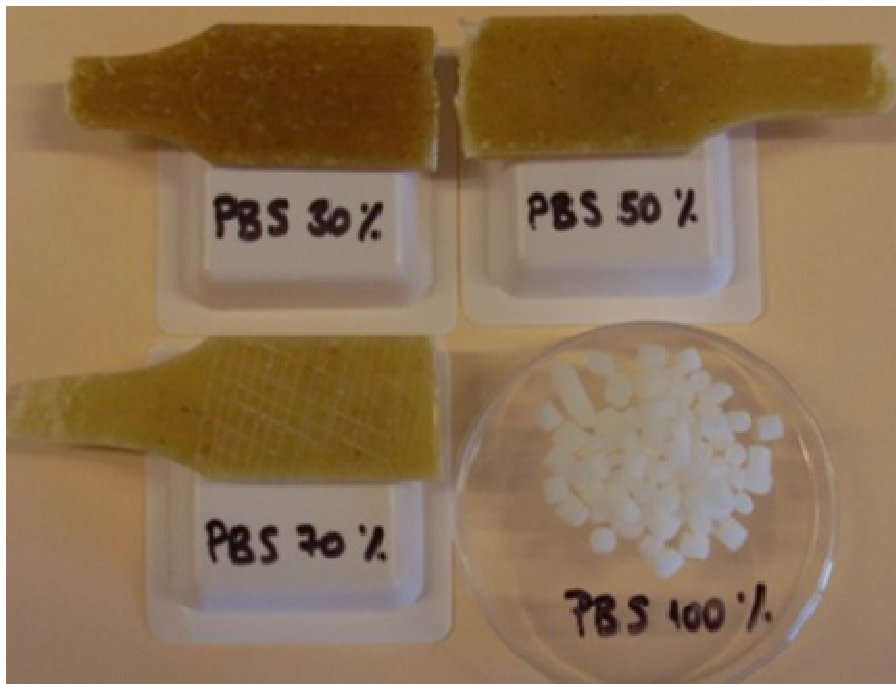


Figure 35 : Les différentes éprouvettes (de type 1A) et les granulés de PBS obtenus par le Pôle Européen de Plasturgie (PEP) pour les différents formulations de farine de maïs, glycérol et PBS.

III. Caractérisation des matériaux à base de farine de maïs

III.1. Mesure des propriétés mécaniques

La caractérisation mécanique des matériaux a été effectuée au PEP en traction sur des éprouvettes de type 1A (figure 36) (longueur de 85 mm, largeur de 10 mm et épaisseur de 4 mm) selon la norme ISO 527-2 (1993) à l'aide d'un tensiomètre Adamel Lhomargy DX30 (Division instrument S.A) équipé d'un capteur de force de 1 kN.

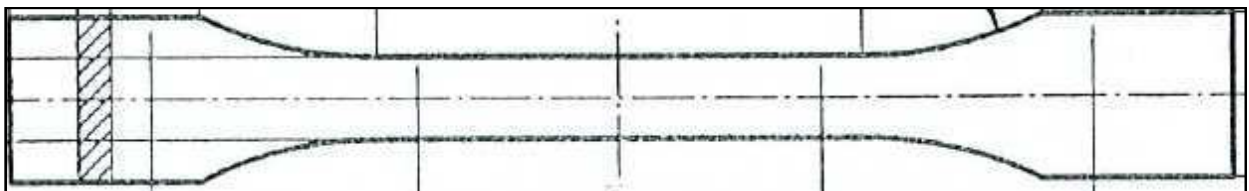


Figure 36 : Eprouvette de type 1A.

Les éprouvettes ont préalablement été conditionnées à 25 °C dans une atmosphère à 50% d'humidité relative (HR) pendant 15 jours. Les éprouvettes ont été fixées entre deux mâchoires puis étirées à une vitesse de 5 mm/min. Les courbes obtenues donnent l'évolution

de la force (contrainte) appliquée sur l'éprouvette en fonction de la déformation. Ces données permettent de calculer le module de Young (Y) et la force à la rupture (FR) selon les formules suivantes :

$$Y(MPa) = \frac{\text{pente de la courbe}}{\text{section de l'éprouvette}}$$

La section (m²) est égale au produit de l'épaisseur et de la largeur de l'éprouvette

La pente de la courbe est en Newton (N)

$$FR(MPa) = \frac{\text{force maximale}}{\text{section de l'éprouvette}}$$

La force maximale est en N.

III.2. Mesure de la porosité par adsorption/désorption

La porosité des matériaux à base de farine de maïs a été déterminée sur des broyats tamisés à 0,2 mm en utilisant le Sorptomat ASAP 2020 (Micromeritics) (à l'Institut Européen des Membranes (IEM) UMR5635 de l'Université Montpellier II). Avant l'analyse, les échantillons ont été dégazés à 80 °C sous une pression de l'ordre de 5 micromètres de Hg jusqu'à l'équilibre. Afin de déterminer l'adsorption et la désorption du gaz, les échantillons ont été immergés dans de l'azote liquide (77 K). Les isothermes d'adsorption/désorption ont été déterminées dans un intervalle de 0,06 à 1 p/p₀ (pression relative). La surface spécifique (S_{BET}) et la valeur de la monocouche (Q_m) ont été calculées à partir de l'équation de BET (Brunauer *et al.*, 1938) avec un intervalle de 0,06-0,2 p/p₀. La surface cumulative, le volume cumulatif et la moyenne des diamètres des pores ont été déterminés par la méthode de BJH (Barett *et al.*, 1951) qui est valable pour des pores de diamètre moyen allant de 17 à 3000 Å.

III.3. Activité de l'eau (a_w) des matériaux à base de farine de maïs

Les mesures de l'activité de l'eau des matériaux ont été réalisées à 25 °C sur des échantillons broyés à 0,2 mm à l'aide d'un a_w-mètre FA-st/1 (GBX Scientifiques Instruments, Romans, France). La cellule de mesure thermorégulée comprend un humidimètre à point de rosée pour permettre la détermination de l'a_w après un temps d'équilibration de l'ambiance de la cellule avec l'échantillon.

III.4. Détermination des isothermes de sorption de l'eau

III.4.1. Technique de l'AutosorpTM

Les essais de sorption ont été réalisés au laboratoire EMMA (Eau - Molécules actives - Macromolécules –Activités, Université de Bourgogne) à l'aide d'un AutosorpTM (Biosystem France), qui est constitué d'une enceinte régulée en température et en humidité pouvant accueillir jusqu'à 30 échantillons simultanément. Cet instrument contient une microbalance de Cahn à compensation électromagnétique, capable de détecter des variations de masse de l'ordre de 0,1 µg (en valeur relative). Cette méthode consiste à mesurer la masse d'eau absorbée par l'échantillon en fonction de la pression. L'échantillon est placé dans une capsule en acier inoxydable. La capsule est ensuite placée dans l'appareil à 25 °C puis l'échantillon est séché jusqu'à une humidité relative de 0%. Une fois que l'échantillon est complètement séché, l'humidité relative dans l'AutosorpTM est augmentée par des paliers de 10% en allant de 0 à 90% HR (humidité relative). Le passage d'une humidité relative à la suivante s'effectue lorsque la masse de l'échantillon ne varie plus.

III.4.2. Méthode des bocalux

500 mg de matériaux broyés et tamisés secs sont pesés avec une précision de 0,1 mg dans des coupelles en plastique. Les coupelles ont ensuite été placées à 25 ± 1 °C en bocalux de verre contenant des solutions salines saturées permettant d'obtenir différentes a_w : KOH ($a_w \sim 0,1$) ; KCH_3CO_2 ($a_w \sim 0,22$) ; K_2CO_3 ($a_w \sim 0,43$) ; $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ($a_w \sim 0,52$) ; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ($a_w \sim 0,6$) ; KCl ($a_w \sim 0,85$) ; $BaCl_2$ ($a_w \sim 0,9$) et K_2SO_4 ($a_w \sim 0,98$). L'absorption d'eau à l'équilibre (g d'eau / g d'échantillon) a été déterminée après séchage des matériaux pendant une semaine à 60 °C.

III.5. Caractérisation par spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier

Les échantillons ont été broyés et tamisés à 0,2 mm puis séchés à 105 °C pendant 24 h. Avant l'analyse, chaque échantillon (0,5%) a été mélangé avec du KBr afin d'obtenir des disques minces. Les pastilles obtenues ont été analysées à l'aide d'un spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (FTLA 2000, ABB process, Monttuel, France). L'absorbance a été mesurée entre 800 et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} . Chaque spectre est la résultante de 32 accumulations. Les spectres ont ensuite subi une normalisation vectorielle et une

correction de ligne de base (correction élastique) à l'aide du logiciel OPUS NT 5.5 (Bruker Optic, Wissenbourg, France).

III.6. Calorimétrie différentielle à balayage

La Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permet de mettre en évidence les changements d'état physique d'échantillons soumis à un traitement thermique. Basé sur la mesure de grandeurs thermomécaniques (quantité de chaleur) des matériaux étudiés, cette technique consiste à mesurer le flux de chaleur nécessaire au maintien à la même température de l'échantillon et d'une référence thermique inerte. Dans le présent travail, cette méthode calorimétrique a permis de déterminer la température de gélatinisation de l'amidon.

La détermination du taux de déstructuration des matériaux à base de farine de maïs a été effectuée à l'aide d'un calorimètre (DSC 2920, TA instrument, Guyancourt, France) à l'Unité Mixte de Recherche INRA-Université de Reims Champagne Ardennes Fractionnement des Agro-Ressources et Emballage (UMR FARE). L'étalonnage de l'appareil a été réalisé par rapport à la température de fusion de l'indium 429,8 K (28,55 J.g⁻¹). Vingt milligrammes d'échantillon préalablement broyé et tamisé à 0,2 mm et 80 mg d'eau ultrapure ont été pesés directement dans un creuset hermétique afin d'éviter la vaporisation d'eau. Le creuset de référence contenait 100 mg d'eau. Les creusets ont été chauffés de -10 à 140 °C à une vitesse de 5 °C.min⁻¹. L'enthalpie endothermique a été calculée à partir de l'intégration de l'aire des pics exprimée en J.g⁻¹ de matière sèche.

III.7. Diffraction des Rayons-X

Les diagrammes de diffraction ont été obtenus suite à l'analyse de 1 g d'échantillon broyé puis tamisé à 0,2 mm à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 Advance (Champs-sur-Marne, France) fonctionnant à 40 kV et 40 mA. Un détecteur à scintillation a été utilisé pour contrôler l'intensité des rayons diffractés. Tous les diffractogrammes ont été normalisés à la même aire totale sous la courbe avec un angle de Bragg situé entre 3° et 30° (2θ). Les analyses ont été effectuées à l'Unité Mixte de Recherche INRA-Université de Reims Champagne Ardennes Fractionnement des Agro-Ressources et Emballage.

III.8. Microscopie confocale à balayage laser

La localisation des protéines dans la farine de maïs avant et après le traitement thermomécanique d'extrusion a été observée par microscopie confocale à balayage (MCBL) au Centre Technologique des Microstructures (CTμ) de l'Université Lyon1. Avant toute observation, une coupe d'une épaisseur de 12,5 μm a été réalisée pour chaque échantillon à

température ambiante à l'aide d'un microtome. Les coupes obtenues ont ensuite été placées sur une lame en verre. La coloration des protéines a été réalisée avec de la fuschine acide (0,01% (v/v)) dissoute dans de l'acide acétique (Chanvrier *et al.*, 2005). Après 5 minutes de coloration les coupes ont été lavées à l'eau distillée. Les coupes ont enfin été recouvertes d'une lamelle fixée avec du vernis à ongle pour empêcher leur dessèchement. Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser CSLM 510 META (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Le microscope confocal à balayage utilise le laser He/Ne à une longueur d'onde de 543 nm.

III.9. Observations en microscopie électronique à balayage de la structuration des matériaux composites à base de farine de maïs et du PBS

Les observations de la structure des matériaux composites ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) (Hitachi S 800 feg) au Centre Technologique des Microstructures à l'Université Lyon1 sur des échantillons surfacés à température ambiante. Le traitement d'images a été effectué avec le logiciel Analyis 3.1.

IV. Evaluation de la biodégradation des matériaux

IV.1. Susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique

IV.1.1. Enzymes utilisées pour l'hydrolyse des matériaux à base de farine de maïs

Les enzymes utilisées au cours de ce travail ont été :

- Une α -amylase d'*Aspergillus oryzae* à 48U.mg⁻¹ (Sigma, A6211) ;
- Une amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* à 31,2 U.mg⁻¹ (Sigma A7420) ;
- Une préparation enzymatique d' α -amylase et d'amyloglucosidase à 24000U.mL⁻¹ (Hazyme® DCL) (DSM Food Specialties, Seclin, France) ;
- Une préparation enzymatique de protéases BREWERS® de *Bacillus amyloliquefaciens*. (DSM Food Specialties, Seclin, France)).

Une unité d' α -amylase (U) et une unité d'amyloglucosidase (U) sont définies respectivement comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 mg de maltose ou de glucose à partir de l'amidon en 3 minutes à 20°C et à pH 6.

IV.1.2. Enzymes utilisées pour l'hydrolyse du PBS

Le polybutylène succinate est hydrolysé par une lipase de *Pseudomonas cepacia* à 50U.mg⁻¹ (Sigma, 62309). Une unité (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µmole d'acide oléique à 40°C et à pH 8,0 en une minute.

IV.1.3. Farine de maïs et matériaux à base de farine de maïs

La farine de maïs (fournie par la société Cérégrain (Bourg-en-Bresse, France)) et les matériaux extrudés préparés par le PEP ont été soumis à des hydrolyses enzymatiques pour évaluer l'effet du traitement thermomécanique d'extrusion sur les cinétiques de ces hydrolyses. Les matériaux obtenus sont des éprouvettes de 4 mm de diamètre, 6 mm de largeur et 150 mm de longueur obtenues par extrusion.

IV.1.4. Traitement des échantillons

Avant l'hydrolyse enzymatique, certains des matériaux ont été broyés avec un broyeur Polymix PX-MFC 90D (Kinematica, Lucerne, Suisse) réglé à une vitesse de 5000 tours par minute pendant 30 s. Les broyats ont ensuite été tamisés avec des tamis à différentes tailles afin d'étudier l'influence de leur granulométrie sur la vitesse d'hydrolyse.

IV.1.5. Conditions de mise en œuvre de l'hydrolyse enzymatique

Des suspensions à 30 g.L⁻¹ de matériau broyé ont été préparées dans un tampon acétate de sodium à 0,05 mol.L⁻¹ (pH 5,5), de l'azide de sodium à 0,02 % (pour éviter tout développement microbien) et 50 ppm de chlorure de calcium (pour stabiliser les enzymes d'origine fongique) (Coma *et al.*, 1995). Les enzymes (α amylase et amyloglucosidase) ont ensuite été ajoutées simultanément à la concentration finale désirée (5 ou 50 U.mL⁻¹). Les tubes contenant le milieu réactionnel ont été incubés dans une enceinte thermostatée à 50 °C (température permettant une activité optimale des enzymes utilisées) sous agitation rotative (6 tours par minute).

IV.1.6. Suivi de la libération de sucres réducteurs au cours de l'hydrolyse enzymatique par méthodes colorimétriques

a. Dosage au DNS

Préparation de la solution de DNS : Pour un litre d'une solution DNS, 10 g d'acide dinitrosalicylique (Sigma, D0550) sont mélangés à 2 g de phénol, 0,5 g de sulfite de sodium (Sigma, S-0505), 500 mL d'une solution de NaOH à 2% et 200 g de tartrate double de sodium et potassium. Une quantité suffisante d'eau distillée est ajoutée pour avoir un volume final de 1 litre. Le mélange est ensuite chauffé sous agitation jusqu'à dissolution complète de tous les

composants. La solution de DNS doit être stockée dans un flacon brun à l'abri de la lumière et renouvelée tous les trois mois.

Les étapes du dosage : L'hydrolyse enzymatique de la farine de maïs et du matériau correspondant a été suivie en mesurant la libération des sucres réducteurs (comme le maltose, le maltotriose et le glucose) dans le milieu réactionnel. Leur dosage a été effectué en employant la méthode colorimétrique de [Miller \(1959\)](#) (DNS). Des prélèvements de 400 µL ont été réalisés à intervalles de temps réguliers, suite auxquels 4 µL d'HCl (0,01M) ont été immédiatement ajoutés pour stopper l'action de l'enzyme. Après 10 min de centrifugation à 10000 g et 4 °C, des dilutions adéquates du surnageant ont été réalisées pour être dans la zone de linéarité de la gamme étalon de 0,1 à 1g de glucose par litre. 600 µL de la solution de DNS ont été ajoutés au surnageant avant chauffage à 100 °C pendant 15 min. Après refroidissement, une lecture de l'absorbance à 640 nm a été réalisée grâce à un spectrophotomètre (JENWAY 6300).

b. Dosage du glucose

Pour un dosage spécifique du glucose, un kit enzymatique de dosage du glucose (Sigma, GAGO-20) a été utilisé. La réaction a lieu en trois étapes ([figure 37](#)).

- La glucose oxydase oxyde le glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène ;
- Le peroxyde d'hydrogène oxyde la o-dianisidine en formant un composé coloré ;
- La o-dianisidine oxydée réagit avec de l'acide sulfurique pour intensifier et stabiliser la coloration.

L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm.

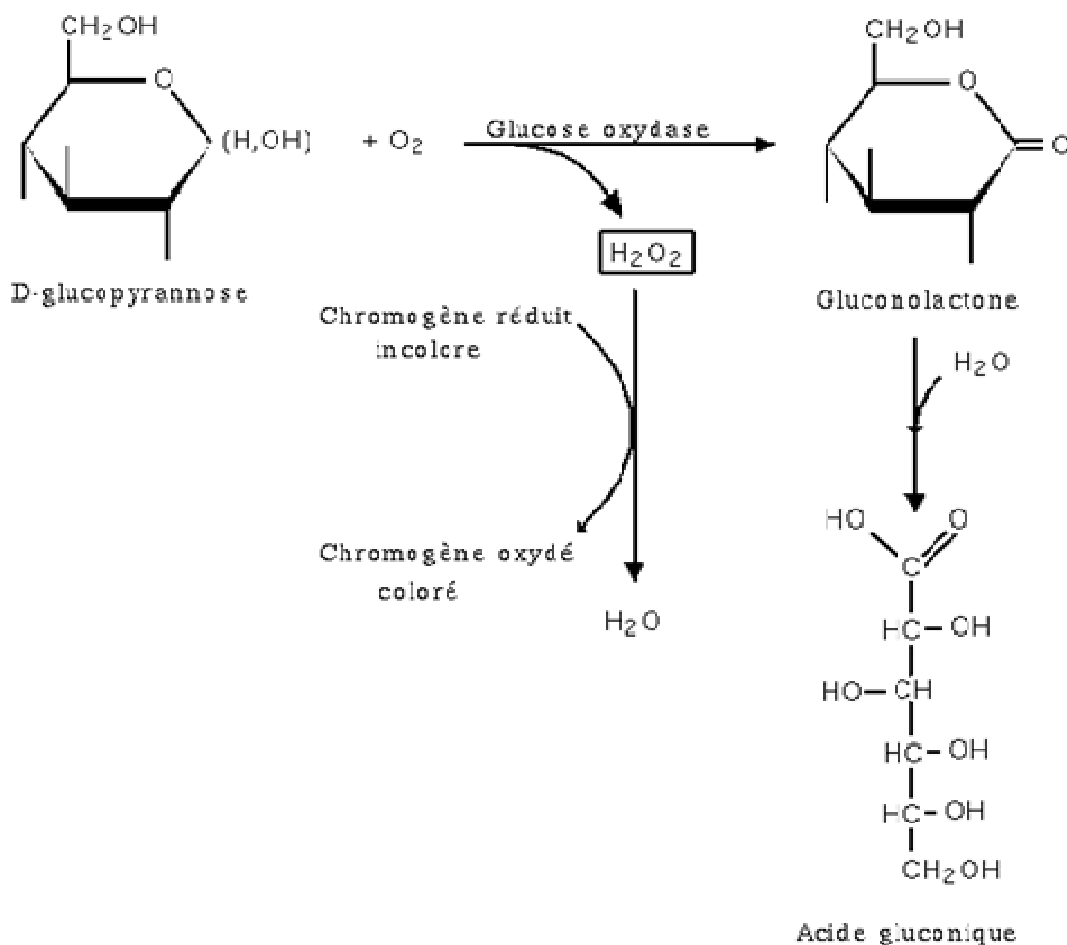


Figure 37 : Principe du dosage du glucose par la glucose oxydase

c. Identification des produits d'hydrolyse de la farine de maïs par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance)

La chaîne d'analyse par HPLC utilisée dans cette étude est composée d'une réserve de solvant (eau ultra pure dégazée aux ultrasons), d'une pompe binaire LC 250 (Perkin Elmer Binary pump 250) dont le débit est réglé à $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, d'un passeur d'échantillons (Perkin Elmer Autosampler series 200), d'une colonne d'analyse (L : 300mm x \varnothing : 7,7mm) PL HI-Plex Na (Varian, Palo Alto, CA, USA) et d'un détecteur réfractométrique Gilson 133 (Middleton, WI, USA). Le tout est relié à un système d'acquisition de données TotalChrom Navigator[®]. Après hydrolyse, les échantillons ont été filtrés à l'aide d'un filtre ayant un diamètre de pore de $0,45 \mu\text{m}$ et placés dans l'échantillonneur. L'identification des pics a été effectuée par étalonnage externe avec le glucose (Dp1) (Fluka, 49139), le maltose (Dp2) (Sigma, M5885), le maltopentose (Dp5) (Sigma, 47876), le maltohexose (Dp6) (Sigma, 47873) et le maltoheptose (Dp7) (Sigma, 47872).

d. Identification des produits l'hydrolyse des matériaux à base du PBS

Le suivi de la libération d'acide succinique au cours de l'hydrolyse enzymatique a été effectué par HPLC en utilisant une colonne Metacarb 87H (L : 300 mm x Ø : 8 mm) à 35 °C. La phase mobile utilisée était composée d'un mélange de méthanol (10%) et d'acide sulfurique à 0,01N (90%). Le débit d'élution était de 0,45 mL.min⁻¹ et le volume d'échantillon injecté de 50 µL. La détection est réalisée grâce à un détecteur UV à 210 nm. L'identification du pic correspondant à l'acide succinique a été effectuée par étalonnage externe avec de l'acide succinique (Sigma, S3674).

IV.2. Biodégradation par voie aérobie en milieu liquide

IV.2.1. Mesure de la demande biologique en oxygène (DBO)

La Demande Biologique en Oxygène (DBO) mesure la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation d'un matériau par des microorganismes dans des respiromètres fermés (Oxitop OC^R 100). Elle nécessite que le matériau soit la seule source de carbone dans un milieu d'essai. La mesure de DBO a été réalisée conformément à la norme ISO 14851.

a. Milieu d'essai

Le milieu d'essai est composé de 10 mL de la solution A (KH₂PO₄ 8,5 g.L⁻¹, K₂HPO₄ 21,75 g.L⁻¹, NH₄Cl 0,5 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 33,4 g.L⁻¹) et de 1 mL des solutions B (MgSO₄ 22,5 g.L⁻¹), C (CaCl₂, 2H₂O 6,1 g.L⁻¹) et D (FeCl₃ 0,25 g.L⁻¹) pour 1 litre de milieu d'essai.

b. Inoculum

L'inoculum utilisé pour cette méthode est constitué d'une boue activée récupérée à la station d'épuration de la ville de Bourg en Bresse. Cette boue est caractérisée par sa matière sèche qui est déterminée après séchage à 105 °C pendant une nuit. La qualité microbiologique de la boue est déterminée par dénombrement sur milieu gélosé PCA pour les bactéries (après incubation à 30 °C pendant 24 heures) et sur milieu Sabouraud pour les moisissures (après incubation à température ambiante pendant 48 heures).

c. La mise en œuvre du test

Dans chaque respiromètre de 500 mL, une quantité de 0,1 g de boue activée a été ajoutée en tant qu'inoculum. Une masse de 55 mg de matériau (broyé puis tamisé à 0,2 mm) a été introduite dans un volume final de 164 mL de milieu d'essai sauf pour le témoin (pour évaluer la respiration endogène des microorganismes). Durant toute la période d'essai, les

respiromètres ont été placés sous agitation à 23 °C. Une aération d'environ 10 minutes des respiromètres a été réalisée pour introduire de l'oxygène dans les milieux d'essais.

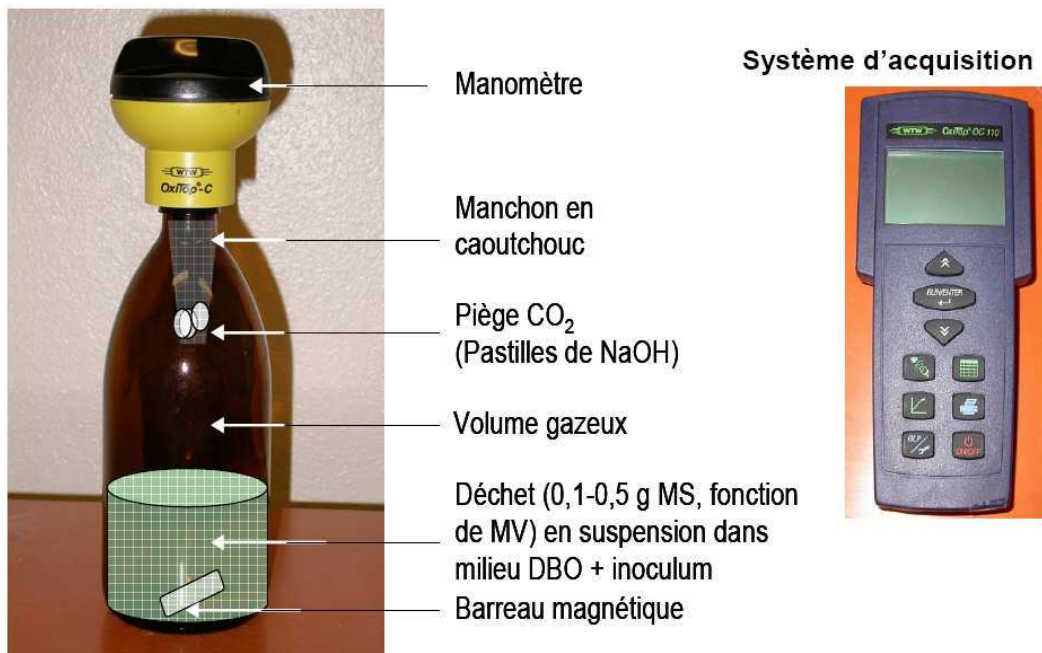


Figure 38 : Différents éléments d'un respiromètre fermé

*MV : matière volatile

*MS : matière sèche

IV.2.2. Isolement et identification des souches dégradant les matériaux à base de farine de maïs par la méthode des zones claires

a. Mise en culture

Après 30 minutes de décantation de la boue (récupérée à la station d'épuration de Bourg en Bresse), 100 µL de surnageant ont été étalés à la surface d'un milieu minéral gélosé mélangé avec du matériau broyé et tamisé à 0,2 mm. Les milieux ont ensuite été incubés à 45°C jusqu'à apparition de zones claires (halos) autour des colonies. Pour réaliser un témoin positif, une souche de *Bacillus licheniformis* (ATCC 27811) productrice d' α -amylase a été utilisée dans les mêmes conditions.

b. Milieu minéral gélosé

Le témoin positif est réalisé sur une gélose à l'amidon et les essais sur un milieu de base dépourvu d'éléments carbonés, additionné du matériau (92% de farine de maïs et 8% de glycérol) broyé et tamisé à 0,2 mm. La composition du milieu de culture est la suivante (pour

2L) : KH_2PO_4 : 4,6 g ; NaH_2PO_4 : 11,6 g ; NH_4Cl : 2 g ; MgSO_4 : 1 g ; FeCl_3 : 0,2 g ; CaCl_2 : 0,01 g ; 30 g d'agar ; 2 L d'eau distillée.

c. Révélation des zones claires

Après incubation, le milieu gélosé est inondé avec du lugol afin de révéler les zones où le matériau est complètement hydrolysé par la souche. Le témoin positif de ce test a été réalisé sur une gélose à l'amidon

d. Identification des souches sélectionnées

Les colonies entourées d'un halo clair sont mises en culture dans un milieu non sélectif PCA (une colonie par boîte). Après incubation à 30°C pendant 24 heures, des colorations de Gram et des tests catalase et oxydase ont été effectués. Les colonies ont ensuite été mises en culture à 30°C pendant 24 heures dans deux milieux sélectifs . L'identification de la souche a été réalisée à l'aide d'une galerie API 50CHB.

IV.3. Compostage

IV.3.1. Caractérisation du compost par dénombrement de la flore totale et mesure du pH

La qualité biologique du compost a été évaluée grâce à un dénombrement des bactéries et des champignons respectivement sur PCA et Sabouraud au début et à la fin du test. Des mesures de pH, selon un rapport substrat/eau de 1/5 (m/m), ont été effectuées au début et la fin du test pour évaluer s'il y a eu une acidification du milieu.

IV.3.2. Evaluation de la biodégradation par mesure de la perte de poids (désintégration)

Selon la norme [ISO/DIS 16929](#), un matériau plastique est dit biodégradable si, au bout de 12 semaines (84 jours) d'enfouissement dans du compost, le pourcentage de désintégration dépasse 90%. Pour étudier la biodégradation du matériau, une série d'échantillons (d'aire spécifique $0,65 \text{ mm}^{-1}$, dimensions de l'éprouvette : 45mm x 18mm x 4mm) ont été enfouis dans du compost (récupéré à la déchetterie de la Tienne, Viriat, France). Ce dernier a été placé dans une enceinte thermostatée à 40°C et à 90 % d'humidité relative. Des retournements des déchets biologiques ont été effectués chaque semaine afin d'éliminer les agglomérats et d'assurer une meilleure circulation de l'air et de l'eau dans le compost. Des mesures de perte de poids des échantillons secs ont été effectuées tous les 15 jours.

IV.3.3. Observation de la morphologie des échantillons par microscopie électronique à balayage environnementale.

La dégradation et la colonisation de la surface du matériau ont été observées avec un microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) Jeol 840A LGS (Jeol ltd, Tokyo, Japon) réalisées au CTμ (Centre Technologique des Microstructures, Université Lyon1). Ceci a permis d'observer l'évolution de la colonisation des échantillons et la dégradation du matériau au cours de l'enfouissement. Pour les observations, les échantillons ont été nettoyés à l'aide d'une brosse sans aucun autre traitement préalable.

IV.3.4. Evaluation de la biodégradation par mesure du dioxyde de carbone libéré

a. L'inoculum

L'inoculum utilisé dans cette étude était un compost de déchets verts âgé de 3 mois. Ce dernier a été broyé et tamisé à l'aide d'un tamis ayant un diamètre de pores de 1 cm pour assurer une bonne circulation de l'air. Six grammes du matériau broyé et tamisé à 0,2 mm ont été mélangés avec 36 g de compost (selon un rapport massique de 1/6 (m/m) (ISO 14855)) d'une humidité relative d'environ 50 % ajustée en ajoutant de l'eau. Le mélange compost - matériau a été introduit dans des jarres (figure 39) d'un litre contenant un bécher rempli avec 40 mL de NaOH (1 mol.L⁻¹). Les jarres ont ensuite été fermées à l'aide des têtes Oxitop et incubées dans une étuve à 35°C. Les jarres ont été ouvertes périodiquement (environ tous les trois jours) pour renouveler la solution de soude et introduire de l'oxygène.

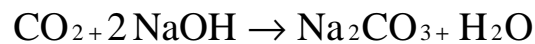


Figure 39 : Les jarres contenant du compost mélangé avec le matériau (LGCIE, EA n° 4126, INSA Lyon-Université Lyon1).

b. Mesure de la production de dioxyde de carbone par piégeage chimique

La mesure de la quantité de dioxyde de carbone produit pendant la respiration des microorganismes en utilisant le matériau comme seule source de carbone est la technique la plus utilisée dans les tests respirométriques (Kale *et al.*, 2007). Le dioxyde de carbone issu de la biodégradation du polymère a été utilisé pour le calcul du pourcentage de minéralisation. Pour cette méthode, l'inoculum microbien utilisé produit naturellement du dioxyde de carbone pendant la respiration endogène, cette valeur doit donc être retranchée. Elle a été déterminée en réalisant un témoin sans polymère.

Le CO₂ a été piégé dans une solution alcaline de soude (1 mol.L⁻¹) en large excès de concentration connue selon la formule suivante :



Le dosage acido-basique de la solution permet de quantifier la soude n'ayant pas réagi avec l'HCl (1 mol.L⁻¹). Par conséquent, la quantité totale de CO₂ dégagée déduite a permis de calculer le pourcentage de biodégradation selon la formule suivante :

$$Dt = \frac{(\text{CO}_2)_T - (\text{CO}_2)_B}{\text{ThCO}_2} \times 100$$

- CO_{2T} : Quantité de CO₂ mesurée dans le flacon contenant le matériau ;
- CO_{2B} : Quantité de CO₂ mesurée dans le flacon témoin sans le matériau ;
- ThCO₂ : Quantité théorique de CO₂ susceptible d'être produite par oxydation totale du matériau calculée selon la formule suivante :

$$\text{ThCO}_2 = M_{\text{tot}} \times C_{\text{tot}} \times \frac{44}{12}$$

- M_{tot} : Masse (g) de matière sèche totale du matériau introduit dans les récipients de compostage ;
- C_{tot} : Teneur relative en carbone organique par rapport à la matière sèche totale contenue dans le matériau (g / g) ;

44 et 12 sont respectivement les masses moléculaires et atomiques relatives du dioxyde de carbone et du carbone.

IV.4. Biodégradation par voie anaérobie en milieu liquide

IV.4.1 Préparation du milieu nutritif

La solution minérale (ou Milieu Nutritif Minéral MNM) est réalisée selon les préconisations de la norme ISO 11734 (1995) relative à la mesure de la biodégradabilité ultime de composés organiques dans les boues de digesteur. Sa composition est la suivante : un tampon phosphate (0,27 g de KH_2PO_4 , 1,12 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ainsi que des sels minéraux (0,53 g de NH_4Cl , 0,075 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,10 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dissous dans 1000 mL d'eau distillée. 3 mL d'une solution d'éléments traces contenant 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de H_3BO_3 , 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ZnCl_2 , 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de CuCl_2 et 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ont ensuite été ajoutés pour obtenir un litre.

IV.4.2. Préparation et caractérisation des échantillons

a. Détermination de la Matière sèche

Les échantillons testés ont préalablement été broyés et tamisés à 0,2 mm. La matière sèche a été déterminée après un passage à 105 °C pendant 24 h.

b. Détermination de la Matière Volatile

La détermination de la Matière Volatile (ou perte au feu, MV) est également une méthode gravimétrique basée sur la perte de masse d'un échantillon sec (échantillon issu de la détermination de la MS) après calcination dans un four à moufle à 550 °C pendant 4 h (perte au feu, NF U 44-160). La perte au feu est souvent considérée comme une estimation approximative de la matière organique, la matière résiduelle après combustion étant elle-même considérée comme la matière minérale contenue dans l'échantillon.

c. Mesure du carbone organique total (COT) des échantillons

Le COT a été déterminé selon la norme NF ISO 10694 (1995) par combustion 950 °C en utilisant un COTmètre solide (OI Analytical 2001). Avant analyse, les échantillons ont été séchés à 110 °C pendant 24 h puis broyés et tamisés à 0,2 mm. Les carbonates ont été éliminés par une attaque acide avec du H_3PO_4 à 15%.

d. Demande chimique en oxygène (DCO) des matériaux à base de farine de maïs

La détermination de la demande chimique en oxygène des matériaux à base de farine de maïs a été réalisée par spectrophotométrie après oxydation en milieu sulfochromique du carbone organique des échantillons séchés et broyés à 0,2 mm. La prise d'essai doit contenir environ 30 à 40 mg de carbone à analyser. Le carbone organique présent dans les échantillons

solides a été oxydé dans un mélange de 10 mL d'une solution de bichromate de potassium à $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ et de 15 mL d'acide sulfurique à une température de $135 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 minutes. Les ions bichromates, qui colorent la solution en rouge-orangé, ont été réduits en ions Cr^{3+} ou (Cr (III)) qui colorent la solution en vert si ceux-ci sont en excès. L'intensité du vert a été mesurée par spectrophotométrie (Portable Data Logging Spectrophotometer, Hach DR/2010, Colorado, USA) à 585 nm. La gamme d'étalonnage a été réalisée en utilisant le glucose comme source de carbone oxydable.

IV.4.3. Préparation et caractérisation de l'inoculum

L'inoculum utilisé pour cette étude est de la boue anaérobie récupérée d'une station d'épuration. La conservation de la boue a été effectuée dans un bioréacteur à $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ où l'activité méthanogène de l'inoculum est suivie par des relevés de pressions de façon automatisée. Pour entretenir la boue (avant utilisation), 30 g d'acétate ont été rajoutés. Avant de lancer le test du potentiel biométhanogène, un jeûne de la boue d'environ 10 jours est préconisé (jusqu'à ce que l'activité biométhanogène de la boue devienne nulle). Une caractérisation de la boue par mesure de la matière sèche et de la matière volatile est nécessaire avant utilisation.

IV.4.4. Lancement du test de mesure du potentiel biométhanogène

Une quantité de 1 g de matière volatile sèche (MVS) de l'échantillon a été introduite dans un flacon de 1000 mL à laquelle 60 mL de boue anaérobie et qsp 600 mL du milieu nutritif ont été rajoutés. A l'aide d'un dispositif de bullage, les flacons ont été purgés sous azote pendant quelques minutes puis fermés avec un septum et une bague en plastique (figure 40). La pression initiale a été mesurée à l'aide d'un manomètre. Les flacons ont ensuite été placés dans une chambre thermostatée à $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Des flacons témoins (sans matériau) contenant la boue et le milieu nutritif ont été réalisés afin de prendre en compte l'activité endogène des boues.

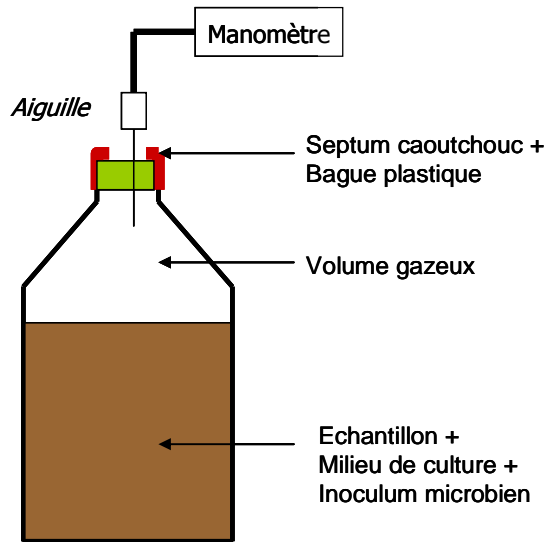


Figure 40 : Dispositif permettant une incubation en anaérobiose (LGCIE, EA n° 4126, INSA Lyon-Université Lyon1).

Le volume de biogaz produit durant la biodégradation du matériau par la boue a été calculé selon la formule ci-dessous déduite à partir de la loi des gaz parfaits.

$$V_{\text{Biogaz}} = V_g \frac{T_0 \Delta P}{T_1 P_1}$$

- V_g : Volume du ciel gazeux (en mL) ;
- ΔP : Différence de pression entre deux jours successifs ($P_2 - P_1$) ;
- P_1 : Pression (en mbar) du 1^{er} jour ;
- T_0 : Température (en Kelvin) du premier jour (dans la chambre d'incubation) ;
- T_1 : Température (en Kelvin) du deuxième jour (dans la chambre d'incubation).

IV.4.5. Mesure et analyse du biogaz produit

Le volume de biogaz produit durant le test a été calculé à partir de la pression mesurée à l'aide du manomètre et de l'analyse de sa composition (CH_4 et CO_2) effectuée à l'aide d'un micro-chromatographe en phase gazeuse (CPG). L'étalon utilisé était un gaz composé de 60% de CH_4 et 40% CO_2 .

V. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant au moins trois échantillons. Les résultats présentés sont les moyennes et écarts-types qui ont été calculés à partir de ces

mesures répétées. Les différences statistiques entre les valeurs mesurées ont été calculées en utilisant le test de Fisher pour des échantillons indépendants (Statgraphics centurion XV_ software, version 15.0.10, Sigmaplus, Levallois-Perret, France).

Chapitre III : matériaux à base de farine de maïs, d'eau et de glycérol

Partie I : Effet du couple formulation/procédé sur les propriétés physico-chimiques des matériaux à base de farine de maïs

Cette partie rassemble les différents résultats de la caractérisation physico-chimique des matériaux à base de farine de maïs, d'eau et de glycérol obtenus par extrusion. L'étude révèle que ces matériaux sont méso- et macro-poreux avec un caractère hygroscopique qui augmente avec l'augmentation du taux de glycérol dans la formulation. Suite aux traitements thermomécaniques d'extrusion la structure initiale de la farine a connu des modifications au niveau de l'amidon et les protéines. Les résultats de la calorimétrie différentielle à balayage, la diffraction aux rayons X, la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier, et la microscopie confocale à balayage laser ont permis d'observer que l'utilisation d'un profil à 3 zones de cisaillement et un taux de glycérol de 10% conduisent à une amorphisation de l'amidon et à la dispersion et l'agrégation des protéines qui entourent l'amidon à l'état native de la farine de maïs. Ces matériaux présentent des propriétés mécaniques trop faibles et vieillissent rapidement lorsque le stockage s'effectue à une température et une humidité relative élevées.

Introduction

La formulation comme le procédé peuvent influencer les propriétés physico-chimiques des matériaux à base de farine de maïs plastifiés avec du glycérol et de l'eau. Avec pour objectif de mettre en évidence une influence couplée formulation/procédé, deux formulations différentes à base de farine de maïs et de 5 ou 10% de glycérol ont été employées pour l'élaboration des matériaux par extrusion-injection. D'un point de vue du procédé, deux types de profil de vis ont été employés lors de l'extrusion : un profil avec une seule zone de cisaillement et un profil avec trois zones de cisaillement.

La composition en azote, carbone, hydrogène et soufre de la farine brute avant tout traitement thermomécanique a été déterminée par analyse élémentaire.

L'effet de la formulation au travers du taux de glycérol et du procédé au travers du cisaillement sur la porosité, l'hygroscopie, la cristallinité, la structure et les propriétés mécaniques (élasticité, contrainte à la rupture et l'allongement à la rupture) des matériaux extrudés puis injectés a été étudié. Pour simplifier l'appellation des différents matériaux la codification suivante est utilisée :

- Les matériaux à 10% de glycérol cisailés 1 et 3 fois sont appelés respectivement 10G1C et 10G3C ;
- Les matériaux à 5% de glycérol cisailés 1 et 3 fois seront dénommés respectivement 5G1C et 5G3C.

I. Composition de la farine de maïs

Les résultats du fractionnement par tamisage de la farine de maïs brute sont présentés sur la figure 41. La farine est composée de 4 fractions différentes. La fraction I ($D > 0,4\text{mm}$) est riche en particules jaunes ainsi qu'en résidus celluloses bruns. La fraction IV ($D < 0,1\text{mm}$) est constituée de fines particules blanches. Les fractions II ($0,2 < D < 0,4 \text{ mm}$) et III ($0,1 < D < 0,2\text{mm}$) présentent des compositions intermédiaires.

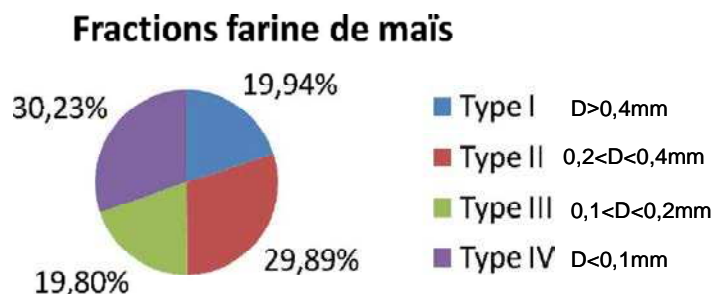


Figure 41 : Les différentes fractions obtenues par tamisage de la farine de maïs brute.

Les résultats de l'analyse élémentaire des différentes fractions correspondant à des particules de granulométries variables de la farine de maïs brute et de ceux de l'amidon sont présentés dans le tableau 6. Ce tableau montre que les différentes fractions de la farine présentent une composition très similaire. En revanche, la teneur en azote dans les fractions décroît progressivement lorsque la taille des particules diminue de 0,4 mm à 0,1 mm pour atteindre une diminution d'environ 20%. Les pourcentages de protéines présentés dans le tableau 1 sont calculés à partir des teneurs en azote ($N \times 6,25$). La fraction I présente un pourcentage de protéines d'environ 10 %. Ce résultat est proche de la valeur (11%) obtenue par Agros *et al.* (1982).

Tableau 6 : Composition élémentaire (en carbone, hydrogène, azote et soufre) des particules de la farine de maïs en fonction de leur taille (fraction I ($D > 0,4$ mm), fraction II ($0,2 < D < 0,4$ mm), fraction III ($0,1 < D < 0,2$ mm) et fraction IV ($D < 0,1$ mm)).

	%Carbone	%Hydrogène	%Azote	%Soufre	%Protéines
Type I	44,72	6,62	1,63	0,18	10,19
Type II	45,21	6,67	1,53	0,19	9,81
Type III	44,82	6,68	1,55	0,24	9,7
Type IV	44,44	6,78	1,35	0,21	8,4
Amidon de maïs (référence)	42,61	6,59	0	0	0

II. Effet du profil de cisaillement et du taux de glycérol sur la porosité des matériaux

La figure 42 présente les isothermes à 77K (-136°C) d'adsorption d'azote des matériaux broyés et tamisés à 0,2 mm à base de farine de maïs. Elles présentent la même allure que les isothermes d'adsorption de l'amidon de maïs à la même température (Juszczak *et al.*, 2002).

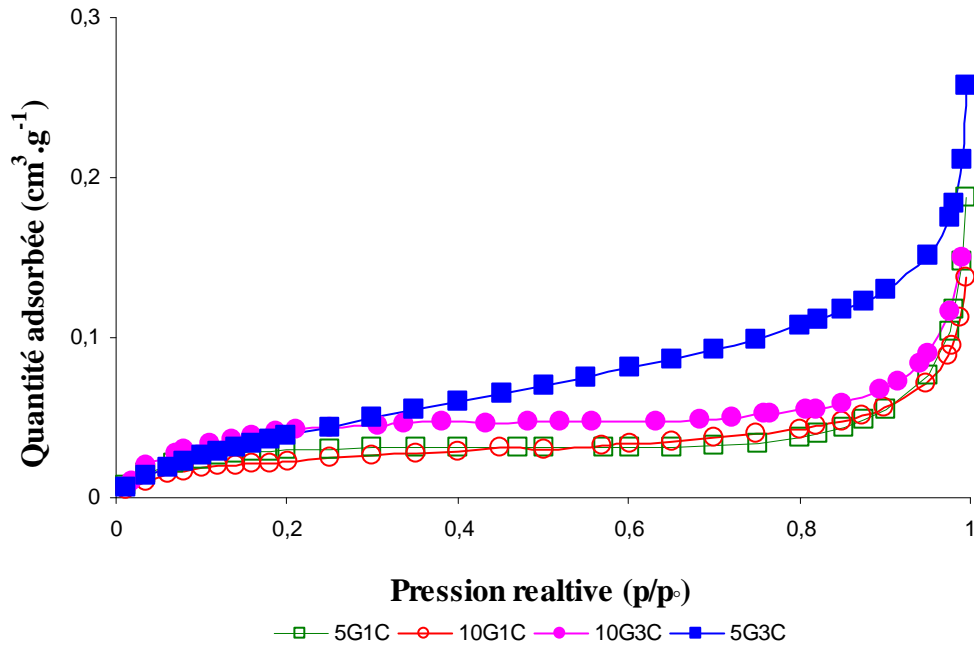


Figure 42 : Isothermes d'adsorption d'azote à 77K des matériaux à base de farine de maïs broyés et tamisés à 0,2 mm.

Selon la classification établie par Brunauer, Emmett et Teller (1938) ces isothermes sont de type II, caractéristiques des matériaux macroporeux ou non poreux. Pour ce type d'isothermes, l'adsorption commence par la formation d'une monocouche de gaz adsorbé à la surface du matériau par des liaisons de van der Waals à faibles pressions relatives (0 à 0,05 p/p_0). L'augmentation de la pression relative $p/p_0 > 0,05$ provoque la formation de multicouches sur la surface externe et dans les macropores des matériaux (Seredych *et al.*, 2003). La deuxième partie de l'isotherme située entre 0,2 et 0,8 p/p_0 correspond à la phase linéaire où le gaz est adsorbé sur la monocouche en formant une multicouche sur le matériau. En revanche, l'augmentation brusque de la quantité de gaz adsorbé à $p/p_0 > 0,9$ est due à la condensation capillaire (Seredych *et al.*, 2003).

Les matériaux broyés présentent des isothermes équivalentes pour les deux taux de glycérol (5 et 10%) pour un seul cisaillement. En revanche le passage de 1 à 3 zones de cisaillement dans le profil d'extrusion augmente considérablement la quantité d'azote adsorbée par le matériau broyé qui passe de 0,18 à 0,25 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ pour le matériau à 5% glycérol et de 0,13 à 0,15 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ pour le matériau à 10% de glycérol. Ce résultat est en accord avec Włodarczyk-Stasiak *et al.* (2009) qui ont observé que l'augmentation de la vitesse de la vis et donc du cisaillement lors de l'extrusion augmente la capacité de l'amidon de pomme de terre à adsorber de l'azote. Il a été mis en évidence au cours de la même étude que l'amidon

extrudé avec une bi-vis adsorbe une quantité d'azote supérieure à celui extrudé avec une mono-vis.

La surface spécifique des matériaux à base de farine de maïs est obtenue par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET) (1938) et les résultats sont présentés dans la [figure 43](#).

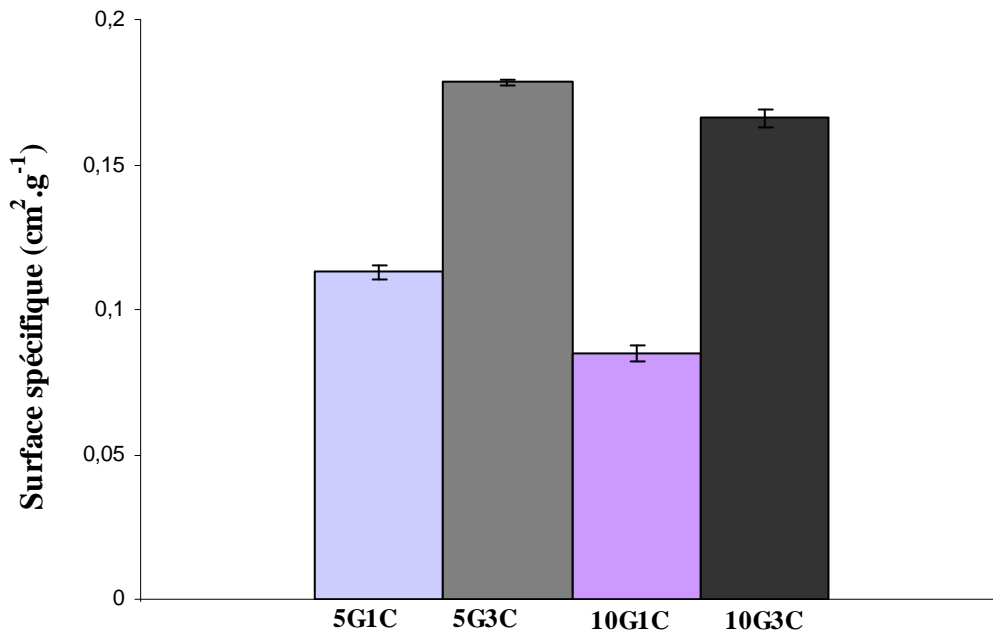


Figure 43 : Evolution de la surface spécifique des matériaux broyés et tamisés à 0,2 mm à base de farine de maïs en fonction du taux de glycérol et du type de cisaillement appliqué. (Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec n=3).

L'analyse des résultats présentés dans la [figure 43](#) révèle que le cisaillement augmente significativement la surface spécifique des matériaux. De plus, pour un même type de cisaillement, les matériaux à 5% de glycérol présentent une surface spécifique légèrement supérieure à celle des matériaux contenant 10% de glycérol. L'augmentation du taux de glycérol conduit à une diminution significative de la surface spécifique. D'après les résultats obtenus par [Wlodarczyk-Stasiak et al. \(2009\)](#), l'augmentation de la vitesse de la bi-vis conduit à une augmentation de la surface spécifique de l'amidon.

La distribution de la taille des pores est obtenue à l'aide de la méthode de BJH ([Barrett, Joyner et Halenda., 1951](#)) et les résultats sont présentés dans la [figure 44](#). Cette dernière présente l'évolution du volume cumulé des pores en fonction de leur taille moyenne.

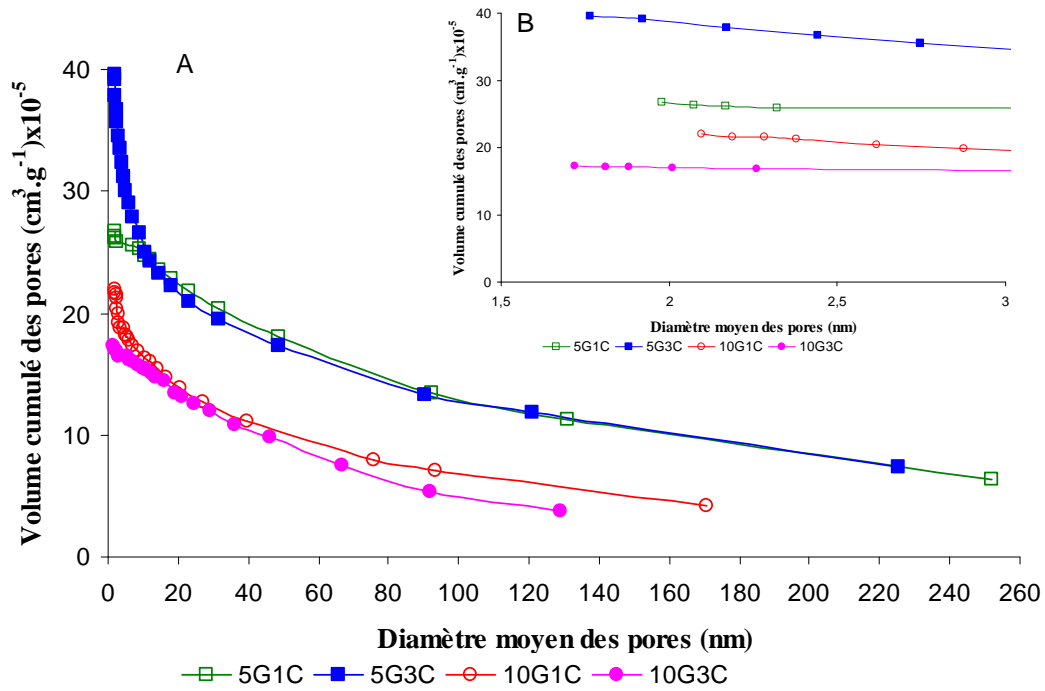


Figure 44 : Evolution du volume cumulé des pores en fonction de diamètre des pores pour les matériaux à base de farine de maïs broyés et tamisés à 0,2 mm (A). B correspond au grossissement de la région de diamètre de pores allant de 1,5 à 3 nm.

D'après les résultats obtenus, le volume cumulé des pores est très élevé pour des diamètres compris entre 2 et 40 nm puis diminue considérablement pour des diamètres de 40 à 260 nm. D'après la classification des pores, les matériaux contiennent plus de mésopores (2 à 50 nm) que de macropores (de plus de 50 nm de diamètres). Le volume maximal des pores pour les matériaux 10G1C et 5G1C se situe entre 2 et 2,5 nm. En revanche, pour les matériaux 10G3C et 5G3C le maximum de volume de pore correspond à des diamètres de pores compris entre 1,7 et 2 nm. Cela est en adéquation avec les résultats de [Włodarczyk-Stasiak et al. \(2009\)](#) qui ont montré que l'amidon de pomme de terre natif et extrudé présente un maximum de volume pour des pores de diamètre compris entre 2 et 2,5 nm avec une apparition des volumes de diamètres de pore compris entre 1,7 et 2 nm pour les extrudats obtenus avec une bi-vis. La même étude a mis en évidence qu'une vitesse élevée de la bi-vis fait augmenter le volume des pores de diamètre inférieur à 1,7 nm.

Par ailleurs, ces résultats révèlent que l'augmentation du nombre de cisaillements pour un taux de glycérol donné va dans le sens d'une augmentation des micropores (< 2 nm) et diminue le nombre de macropores. Par ailleurs, l'augmentation du taux de glycérol contribue à la diminution des macropores et engendre une porosité plus homogène.

III. Influence du traitement thermomécanique et du glycérol sur les isothermes de sorption de l'eau des matériaux

La figure 45 présente les isothermes de sorption de l'eau (à 25°C) à différentes a_w de la farine de maïs native et des différents matériaux (à base de farine de maïs, d'eau et de glycérol) extrudés-injectés broyés et tamisés à 0,2 mm.

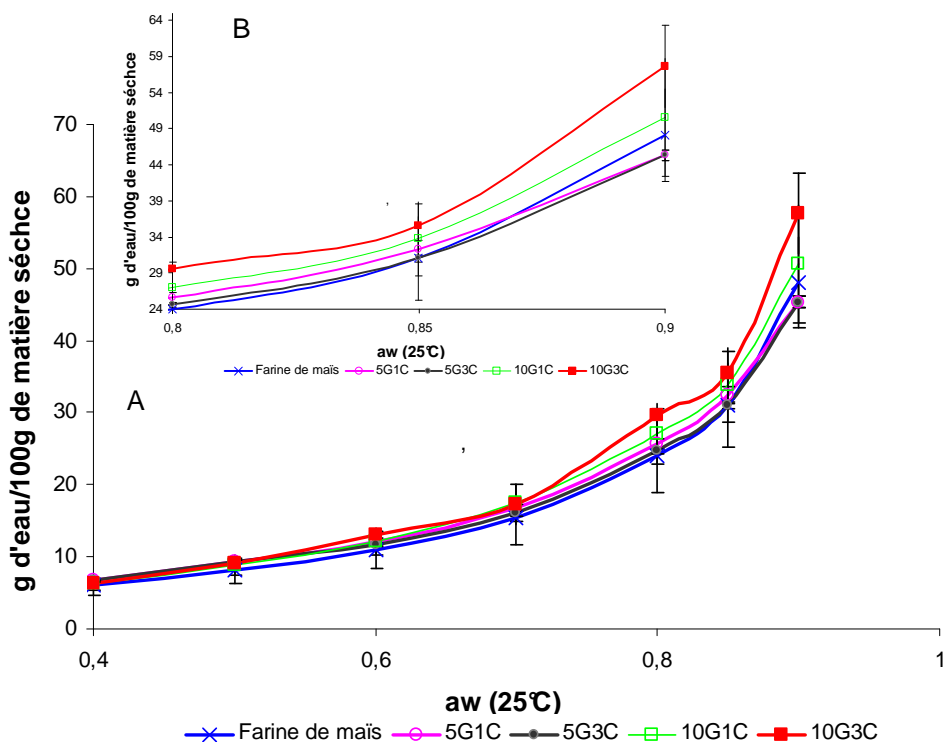


Figure 45 : Isothermes de sorption à 25°C de la farine de maïs native et des matériaux extrudés à base de farine de maïs (broyés et tamisés à 0,2 mm) à 5% et 10 % de glycérol cisailés une ou trois fois (A) et le B correspond au grossissement de la région des a_w comprises entre 0,8 et 0,9.

L'analyse de ces résultats montre que les isothermes sont très semblables jusqu'à une a_w de 0,6. En revanche, au delà de 0,7 une différence entre les isothermes est observée. Cette différence dans la quantité de l'eau absorbée sur les différents matériaux est liée au taux de glycérol incorporé. Les matériaux à teneur plus élevée en glycérol (10% glycérol) absorbent plus d'eau que les matériaux à 5% glycérol et que la farine de maïs native. Il a été démontré qu'un taux élevé en glycérol fait augmenter la capacité d'absorption d'eau par les matériaux à base d'amidon (Lourdin *et al.*, 1997). Dans le même contexte, d'autres études ont mis en évidence qu'à fortes humidités relatives (HR), les films plastifiés avec du glycérol présentent un taux d'humidité très élevé par rapport aux films non plastifiés (Wang *et al.*, 2004). En comparaison à d'autres plastifiants, le glycérol présente une bonne affinité pour l'eau (Godbillot *et al.*, 2006).

En plus du taux de glycérol, la contrainte mécanique appliquée lors de l'extrusion semble influencer la quantité d'eau absorbée par les matériaux. L'augmentation du nombre de zones de cisaillement dans le profil d'extrusion de 1 à 3 augmente ainsi la quantité d'eau absorbée à une a_w de 0,9 de 50 à 57 g d'eau pour 100g de matériau (base sèche) à 10% de glycérol. Cette augmentation de la quantité d'eau absorbée par les matériaux cisailés 3 fois est probablement à relier à une plus grande diminution des formes cristallines de l'amidon au profit d'une structure amorphe pour laquelle la quantité d'eau absorbée est plus sensible aux variations de l'humidité de l'ambiance. En revanche, pour les matériaux à 5% de glycérol le taux de cisaillement ne présente pas d'effet significatif sur le pourcentage d'eau absorbé à une a_w de 0,9 (45 g d'eau pour 100 g de matériau quelque soit le nombre de zone de cisaillement).

IV. Caractérisation structurale des matériaux à base de farine de maïs par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

Afin d'étudier l'effet du nombre de zones de cisaillement lors de l'extrusion (paramètre relatif au procédé) et du pourcentage de glycérol (paramètre relatif à la formulation) sur la structure des matériaux à base de farine de maïs, une analyse par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) a été effectuée. La figure 46 présente les spectres dans le moyen infra-rouge de la farine de maïs native et des matériaux à 10% glycérol.

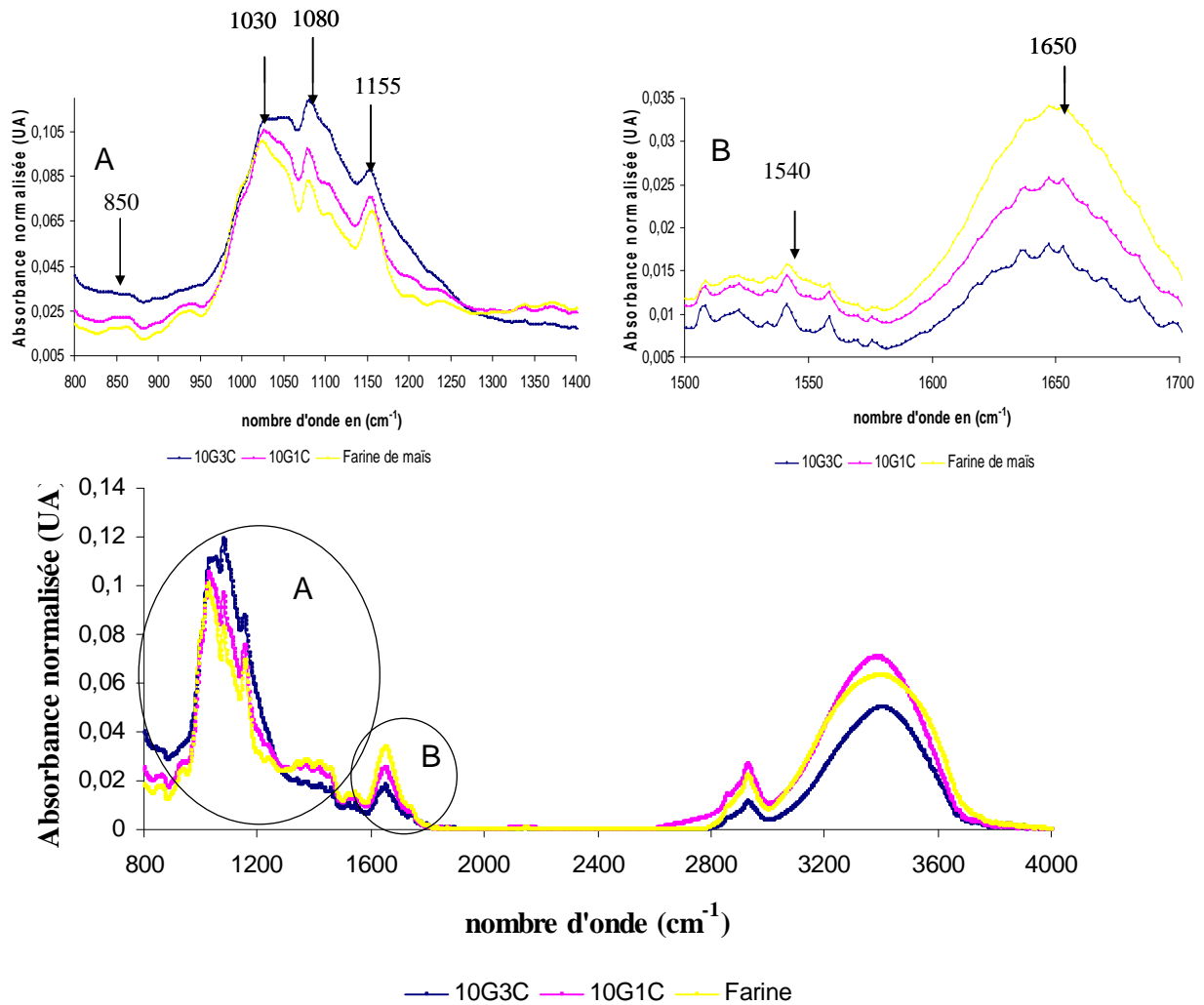


Figure 46 : Spectres IR moyens normalisés de la farine de maïs et des matériaux extrudés à 10% de glycérol cisailés 1 (10G1C) ou 3 fois (10G3C). La figure 47A représente la région spectrale de 800 à 1350 cm^{-1} et la figure 47B représente la région spectrale de 1500 à 1700 cm^{-1} qui correspond aux bandes amide I et amide II caractéristiques de la structure secondaire des protéines.

Le matériau 10G3C présente une absorbance supérieure aux autres (farine native et 10G1C) à 850 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} et 1155 cm^{-1} . Cela est dû à l'augmentation de la vibration des liaisons C-O-H et C-O caractéristiques du glucose (Chen *et al.*, 2008). Selon Bello-Perez *et al.* (2005), la région située entre 800 et 1200 cm^{-1} reflète bien les changements de conformation de l'amidon. D'après nos résultats, l'augmentation du nombre de cisaillements provoque un changement très prononcé au niveau de la structure de l'amidon qui se manifeste par une augmentation de l'absorbance à 850 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} et 1155 cm^{-1} . Cette augmentation est liée à la diminution du degré de polymérisation de l'amidon (Bellon-Maurel *et al.*, 1995). D'autres études ont montré que l'intensité de cisaillement appliquée lors de l'extrusion de l'amidon fait

diminuer sa masse molaire et augmente son taux de gélatinisation (Willet *et al.*, 1997; Barron *et al.*, 2001).

L'analyse de la région située entre 1500 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} montre une différence entre le matériau 10G3C, le 10G1C et la farine de maïs native au niveau des pics à 1540 (liaisons N-H) et 1650 cm^{-1} (liaisons C=O) (figure 46B). Le spectre de la farine de maïs native présente une intensité supérieure aux deux autres. Les deux pics observés à 1540 et 1650 cm^{-1} correspondent respectivement aux régions des amides II et amides I (Cremer *et al.*, 2003). Ces résultats montrent que suite à l'extrusion, les protéines de la farine de maïs ont subi une dénaturation ou une agrégation. Ce résultat est en adéquation avec les travaux de Fabien *et al.* (2000) qui ont montré que la dénaturation et l'agrégation des protéines peuvent se produire lors de l'extrusion. Selon ces auteurs, la région comprise entre 1600 et 1700 cm^{-1} donne une information sur la structure secondaire des protéines. La structure secondaire en hélice α est caractérisée par une absorbance maximale des liaisons amides entre 1650 et 1658 cm^{-1} . Dans notre cas, la protéine majoritaire de la farine de maïs est la zéine. D'après Chen Yao *et al.* (2009), la structure de la zéine présente une absorbance maximale à 1656 cm^{-1} (amide I) et à 1540 cm^{-1} (amide II) indiquant que la structure en hélice α est prédominante.

En revanche, pour les matériaux à 5% glycérol, les spectres (figure 47) obtenus ne révèlent aucune différence significative entre la farine de maïs native et les matériaux extrudés et cisailés 1 (5G1C) et 3 fois (5G3C). Ces observations semblent donc indiquer qu'un taux élevé (10%) en glycérol augmente la déstructuration de l'amidon et des protéines durant le processus d'extrusion.

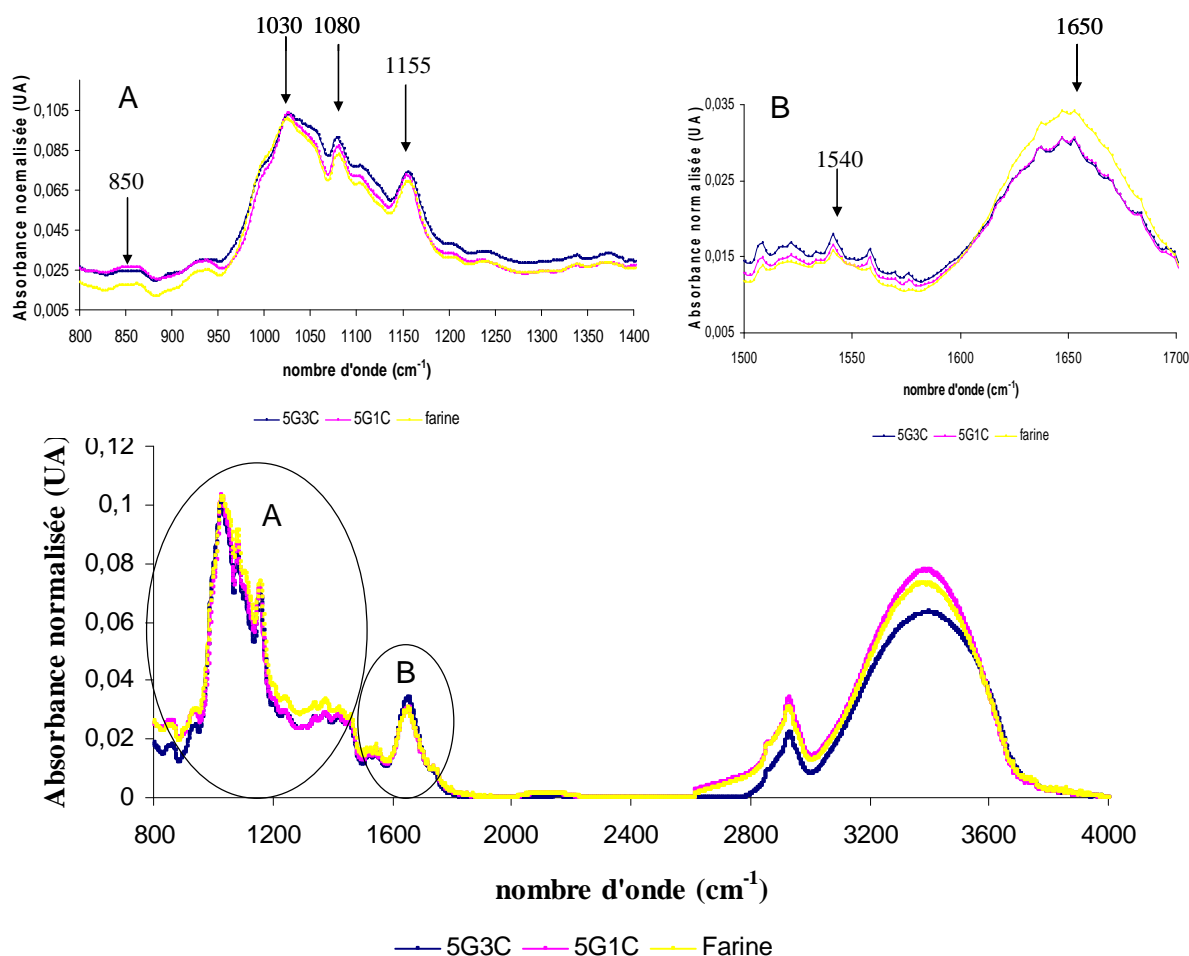


Figure 47 : Spectres IR moyens normalisés de la farine de maïs et des matériaux extrudés à 10% de glycérol cisailés une (5G1C) ou 3 fois (5G3C). La figure 48A représente la région spectrale de 800 à 1350 cm^{-1} et la figure 48B représente la région spectrale de 1500 à 1700 cm^{-1} qui correspond aux bandes amide I et amide II caractéristiques de la structure secondaire des protéines.

V. Microscopie confocale à balayage laser

La structure et l'organisation des protéines dans la farine de maïs et dans les matériaux extrudés ont été observées par microscopie confocale à balayage laser après marquage des protéines par la fushine acide selon le protocole décrit par [Chanvrier *et al.* \(2005\)](#). Pour la farine de maïs native ([figures 48 a et b](#)) les protéines forment une matrice continue autour des grains d'amidon. En revanche, pour les matériaux extrudés ([figures 48 c, d, e, f, g, h, i et j](#)), la taille de cette matrice diminue considérablement avec l'apparition d'agrégats.

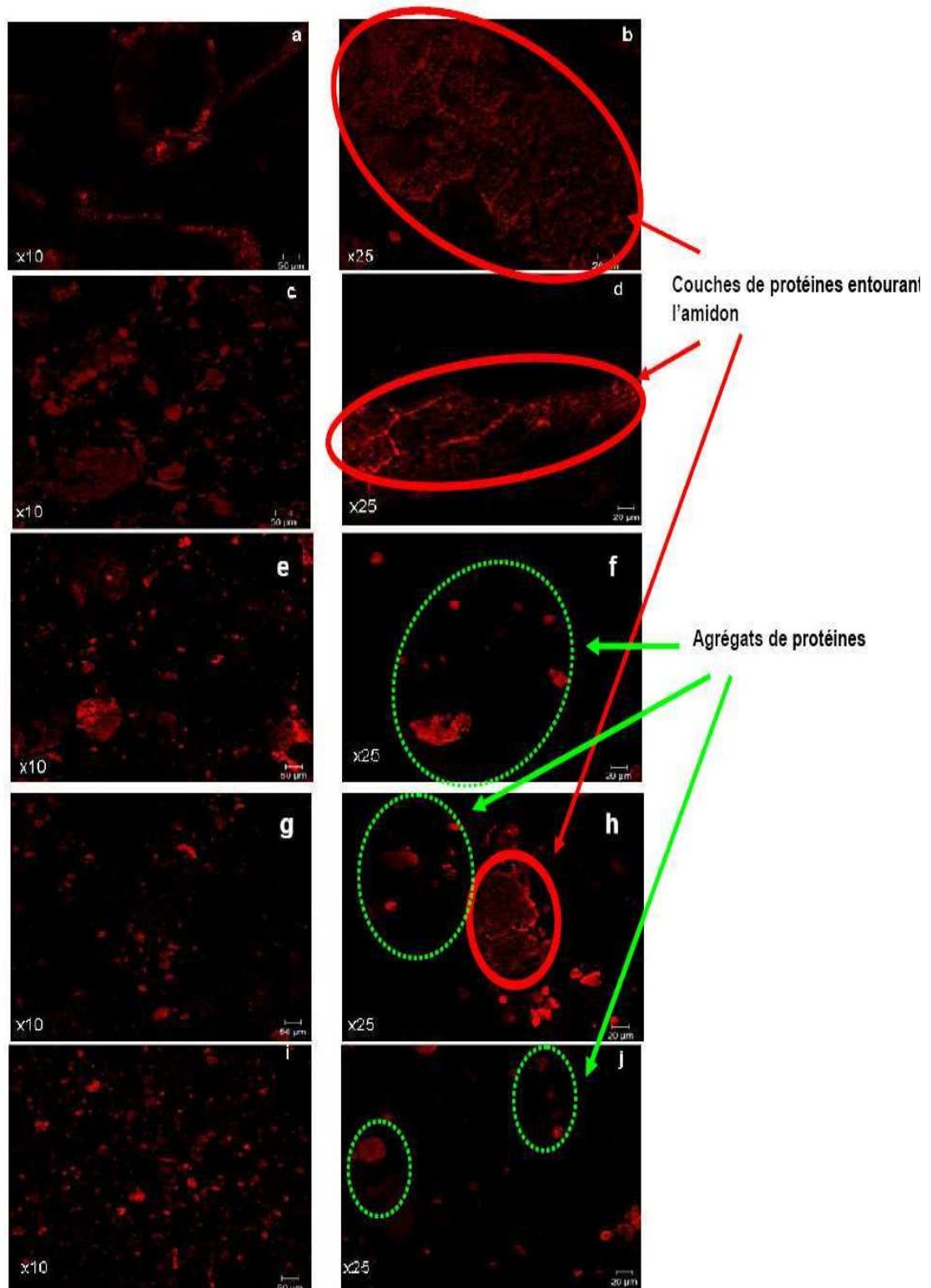


Figure 48 : Observations en microscopie confocale à balayage laser de la farine de maïs native (a (grossissement x10) et b (grossissement x 25)) et des matériaux à 5 et 10% de glycérol (5G1C (c (grossissement x10) et d (grossissement x 25)), 5G3C (e (grossissement x10) et f(grossissement x 25)), 10G1C (g (grossissement x10) et h (grossissement x 25)) et 10G3C (i (grossissement x10) et j (grossissement x 25))).

Ces résultats sont en accord avec les observations effectuées par [Chanvrier *et al.* \(2005\)](#). La comparaison entre les matériaux cisailés une et trois fois montre que la phase continue des protéines disparaît complètement lorsque le profil d'extrusion comporte 3 zones de cisaillement. Ces observations montrent que l'augmentation de la contrainte mécanique (nombre de zones de cisaillement) durant l'extrusion conduit à une augmentation significative de la déstructuration et de l'agrégation des protéines. L'observation des images montre également que pour un degré de cisaillement égal, l'agrégation des protéines est plus marquée en présence de 10% de glycérol que de 5% de glycérol dans la formulation. En plus de la contrainte mécanique, le glycérol favoriserait donc également la déstructuration et la dispersion des protéines.

Ces observations en microscopie confocale à balayage laser sont cohérentes avec les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge qui ont révélé une diminution importante de l'intensité du pic correspondant aux bandes amide I pour les matériaux formulés avec 10% de glycérol comme plastifiant.

VI. Calorimétrie différentielle à balayage et diffraction des rayons X

La [figure 49](#) présente les thermogrammes obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) pour la farine de maïs native et les matériaux extrudés et injectés. Les résultats présentés ont permis de déterminer les valeurs d'enthalpie de gélatinisation (ΔH) de l'amidon de maïs (pic endothermique). Ils peuvent être classés selon l'ordre suivant : $\Delta H_{\text{farine native}} (3,6 \text{ J.g}^{-1}) > \Delta H_{10G1C} (0,35 \text{ J.g}^{-1}) > \Delta H_{5G1C} (0,07 \text{ J.g}^{-1}) > \Delta H_{10G3C} \text{ et } \Delta H_{5G3C} (0 \text{ J.g}^{-1})$.

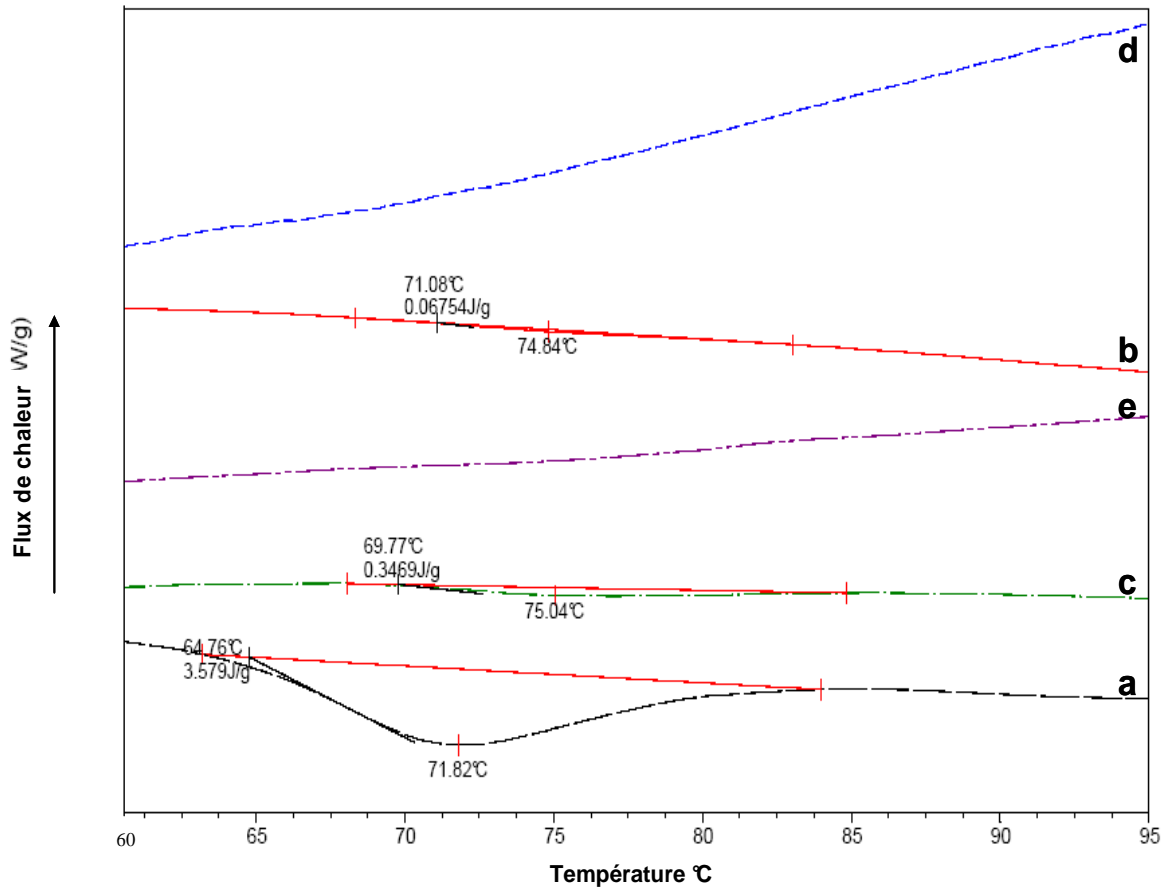


Figure 49 : Thermogrammes de la farine de maïs native (a), et des échantillons (matériaux obtenus par extrusion puis injection d'un mélange de farine de maïs et de glycérol) 5G1C (b), 10G1 C (c), 5G3C (d) et 10G3C (e).

L'analyse de ces résultats met en évidence que quel que soit le taux de glycérol (5 ou 10%) et le nombre de zones cisaillement (1 ou 3), le traitement thermomécanique d'extrusion-injection conduit à une importante diminution de la valeur de ΔH . L'enthalpie de gélatinisation résiduelle par rapport à la farine native est de l'ordre de 8% pour le matériau 10G1C contre seulement 1,5 % pour le matériau 5G1C. Cependant, les matériaux à 5 et 10% de glycérol ayant subi 3 zones de cisaillement lors de l'extrusion (5G3C et 10G3C) présentent une enthalpie de gélatinisation proche de zéro et peuvent donc être considérés comme quasiment amorphes. Ces résultats sont confirmés par l'analyse qualitative par diffraction des rayons X (RX) présentée dans [la figure 50](#).

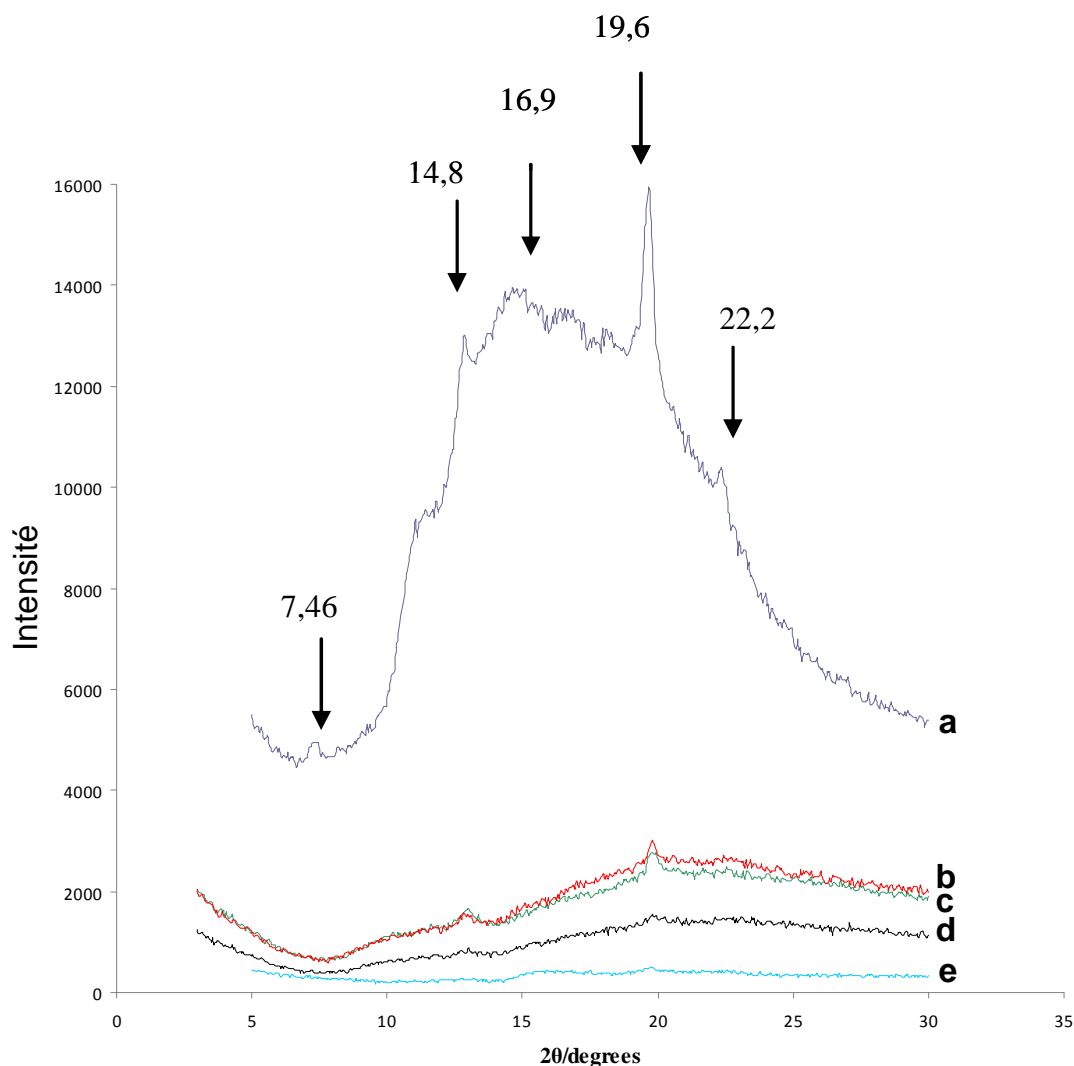


Figure 50 : Diagrammes de diffraction des rayons X de la farine de maïs native(a), 5G1C (b), 10G1C (c), 5G3C (d) et 10G3C (e).

Le diagramme de diffraction (figure 50) obtenu par analyse des rayons X de la farine de maïs native montre des pics à $2\theta = 7,4^\circ$, $14,8^\circ$, $16,9^\circ$, $19,6^\circ$ et $22,2^\circ$ et qui diminuent considérablement après extrusion-injection. Selon [Chen et al ., \(2008\)](#) les pics à $2\theta = 14,8^\circ$, $22,2^\circ$ correspondent à un allomorphe de type A (une forme cristalline de l'amidon) et les pics à $2\theta = 16,9^\circ$, $19,6^\circ$ à un allomorphe de type B (une forme cristalline de l'amidon).

La comparaison entre le matériau 10G1C et 5G1C à $2\theta = 19,6^\circ$ confirme que le degré de cristallinité résiduelle de 10G1C ($\Delta H = 0,34 \text{ J.g}^{-1}$) est relativement supérieur à celui de 5G1C ($\Delta H = 0,07 \text{ J.g}^{-1}$). Cependant, pour les matériaux cisailés 3 fois (ΔH_{10G3C} et ΔH_{5G3C}), les différents pics observés pour la farine native ont totalement disparu ce qui confirme que ces deux matériaux sont amorphes. Les résultats obtenus par DSC et RX considérés ensemble, montrent que l'augmentation de la contrainte mécanique lors de l'extrusion rend l'amidon de

la farine de maïs complètement amorphe. D'autre part, le degré de cristallinité résiduelle, après le traitement thermomécanique, est significativement affecté par le taux de glycérol. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par [Van Soest et al. \(1996\)](#) qui a montré que le ΔH résiduel augmente avec l'augmentation du taux de glycérol.

VII. Rétrogradation de l'amidon de la farine de maïs et stabilité des matériaux dans le temps

La stabilité dans le temps des matériaux à base de farine de maïs a été évaluée par calorimétrie différentielle à balayage pendant le stockage des éprouvettes à 60°C (température supérieure à la T_g de l'amidon) dans un environnement à 70% HR pendant 16 jours pour accélérer le phénomène de vieillissement. [La figure 51](#) présente les thermogrammes des matériaux à 5 et 10% de glycérol ayant subi un seul cisaillement.

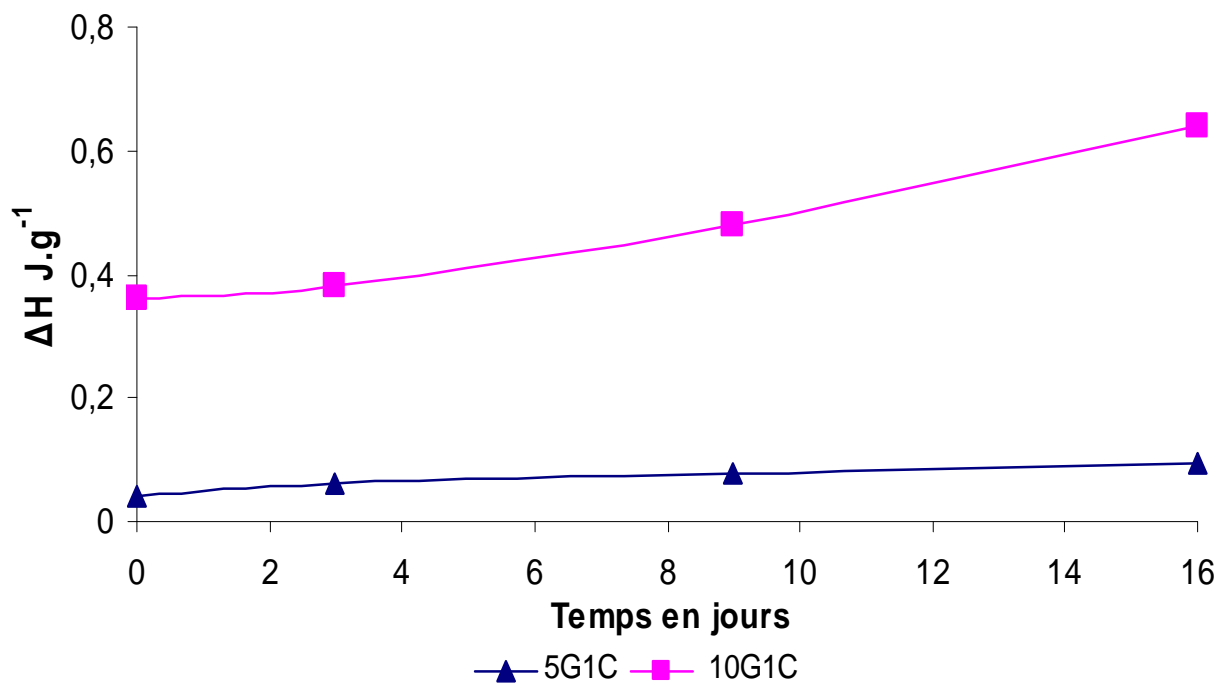


Figure 51 : Evolution de l'enthalpie de gélatinisation (ΔH) des matériaux durant 16 jours de stockage à 60°C et 70% d'humidité relative (HR).

L'analyse de ces résultats montre une augmentation plus importante de l'enthalpie endothermique dans le temps pour le matériau à 10% de glycérol que pour celui à 5%. Ceci indique que le vieillissement par rétrogradation est plus marqué pour le matériau à 10% de glycérol. Cela montre que le taux de glycérol joue un rôle important dans le phénomène de

rétrogradation (recristallisation) de l'amidon de la farine de maïs en fonction du temps. Il a été montré que l'augmentation du taux de glycérol accélère la recristallisation de l'amidon quand la température de stockage est supérieure à celle de la température de transition vitreuse (Tg) (Van Soest *et al.*, 1996). A faible teneur en eau, le glycérol interagit avec l'amidon en augmentant la mobilité de ses chaînes macromoléculaires ce qui influence les propriétés des réseaux formés (Van Soest *et al.*, 1996). Par exemple le stockage à 20°C et 90% HR de l'amidon mélangé à 20 % de glycérol pendant 10 jours est suffisant pour atteindre un taux de cristallinité de 35% (Van Soest *et al.*, 1996).

VIII. Propriétés mécaniques

Dans le contexte des emballages, les propriétés mécaniques sont importantes pour la protection de l'intégrité des aliments. Notre objectif est d'étudier l'influence à la fois du taux de glycérol et du taux de cisaillement sur l'évolution des propriétés mécaniques. Pour cela, le module de Young (module d'élasticité), la contrainte à la rupture et le pourcentage de déformation (allongement) à la rupture ont été mesurés. La caractérisation mécanique des matériaux a été effectuée en traction sur des éprouvettes de type 1A au PEP (Oyonnax, France) selon la norme ISO 527-2 (1993).

Le module de Young

L'évolution du module de Young selon le taux de glycérol dans la formulation des matériaux à base de farine de maïs et le nombre de zones de cisaillement employé est présentée dans la figure 52.

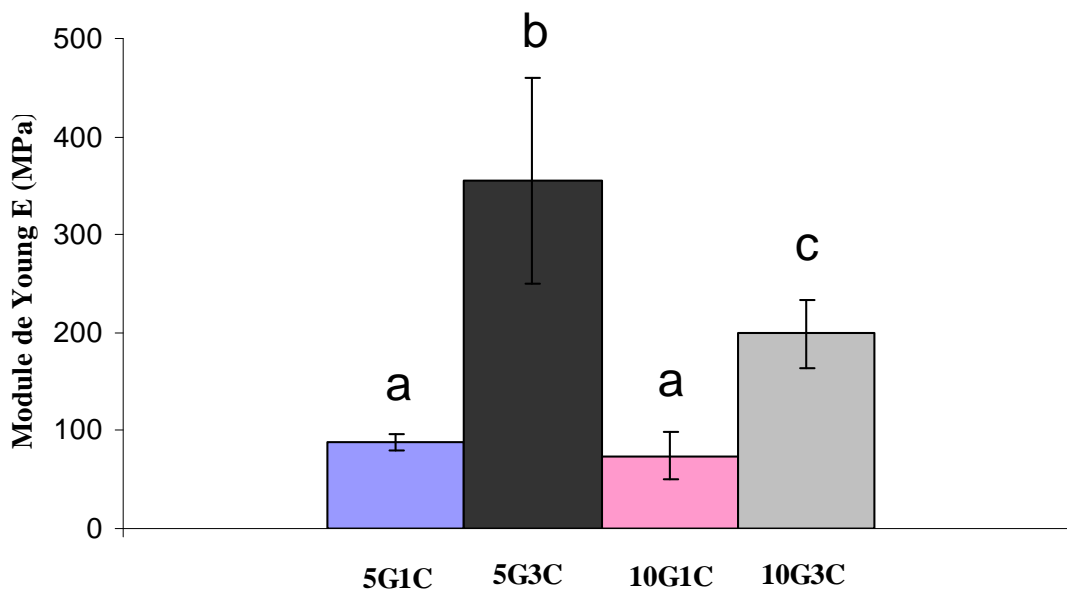


Figure 52 : Module de Young pour les matériaux 5G1C, 10G1C, 5G3C et 10G3C à 50% HR et à 23°C. Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec $n=3$ et les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher ($P < 0,05$).

L'analyse des résultats montre que l'utilisation d'un profil à 3 zones de cisaillement fait augmenter très significativement le module de Young et ce d'autant plus que la quantité de plastifiant ajoutée est faible (figure 52). Pour des matériaux à base d'amidon, une diminution du module de Young lorsque le cisaillement augmente est habituellement observée : celle-ci est la conséquence du plus grand nombre de coupures des chaînes d'amidon. Dans le cas présent avec des matériaux à base de farine de maïs, c'est au contraire une augmentation du module de Young qui est observée. Ce résultat apparemment contradictoire pourrait s'expliquer par une compétition entre le phénomène de coupure de chaînes et une meilleure homogénéisation des différentes phases structurales de la farine de maïs. Pour les matériaux obtenus en utilisant une seule zone de cisaillement (5G1C et 10G1C), l'augmentation du taux de glycérol n'a pas d'effet significatif. A taux faible en glycérol (5%), les matériaux sont rigides et présentent par conséquent un module de Young plus élevé. Habituellement, l'augmentation du taux de glycérol conduit à un phénomène de plastification qui provoque une diminution du module de Young. Les travaux de Dias *et al.* (2010) ont mis en évidence une diminution du module de Young pour des films à base de farine de riz mélangée à 30% de glycérol (560 MPa) par rapport à ceux contenant 20% de glycérol (22 MPa). Dans notre cas, cette diminution est observée lorsque le taux de glycérol passe de 5 à 10% uniquement lorsqu'un profil de vis à 3 cisaillements est appliqué.

- La contrainte à la rupture

La figure 53 présente les valeurs de la contrainte à la rupture des matériaux à base de farine de maïs.

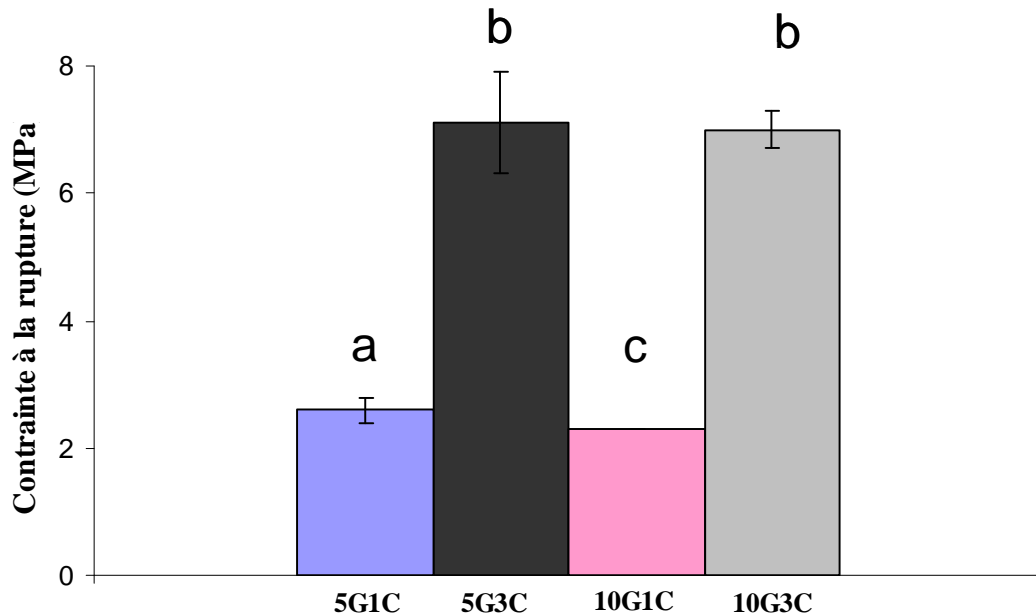


Figure 53 : Contrainte à la rupture pour les matériaux 5G1C, 10G1C, 5G3C et 10G3C à 50% HR et à 23°C. Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec n=3 et les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher ($P < 0,05$).

Contrairement aux résultats précédents sur le module de Young, les résultats sur la contrainte à la rupture (figure 53) ne mettent pas en évidence d'effet couplé formulation/procédé. En effet, les résultats obtenus montrent que les matériaux ayant subi 3 zones de cisaillement présentent des contraintes à la rupture nettement plus élevées et ce indépendamment de la formulation. L'augmentation de la contrainte mécanique au travers du nombre de zones de cisaillement durant l'extrusion conduit probablement à une meilleure homogénéisation des différentes phases de la farine de maïs et à une bonne déstructuration de l'amidon. En revanche, le taux de glycérol n'a pas ou peu affecté la contrainte à la rupture des matériaux ce qui est en contradiction avec [Dias et al. \(2010\)](#) qui ont mis en évidence une diminution significative de la contrainte à la rupture en augmentant le taux de glycérol de 20 à 30% dans les films à base de la farine de riz. Cependant, notons que les taux de glycérol employés dans notre cas sont beaucoup plus faibles ce qui peut contribuer à expliquer cette différence.

- Allongement à la rupture

Les valeurs d'allongement à la rupture obtenues pour les matériaux à base de farine de maïs sont présentées au niveau de la figure 54.

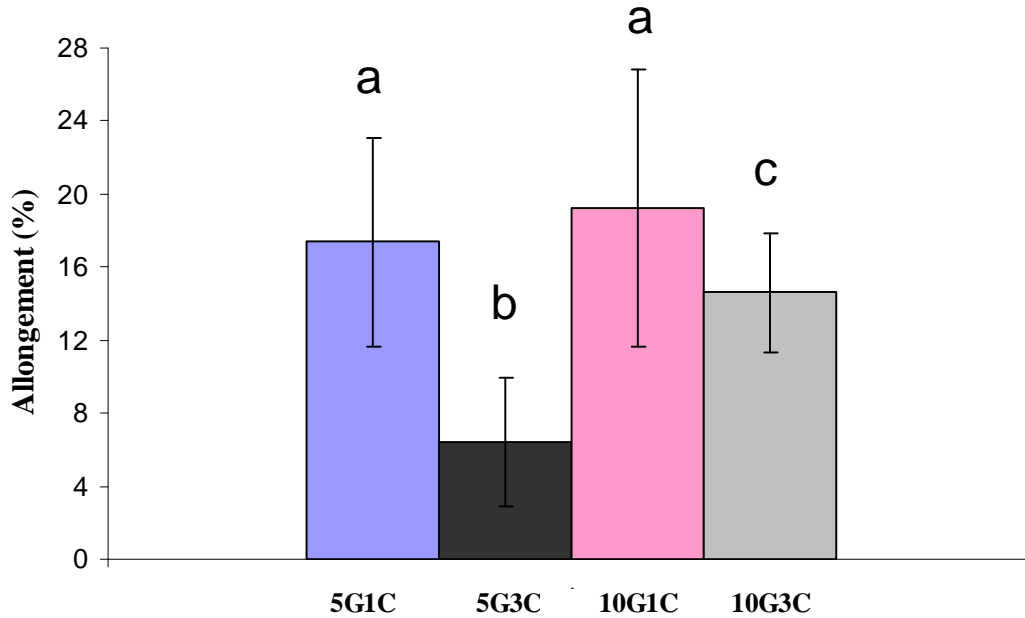


Figure 54 : Pourcentage d'allongement pour les matériaux 5G1C, 10G1C, 5G3C et 10G3C à 50% HR et à 23°C. Les barres d'erreurs présentent les écarts types avec n=3 et les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher ($P < 0,05$).

L'analyse de ces résultats montre que l'utilisation d'un profil à 3 zones de cisaillement fait diminuer l'allongement à la rupture des matériaux et ce d'autant plus que le taux de glycérol est moindre. L'utilisation d'un profil à 3 zones de cisaillement conduit à un échauffement et donc à de probable coupure des chaînes d'amidon ce qui provoque une diminution de l'allongement. Les matériaux à 10% de glycérol présentent un pourcentage d'allongement supérieur à ceux à 5% de glycérol. L'augmentation du taux de glycérol semble donc donner naissance à des matériaux moins rigides présentant un pourcentage d'allongement à la rupture plus élevé. D'autres travaux ont montré que l'augmentation du glycérol fait augmenter l'allongement à rupture de films à base de farine de riz (Dias *et al.*, 2010).

IX. Conclusion

Les différents résultats présentés dans ce chapitre montrent que le couple formulation/procédé influence les propriétés physico-chimiques, la structuration et les propriétés mécaniques des matériaux à base de farine de maïs.

- ✓ Les matériaux à base de farine de maïs sont des matériaux méso- et macro-poreux. En revanche, l'augmentation du taux de cisaillement conduit à une distribution plus homogène de la taille des pores en faisant apparaître des micropores et diminuant le nombre de macropores.
- ✓ L'utilisation d'un taux élevé en glycérol (10%) augmente la capacité des matériaux à absorber une grande quantité d'eau à des fortes a_w qui peut atteindre 57% (à une a_w de 0,9).
- ✓ L'augmentation du taux de glycérol (10%) et l'utilisation d'un profil d'extrusion à trois zones de cisaillement facilitent probablement la déstructuration de l'amidon par traitement thermomécanique. Il a été observé que les protéines formant une phase continue autour de l'amidon de la farine de maïs native sont dénaturées et dispersées rendant sans doute plus facile la déstructuration de l'amidon.
- ✓ Dans le même sens, le glycérol et le cisaillement augmentent le module de Young et la contrainte à la rupture. En revanche, l'augmentation des zones de cisaillement provoque la scission des chaînes d'amidon conduisant à une diminution de l'allongement des matériaux.
- ✓ La stabilité dans le temps et la durée de vie de ces matériaux est directement influencée par la rétrogradation provoquée par le stockage dans un milieu humide et à une température supérieure à la T_g de l'amidon. Ce phénomène de vieillissement est accéléré par un taux plus élevé du glycérol. Il a été montré que le vieillissement se traduit par une diminution de l'allongement, une augmentation de la contrainte à la rupture et du module de Young (Van Soest *et al.*, 1996).

Malgré ces essais d'amélioration, la forte hygroscopicité et les faibles propriétés mécaniques de ces matériaux restent un grand handicap pour leur utilisation pour la fabrication d'emballages alimentaires pour des produits humides. Pour pallier ce problème, des mélanges avec un polymère synthétique hydrophobe (PBS) sont réalisés dans le chapitre IV afin d'améliorer ces propriétés mécaniques et de diminuer le caractère hygroscopique de la farine de maïs.

Plusieurs travaux ont montré que les propriétés physico-chimiques des matériaux influencent la biodégradation. Dans ce contexte, une étude de la cinétique de la biodégradation par voie enzymatique des matériaux à base de farine de maïs et de glycérol en fonction de la formulation et du procédé sera l'objectif de la partie II de ce chapitre.

Dans la partie II, une approche enzymatique va être mis en œuvre pour essayer de comprendre comment les changements provoqués par le couple formulation/procédé au niveau des propriétés physico-chimiques de la farine de maïs influencent les cinétiques d'hydrolyses enzymatiques de l'amidon et de mettre en évidence les différents facteurs limitant l'accessibilité de l'amidon aux enzymes amylolytiques.

Chapitre III : Matériaux à base de farine de maïs, d'eau et de glycérol

Partie II : Evaluation de la dégradation enzymatique des matériaux à base de farine de maïs

Dans cette seconde partie du chapitre III, des enzymes qui hydrolysent spécifiquement les liaisons α (1-4) et α (1-6) entre les molécules de glucose de l'amylose et l'amylopectine constituant de l'amidon et les protéines ont été employées pour mettre en évidence les différents facteurs limitant l'accessibilité de l'amidon de la farine de maïs aux enzymes amylolytiques. Après extrusion, la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon présent dans la farine de maïs par des enzymes amylolytiques est multipliée par 8. D'après les résultats présentés dans la partie I de ce chapitre, l'augmentation de la vitesse d'hydrolyse est liée au passage de l'amidon d'un état semi cristallin à un état amorphe. De plus, l'ajout des protéases aux enzymes amylolytiques a permis une meilleure hydrolyse de la farine de maïs et des matériaux extrudés. Cela indique que les protéines de la farine de maïs constituent une barrière contre l'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques. Des hydrolyses enzymatiques des matériaux présentant différents aires spécifiques ont permis de mettre en évidence l'existence d'une relation exponentielle entre la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon et l'inverse de l'aire spécifique au carré.

Introduction

L'élaboration des matériaux à base d'une matière première d'origine agricole telle que la farine de maïs nécessite de modifier la structure initiale de cette farine de maïs pour reformer une nouvelle structure. Suite à cette "déstructuration-restructuration" obtenue par des traitements thermomécaniques tels que l'extrusion-injection les constituants de la farine de maïs que sont par exemple l'amidon et les protéines peuvent avoir leur état physique et/ou leurs associations modifiées. Il a ainsi été observé au cours du chapitre précédent par des techniques telles que la diffraction aux rayons X, la calorimétrie différentielle à balayage ou des observations en microscopie confocale à balayage laser que ces traitements pouvaient provoquer la fusion des grains d'amidon, son amorphisation ou une dispersion –agrégation de protéines. En complément de ces techniques, la spécificité des enzymes pour leurs substrats peut également être employée pour étudier la structure des différents constituants de la farine de maïs et des matériaux élaborés à partir de cette matière première.

En effet, il existe des préparations d'enzymes amylolytiques qui n'hydrolysent que certaines liaisons de l'amidon et des préparations d'enzymes protéolytiques qui n'hydrolysent que les protéines. Un suivi cinétique de l'hydrolyse de la farine de maïs ou des matériaux obtenus peut ainsi potentiellement apporter des informations sur la structure de l'amidon et les protéines de la farine. A titre d'exemple, [Timmins *et al.* \(1994\)](#) ont montré que les formes amorphes de l'amidon sont hydrolysées environ 20 fois plus rapidement que ses formes cristallines. L'amorphisation des formes cristallines de l'amidon de maïs que provoquent les traitements thermomécaniques appliqués pour élaborer les matériaux pourrait ainsi se traduire par une accélération de leur hydrolyse par des enzymes amylolytiques.

Un autre intérêt de l'emploi d'enzymes qu'une meilleure compréhension de la modification de la structure des biopolymères constitutifs de la farine de maïs suite aux traitements thermomécaniques pourrait aussi résider dans le fait que les processus de dégradation par voie microbienne de ces matériaux reposent sur l'action d'enzymes microbiennes aptes à hydrolyser leurs constituants, il est probable qu'un certain degré de corrélation entre la cinétique d'hydrolyse enzymatique et de biodégradation par voie microbienne de ces matériaux existe. Si c'était le cas, les cinétiques de dégradation par voie enzymatique pourraient être établies de façon beaucoup plus rapide (moins de quelques heures) que celles par voie microbienne (plusieurs semaines à plusieurs mois). En conséquence, des tests enzymatiques pourraient être employés pour une première évaluation rapide de la biodégradabilité.

Cette partie de ce chapitre rassemble donc les résultats d'un ensemble de suivis cinétiques d'hydrolyse de matériaux à base de farine maïs en présence d'un ensemble d'enzymes spécifiques de différents constituants de la farine de maïs employées seules ou associées. Les informations qui peuvent découler de ces résultats sur la structuration de ces matériaux et la compréhension des paramètres conditionnant la cinétique de leur dégradation par voie microbienne sont ensuite respectivement discutées.

I. Choix des enzymes

La figure 55 présente le pourcentage d'hydrolyse en sucres réducteurs de l'amidon de la farine de maïs. L'analyse de cette figure révèle que sans enzyme, peu de sucres réducteurs sont libérés à partir de la farine de maïs. Ceci est cohérent avec le fait que l'amidon natif est majoritairement insoluble et contient peu de groupements glucose avec leurs extrémités réductrices libres.

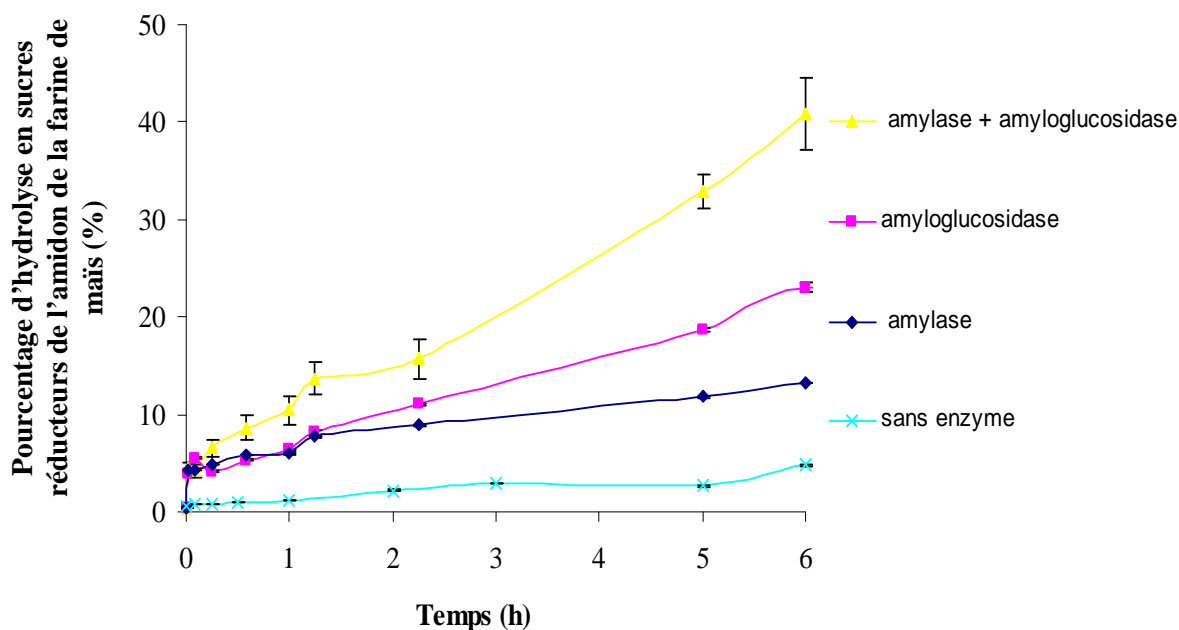


Figure 55 : Evolution du pourcentage d'hydrolyse en sucres réducteurs de l'amidon de la farine de maïs par des enzymes amylolytiques (50U.mL^{-1}) à 50°C et à pH 5,5 en fonction du temps.

Les résultats obtenus montrent que l'association de l' α -amylase et l'amyloglucosidase permet d'obtenir un meilleur taux d'hydrolyse de la farine après 6h et qu'elles agissent donc en synergie positive (figure 55). L'analyse des vitesses initiales d'hydrolyse enzymatique de la farine de maïs native permet de préciser ces observations (tableau 7).

Tableau 7 : Evolution des vitesses initiales d'hydrolyse de la farine de maïs en fonction des enzymes utilisées.

	sans enzyme	α amylase 50U.mL ⁻¹	amyloglucosidase 50U.mL ⁻¹	α amylase+ amyloglucosidase 50U.mL ⁻¹
Vi (en g.L ⁻¹ min ⁻¹ équivalent glucose libéré)	0,003±0,001	0,23±0,03	0,30±0,01	0,22±0,03

Les résultats obtenus montrent que la vitesse initiale d'hydrolyse par l'amyloglucosidase (0,3±0,01 g.L⁻¹.min⁻¹) est plus élevée que celle par l' α -amylase (0,23±0,03 g.L⁻¹.min⁻¹). En revanche, la vitesse initiale d'hydrolyse par les deux enzymes ensemble est similaire à celle obtenue par l' α -amylase seule ce qui montre que les deux enzymes rentrent en compétition pour hydrolyser les liaisons α (1-4). L' α -amylase (endo-amylase) hydrolyse au hasard les liaisons α (1-4) des chaînes d'amylose et d'amylopectine. En revanche, l'amyloglucosidase agit plus rapidement sur les longueurs de chaînes que sur les courtes chaînes et hydrolyse les liaisons α (1-4) plus rapidement que les liaisons α (1-6). Pour ces raisons, l'amyloglucosidase présente plus d'affinité au substrat par rapport à l' α amylase. Selon la littérature, l'amidon de maïs est essentiellement composé d'amylopectine (70 à 80%) qui présente des ramifications assurées grâce à des liaisons α (1-6) rendant difficile l'accès de l' α amylase aux liaisons α (1-4). En présence de l'amyloglucosidase qui peut hydrolyser aussi les liaisons α (1-6) l'attaque des liaisons α (1-4) est ensuite plus facile.

Kong *et al.* (2003) ont montré que le taux d'hydrolyse des grains d'amidon de maïs par l' α -amylase est plus élevé que ceux de pomme de terre et de riz. D'après les mêmes auteurs, ceci est dû à l'existence de pores au niveau de la surface des grains d'amidon de maïs (Helbert *et al.*, 1996) ce qui faciliterait l'hydrolyse de ce substrat par l' α -amylase. Afin qu'une enzyme puisse diffuser à l'intérieur du substrat, un diamètre minimal des pores du substrat de l'ordre de 50 Å est indispensable (Coma, 1992). Dans notre cas, les matériaux à base de farine de maïs possèdent une porosité majoritaire comprise entre 20 et 200 Å de diamètre et l' α -amylase a un rayon de giration de 26,9 Å (Simon *et al.*, 1974). Pour ces matériaux, la porosité semble donc suffisante pour permettre la pénétration des enzymes dans le matériau.

II. Effet de l'aire spécifique

La cinétique de dégradation par voie enzymatique d'un matériau en milieu liquide dépend notamment de son aire spécifique qui conditionne la surface de contact entre les enzymes solubles et leurs substrats initialement insolubles. Des modèles d'érosion-diffusion ont d'ailleurs été proposés par certains auteurs pour modéliser les cinétiques d'hydrolyse enzymatique de matériaux (Al-Rabadi *et al.*, 2009).

L'aire spécifique des matériaux peut donc influencer de façon déterminante leur vitesse d'hydrolyse enzymatique. Pour évaluer l'effet de ce paramètre, des hydrolyses par un cocktail d'enzymes amylolytiques (α -amylase et amyloglucosidase) des matériaux ont été effectuées sur des suspensions de particules de matériaux plus ou moins fines obtenues par tamisage (après broyage) et des morceaux de matériaux non broyés. La figure 2 présente le suivi de la quantité de sucres réducteurs libérée en fonction de l'aire spécifique des particules. Les résultats obtenus révèlent que la quantité de sucres réducteurs libérés est nettement plus élevée pour les aires spécifiques supérieures à 2 mm^{-1} (figure 56). Comme indiqué précédemment par Rémond *et al.* (2004) sur le grain de maïs, l'augmentation de l'aire spécifique accélère la vitesse de l'hydrolyse enzymatique des matériaux à base de farine de maïs.

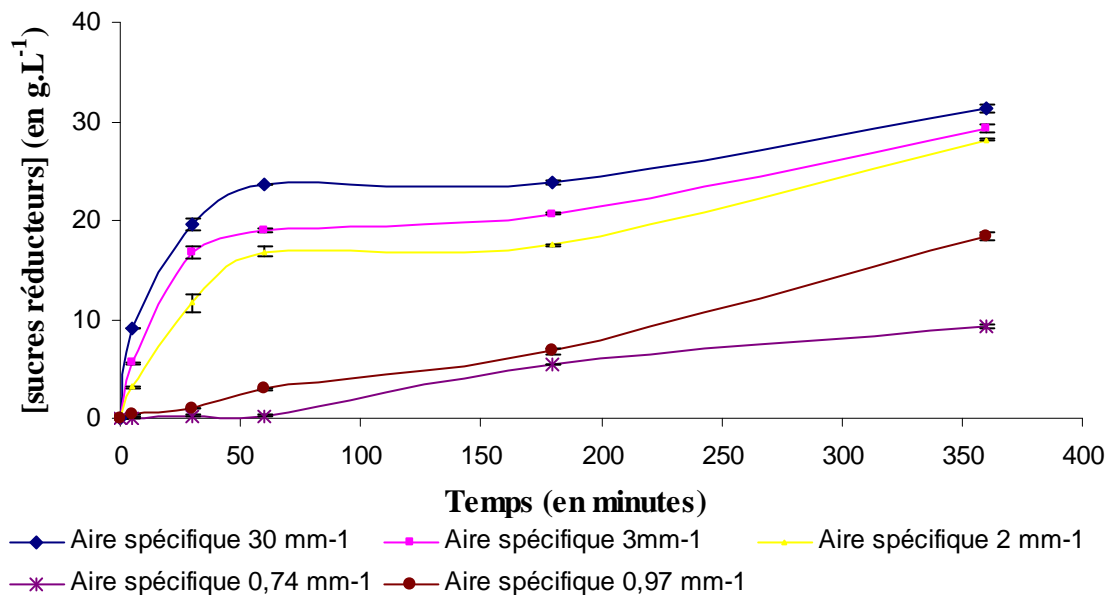


Figure 56 : Evolution dans le temps de la concentration en sucres réducteurs (en g sucres réducteurs .L⁻¹) au cours de l'hydrolyse à 50°C et pH 5,5 d'une suspension à 30g.L⁻¹ du matériau à base de 92 % de farine de maïs et 8 % de glycérol à différentes aires spécifiques par une préparation enzymatique commerciale Hazyme® DCL (α -amylase et amyloglucosidase à 50 U.mL⁻¹).

D'après les résultats présentés dans la [figure 57](#), la vitesse initiale d'hydrolyse est multipliée par 62 lorsque l'aire spécifique passe de 0,74 à 2 mm⁻¹. En revanche, la vitesse initiale (V_i) n'est multipliée que par un facteur de 3 lorsque celle-ci passe de 2 à 30 mm⁻¹. Cependant, les résultats ne peuvent être directement comparés avec ceux de [Blasel *et al.* \(2006\)](#) car les particules de grain de maïs n'avaient pas subi de traitement thermomécanique ce qui modifie la porosité et la cristallinité de l'amidon par exemple.

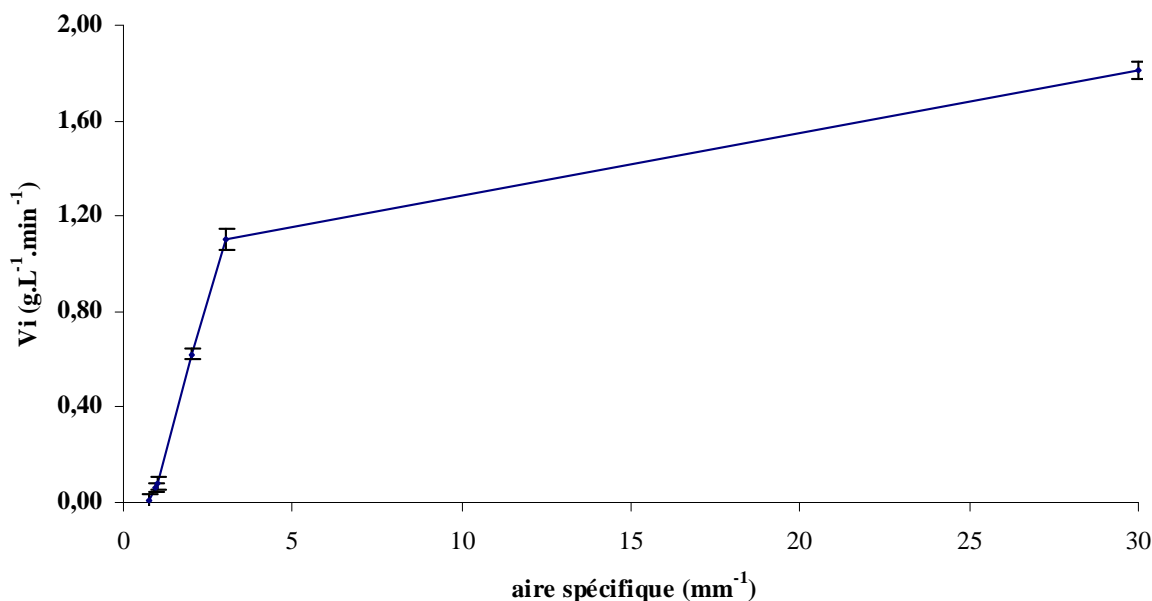


Figure 57 : Effet de l'aire spécifique des matériaux à base de farine de maïs sur la vitesse initiale (g de sucres réducteurs libérés .L⁻¹.min⁻¹) d'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques.

Cela montre qu'au delà de 2 mm⁻¹, l'augmentation de l'aire spécifique n'accélère que peu la vitesse d'hydrolyse enzymatique. Ce résultat est en accord avec [Blasel *et al.* \(2006\)](#) qui ont montré que l'hydrolyse enzymatique de l'amidon est influencée par la taille des particules. Le degré d'accès de l'amidon (DSA) passe de 1068 à 15 g.kg⁻¹ quand la taille des particules des grains de maïs augmente de 370 à 4000 μm ([Blasel *et al.*, 2006](#)). D'après ces auteurs, cela est dû au tégument sec qui présente une barrière contre l'hydrolyse enzymatique de l'amidon intact. Les mêmes auteurs ont mis en évidence une augmentation du DSA d'un facteur de 70 lorsque l'aire spécifique passe de 1,5 mm⁻¹ à 16,2 mm⁻¹.

Dans l'objectif de proposer un modèle mathématique pour établir une relation entre la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique de l'amidon (V_i) et l'aire spécifique des matériaux à

base de farine de maïs (A), le logarithme de V_i en fonction de $1/A^2$ (A : aire spécifique en mm^{-1} (mm^2/mm^3)) est présenté dans la figure 58.

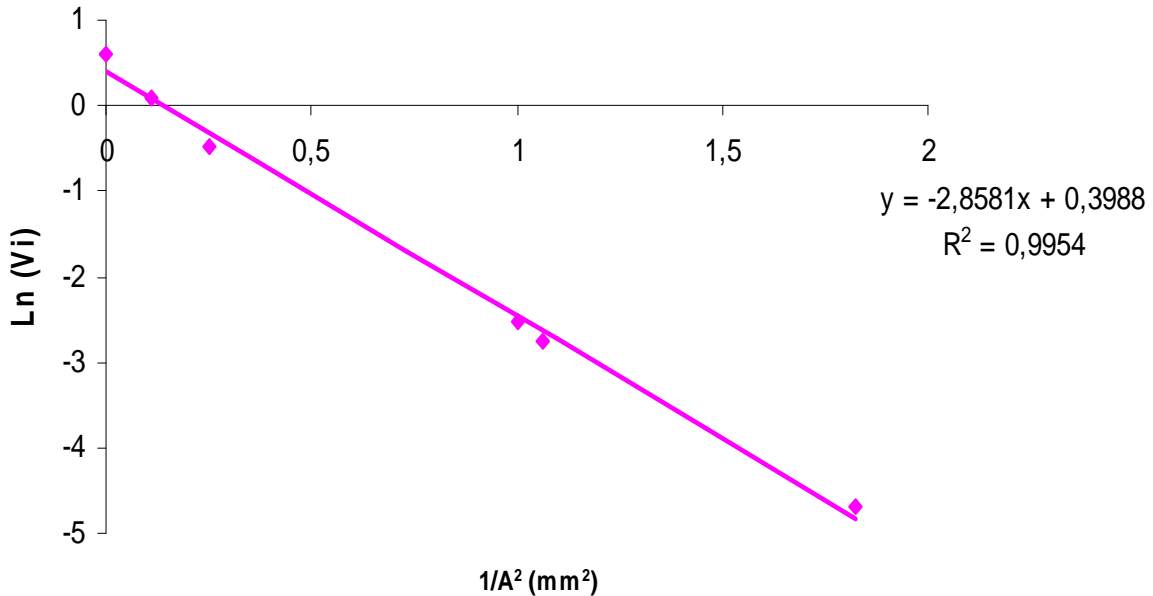


Figure 58 : Représentation du logarithme de la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique en fonction de l'inverse de l'aire spécifique au carré des matériaux.

La linéarité de cette représentation montre que l'aire spécifique est mieux adaptée que la concentration en substrat pour mesurer l'accessibilité de l'amidon à l'hydrolyse par des enzymes amylolytiques. D'autre part, la relation exponentielle entre la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon (V_i) et l'aire spécifique indique que l'accessibilité de l'amidon est probablement limitée par la diffusion des enzymes dans le substrat. De plus, [Helbert et al. \(1996\)](#) ont montré que l'hydrolyse enzymatique de l'amidon de maïs par l' α -amylase de *Bacillus licheniformis* se déroule selon le mécanisme d'érosion-diffusion suivant : (i) adsorption de l'enzyme à la surface des granules, (ii) début de l'hydrolyse à ces points, (iii) formation des pores suite à une hydrolyse radiale, (iv) les pores empêchent la diffusion libre de l'enzyme vers l'extérieur conduisant à la formation de canaux qui atteignent le centre des grains d'amidon. D'autres études effectuées sur l'orge et le sorgho ont également mis en évidence que la digestion de l'amidon par un mélange d' α -amylase et d'amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* est contrôlée par le transfert de l'enzyme dans les particules de farine et que cette limitation peut être modélisée en faisant l'hypothèse d'une limitation diffusionnelle. Il est ainsi possible par une solution simplifiée de la deuxième loi de Fick d'identifier un

coefficient de diffusion apparent des enzymes amylolytiques dans ces particules : celui-ci est alors respectivement 9 et 4 fois plus faible pour le sorgho et l'orge que le coefficient de diffusion de l' α -amylase dans l'eau calculé en appliquant la loi de Stokes-Einstein (Al-Rabadi *et al.*, 2009).

D'après la loi de Stokes-Einstein, le coefficient de diffusion (D en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) est relié au rayon hydrodynamique (R) des protéines globulaires (cas des enzymes) selon la formule

$$\text{suivante : } D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (k_B : \text{est la constante de Boltzmann } (k_B = 1,3806503 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2}$$

K^{-1}), T : la température (en K), R : le rayon hydrodynamique (en m) de l'enzyme, et η : la viscosité à la température T du milieu (en Pa.s)). Dans le cadre de ce travail, les poids moléculaires de l' α -amylase et de l'amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* employées n'ont pas été déterminés et il conviendrait de le faire par filtration sur gel ou électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cependant, des poids moléculaires de 43 à 116 kDa (Varalakshmi *et al.*, 2009 ; Toledo *et al.*, 2007) pour des α -amylases et de 78 à 90 kDa pour des amyloglucosidases (Vandersall *et al.*, 1995, Teotia *et al.*, 2001) d'autres souches d'*Aspergillus niger* sont rapportés par d'autres auteurs dans la littérature. Sur cette base, il est possible d'estimer que le rayon hydrodynamique de ces enzymes est probablement compris entre 3 et 4,5 nm. L'application de la loi de Stokes-Einstein conduit alors à estimer que leur coefficient de diffusion dans l'eau est compris entre environ 1.10^{-10} et $1,5.10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 50°C (température à laquelle les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées).

Une relation linéaire entre l'inverse de la constante de vitesse d'hydrolyse (k) par des enzymes amylolytiques de l'amidon du sorgho et de l'orge et le carré du diamètre moyen des particules de farine a été mise en évidence par Al Rabadi *et al.* (2009). Ces auteurs ont fait l'hypothèse d'une cinétique d'hydrolyse de l'amidon par l' α -amylase du premier ordre ($C_i = 1 - e^{-k_i t}$, avec C_i qui est la fraction hydrolysée en sucres réducteurs de l'amidon à un temps t et k_i qui est le coefficient de vitesse de formation de la fraction hydrolysée, ainsi en traçant $\ln(1 - C_i)$ en fonction du temps d'hydrolyse, une droite de pente k_i a été obtenue ce qui a permis d'identifier k_i pour chaque aire spécifique. Dans l'objectif d'évaluer ce modèle sur les particules de matériaux à base de farine de maïs broyées puis tamisées plus ou moins finement, l'identification de k_i (figure 59) a été effectuée pour les trois fractions de particules obtenues correspondant respectivement à des aires spécifiques excédant 30, 3 et 2 mm^{-1} .

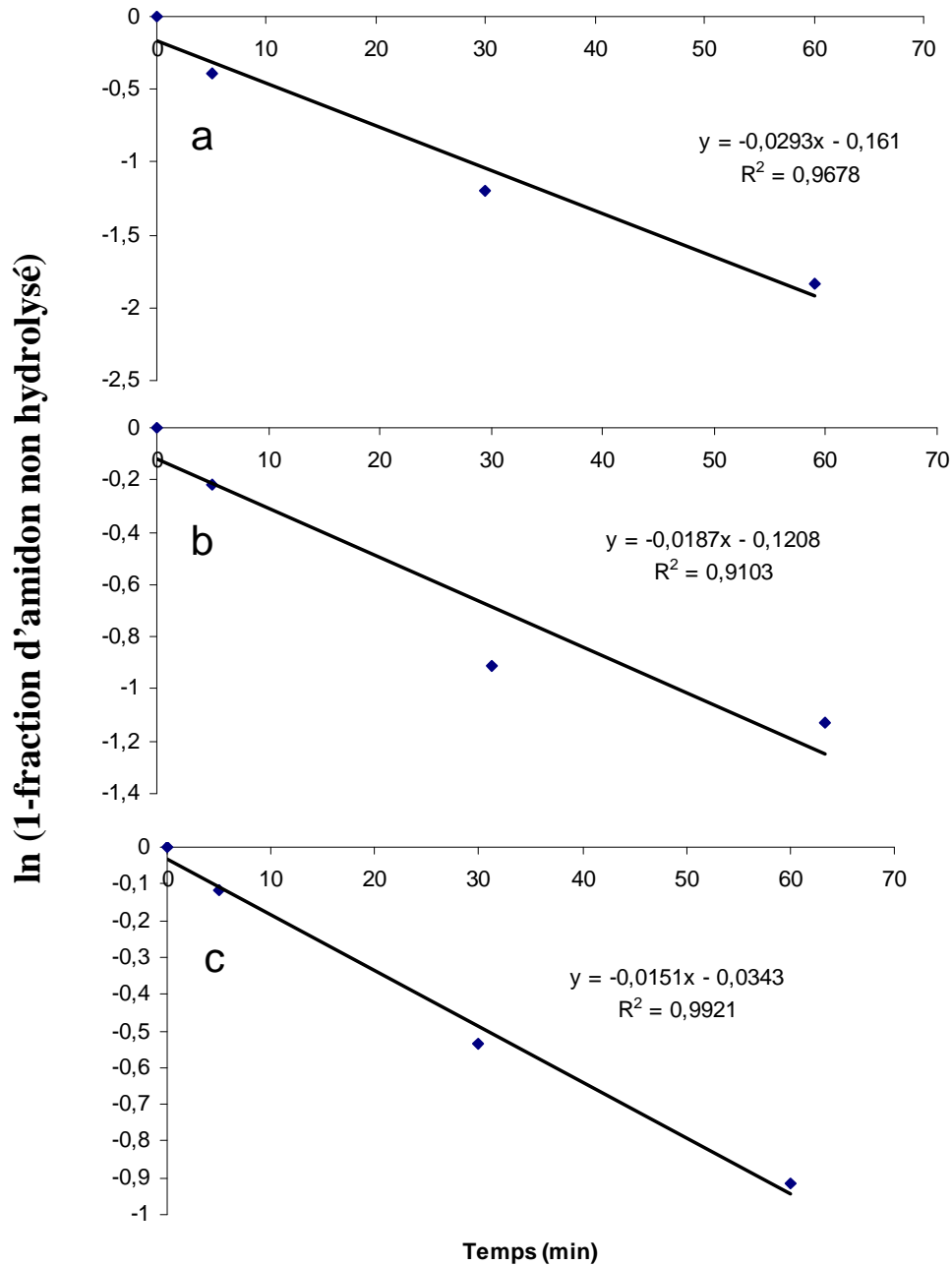


Figure 59 : Représentation des résultats d'hydrolyse des matériaux à différents aires spécifiques selon une réaction d'hydrolyse enzymatique du premier ordre. a : $>30 \text{ mm}^{-1}$ ($\emptyset < 0,2 \text{ mm}$), b : $>3 \text{ mm}^{-1}$ ($\emptyset < 2 \text{ mm}$) et c : $>2 \text{ mm}^{-1}$ ($\emptyset < 3 \text{ mm}$).

Les résultats de la figure 59 montrent une cinétique d'hydrolyse de l'amidon dans ces particules qui est probablement également compatible avec une modélisation par une cinétique de vitesse d'hydrolyse du premier ordre.

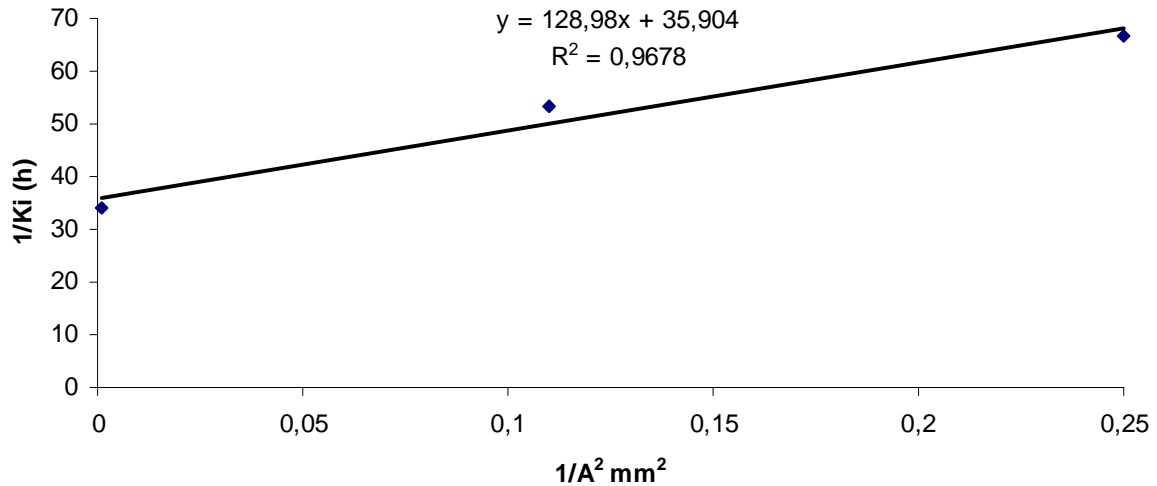


Figure 60 : Représentation de $1/k_i$ en fonction de l'aire accessible.

La représentation de k_i en fonction de l'aire interfaciale des particules (qui correspond à l'inverse de l'aire spécifique au carré) est également linéaire (figure 60). Ceci suggère que les résultats obtenus sont cohérents avec une hypothèse de limitation diffusionnelle, basée sur une relation entre le temps et une diffusion de l'enzyme suivant la deuxième loi de Fick de la surface de la particule sphérique vers son cœur. Cependant, il faut noter que seules 3 aires spécifiques ont été considérées et que celles-ci sont des valeurs sous-estimées car l'hypothèse faite pour le calcul de ces valeurs est que toutes les particules sont sphériques et ont un diamètre égal au diamètre du tamis employé : il faudrait tester un plus grand nombre de fractions de particules de matériaux de distribution de formes et de tailles mieux définies pour réévaluer cette relation. Une solution simplifiée mais estimée comme valable à un ordre de grandeur près est de la forme : $k_i = 6 D / d^2$ avec D (coefficient de diffusion apparent) et d (diamètre apparent des particules). Le coefficient de diffusion apparent identifié est alors de $3,25 \cdot 10^{-12}$, $2,07 \cdot 10^{-10}$ et $1,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement pour les aires spécifiques excédant 30, 3 et 2 mm^{-1} . Les coefficients de diffusion apparents des enzymes amylolytiques dans le matériau ainsi identifiés (avec cependant toutes les limites de cette approche déjà en partie soulignés précédemment) sont donc significativement inférieurs à celui dans l'eau pour l'aire spécifique excédant 30 mm^{-1} et analogues à celui dans l'eau pour les aires spécifiques de 3 et 2 mm^{-1} . Ceci peut refléter le fait que les mouvements des enzymes amylolytiques dans le réseau méso et micro-poreux des particules de matériaux sont probablement peu limités (des diamètres de pore de 2 à 180 nm ont en effet été mesurés dans les particules de matériaux par mesure de la porosité par adsorption d'azote) et ces diamètres excèdent largement le rayon hydrodynamique estimé (3 à 4,5 nm) des enzymes amylolytiques) et pose la question de la

substance d'un tel réseau dans des particules de matériau de moins de 0,2 mm après broyage. Il convient cependant de rester prudent quant à la pertinence de ces observations : en effet, comme indiqué précédemment, des fractions de dispersion de taille des particules devraient être analysées. De plus, cette modélisation purement mathématique des résultats repose uniquement sur une hypothèse de diffusion dans un milieu homogène, la réalité est nettement plus complexe, ces phénomènes diffusionnels ne concernant que le réseau poreux ouvert et accessible à l'enzyme à l'intérieur des particules de matériau. Les phénomènes de capillarité, de mouillage et de gonflement des particules de matériaux, puis d'érosion du matériau au cours de son hydrolyse doivent notamment également être considérés. Il est donc prudent de ne pas vouloir donner une signification physique au modèle mathématique proposé.

III. Effet du traitement thermomécanique

La susceptibilité à l'hydrolyse par des enzymes amylolytiques de l'amidon de la farine de maïs native et des matériaux extrudés-injectés a été comparée (figure 61).

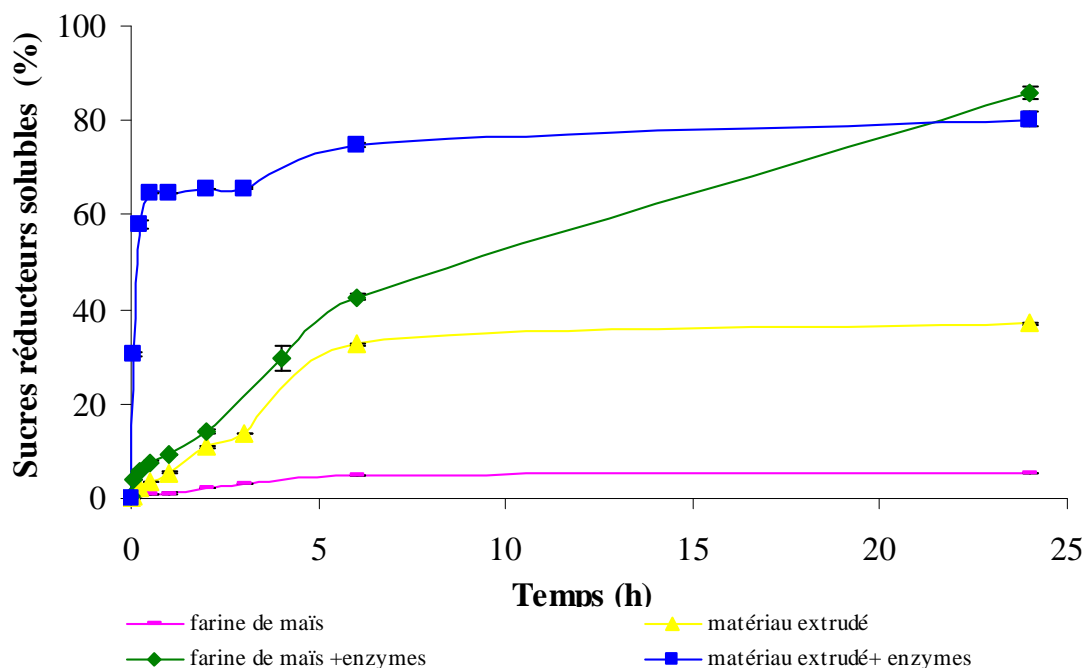


Figure 61 : Evolution du pourcentage de sucres réducteurs libérés pendant 24h de séjour dans un tampon acétate (pH 5,5 et à 50°C) sous agitation avec ou sans enzyme. Les hydrolyses enzymatiques sont effectuées par une préparation enzymatique commerciale Hazyme® DCL (α -amylase et amyloglucosidase à 50 U.mL⁻¹) d'une suspension à 30g.L⁻¹ de la farine de maïs et du matériau extrudé (92% de farine de maïs et 8% glycérol) broyés et tamisés à 0,2mm.

Les résultats obtenus révèlent que le traitement thermomécanique d'extrusion a un effet marqué sur le comportement de la farine de maïs dans un milieu liquide. Avant extrusion, peu de sucres réducteurs sont hydrosolubles dans la farine ($5,8 \pm 0,2\%$ de sucres réducteurs solubles) après 24 h dans un tampon acétate à pH 5,5 et à 50°C , alors qu'après extrusion, une augmentation importante de sa solubilité ($32,6 \pm 1,0\%$ de sucres réducteurs solubles après 24 h dans les mêmes conditions) est observée. En présence d'enzymes, la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique passe de $0,22 \pm 0,04 \text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ à $1,84 \pm 0,06 \text{g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (soit une multiplication par un facteur 8) après extrusion-injection de la farine de maïs. De plus, après 6 heures, le taux d'hydrolyse enzymatique passe 42% pour la farine de maïs à 74% pour le matériau. Ces résultats montrent que le traitement thermomécanique (extrusion-injection) accélère significativement l'hydrolyse de l'amidon de la farine de maïs. Ceci est probablement à relier au fait que l'amidon de la farine de maïs est alors plus amorphe donc plus sensible à l'action des enzymes amylolytiques.

Il a été montré que le stress mécanique permet de réduire la taille des particules (augmentation de l'aire spécifique), de changer la morphologie des granules et de diminuer la cristallinité de l'amidon (Wu *et al.*, 2004), ce qui facilite l'érosion mécanique et augmente la disponibilité du substrat aux sites actifs des enzymes amylolytiques (Azevedo *et al.*, 2003). Selon Timmins *et al.* (1994), les régions cristallines sont 20 fois moins sensibles à l'hydrolyse enzymatique que les régions amorphes.

III. 1. Identification des produits d'hydrolyse enzymatique par HPLC

Dans le but d'identifier les composés solubles libérés dans le tampon en présence et en absence d'enzymes amylolytiques à partir du matériau extrudé-injecté composé de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol, une analyse par HPLC a été effectuée (figure 62).

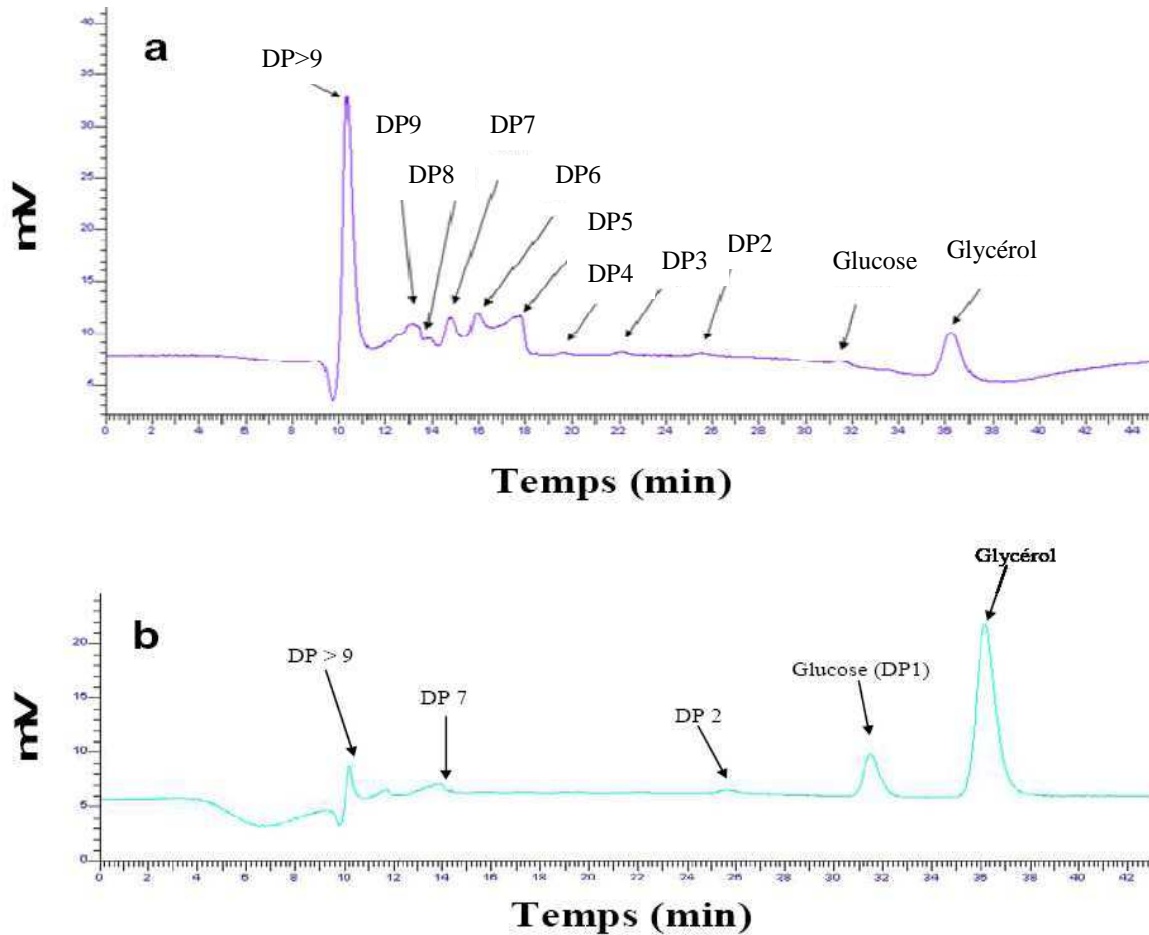


Figure 62 : Les chromatogrammes HPLC (séparation des sucres sur colonne PL HI-Plex Na) du matériau extrudé-injecté (92% farine de maïs et 8% glycérol) avant et après hydrolyse par une préparation enzymatique commerciale Hazyme® DCL (α -amylase et amyloglucosidase à 50 U.mL^{-1}) d'une suspension à 30g.L^{-1} dans un tampon acétate pH 5,5. à 50°C .

Le chromatogramme obtenu en absence d'enzymes présente un pic intense pour des DP >9, des pics de faible aire pour des DP situés entre 9 et 5 et une absence quasi-totale des DP 4, 3, 2 et 1 (Figure 62a). En revanche, après 5 minutes d'hydrolyse enzymatique, le glucose (DP1) est le produit majoritaire détecté, accompagné d'une faible quantité de maltose (DP2) et du maltoheptose (DP7) (Figure 62b). Les deux chromatogrammes révèlent la présence d'une quantité faible de glycérol qui augmente après hydrolyse enzymatique. Ceci suggère que, bien que le glycérol soit soluble dans l'eau, l'érosion enzymatique du matériau accélère sa diffusion et donc sa sortie du matériau (Azevedo *et al.*, 2003).

Afin de confirmer que le glucose est le produit principal de l'hydrolyse enzymatique, des comparaisons entre les résultats des dosages des sucres réducteurs et les dosages à l'aide d'un kit de dosage du glucose par la glucose oxydase ont été effectuées. Après 5 minutes d'hydrolyse enzymatique la quantité de glucose libéré est de 28% (pour 30% de sucres

réducteurs dosés à l'acide dinitrosalicylique). Ceci indique que le glucose est le produit majoritaire de l'hydrolyse par le cocktail d'enzymes amylolytiques.

III.2. Effet du profil de cisaillement employé pendant l'extrusion sur la susceptibilité de l'amidon à l'hydrolyse enzymatique

Il a été montré que l'intensité du cisaillement appliqué pendant l'extrusion conduit à une diminution de la taille, à des modifications au niveau de la structure et à la gélatinisation de l'amidon (Willett *et al.*, 1997). Pour évaluer l'impact du profil de cisaillement utilisé lors de l'extrusion, des hydrolyses des matériaux (5G1C, 5G3C, 10G1C et 10G3C) par des enzymes amylolytiques ont été effectuées. Les pourcentages d'hydrolyse (de sucres réducteurs libérés à partir de l'amidon de la farine de maïs) obtenus sont présentés dans le [tableau 8](#).

Tableau 8 : Pourcentage d'hydrolyse de l'amidon présent dans le matériau à base de farine de maïs par des enzymes amylolytiques des matériaux (broyé et tamisé à 0,2mm) après 6 heures d'hydrolyse par une préparation enzymatique (Hazyme[®] DCL contenant 50 U.mL⁻¹ à 50°C pH 5,5.

Matériau*	% d'hydrolyse de l'amidon après 6h d'hydrolyse
5G1C	60±2
5G3C	86±1
10G1C	65±1
10G3C	81±5

* : matériaux à 5% de glycérol obtenus en utilisant un profil de cisaillement avec 1 ou 3 zones de cisaillement sont respectivement 5G1C et 5G3C. Matériaux à 10% de glycérol obtenus en utilisant un profil de cisaillement avec 1 ou 3 zones de cisaillement sont respectivement 10G1C et 10G3C.

Les résultats montrent un pourcentage d'hydrolyse de l'amidon nettement plus élevé pour les matériaux ayant subi 3 zones de cisaillements lors de l'extrusion. Cela met en évidence l'influence du cisaillement sur la sensibilité de l'amidon à l'attaque enzymatique. L'augmentation du taux de cisaillement provoque une meilleure déstructuration de l'amidon en le rendant probablement complètement amorphe ([résultat observé dans le chapitre III partie I](#)) et par conséquent une hydrolyse enzymatique plus rapide. Dans ce contexte, il a été montré que l'amidon amorphe est plus susceptible à l'hydrolyse enzymatique que l'amidon cristallin (Wu *et al.*, 2004). Les vitesses initiales d'hydrolyses sont de 2,45±0,09, 3,24±0,02, 3,21±0,03

et $4,03 \pm 0,08$ g de sucres réducteurs. $L^{-1}.min^{-1}$ respectivement pour les matériaux 5G1C, 5G3C, 10G1C et 10G3C. Le cisaillement accélère donc significativement l'hydrolyse de l'amidon. De plus, la comparaison des matériaux ayant subi le même type de cisaillement montre que les vitesses initiales d'hydrolyse des matériaux à 10% de glycérol sont plus élevées que celles des matériaux à 5% de glycérol. Cela est dû probablement à la différence de structure des deux types de matériaux. Il a été montré que l'augmentation du taux de plastifiant, comme le glycérol, favorise la déstructuration de l'amidon (Carvalho *et al.*, 2003).

D'après les observations en microscopie confocale à balayage laser (chapitre II partie I), l'amidon est entouré d'une phase continue de protéines qui diminue en fonction du taux de cisaillement et du taux de glycérol. Ceci suggère que les protéines pourraient constituer une barrière contre l'attaque enzymatique de l'amidon.

IV. Susceptibilité de l'amidon de la farine de maïs à l'hydrolyse enzymatique par des enzymes amylolytiques : rôle barrière des protéines

Afin d'évaluer cette hypothèse d'un effet barrière des protéines à l'attaque enzymatique de l'amidon, des hydrolyses simultanées par des enzymes amylolytiques et protéolytiques ont été réalisées. Les cinétiques de libérations de sucres réducteurs à partir d'amidon en présence d'enzymes amylolytiques seules ou associées à des enzymes protéolytiques ont donc été comparées (figure 63).

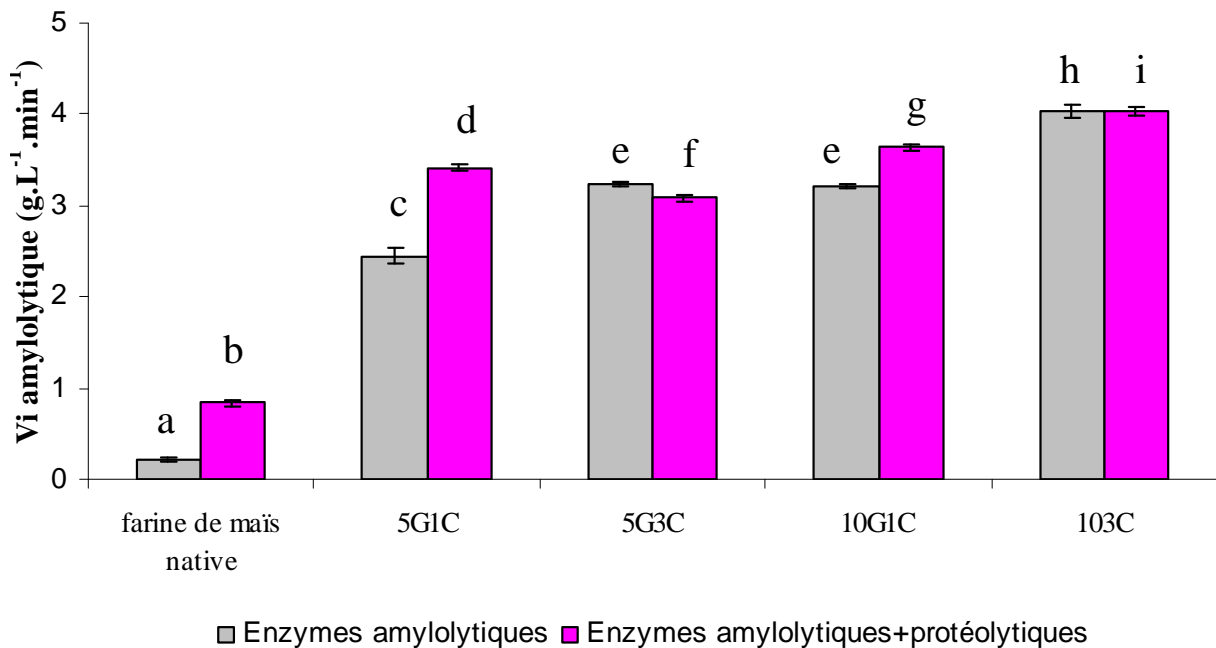


Figure 63 : Vitesses initiales d'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques seules ou associées à des enzymes protéolytiques à 50°C, pH 5,5 de la farine de maïs native et des matériaux extrudés-injectés broyés et tamisés à 0,2 mm (n=3). Les résultats présentés avec des lettres sont significativement différents selon le test de Fisher (P< 0,05).

La vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon de la farine de maïs native par des enzymes amylolytiques seules est très faible par rapport à celles des matériaux extrudés. Cependant, après l'utilisation du cocktail composé d'enzymes amylolytiques et d'enzymes protéolytiques une augmentation significative de la vitesse d'hydrolyse de l'amidon est observée.

Pour les matériaux extrudés, les résultats de la figure 63 mettent aussi en évidence une augmentation significative de la vitesse initiale d'hydrolyse en sucres réducteurs de l'amidon qui passe de $2,45 \pm 0,09$ à $3,41 \pm 0,03$ pour le matériau 5G1C et de $3,21 \pm 0,03$ à $3,64 \pm 0,03$ pour le 10G1C après ajout d'enzymes protéolytiques aux enzymes amylolytiques. Cependant, pour

les matériaux 5G3C et 10G3C, la présence des enzymes protéolytiques n'accélère pas la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques.

Comme il a été observé en MCBL, que dans les matériaux ayant subi 3 zones de cisaillement, la phase continue des protéines a complètement disparu, cela explique que l'utilisation des protéases ne provoque alors aucune accélération de l'hydrolyse de l'amidon. Ces résultats confirment que les protéines de la farine de maïs jouent un rôle barrière contre l'attaque enzymatique de l'amidon. A faible taux de cisaillement, cette couche protéique persiste en rendant difficile l'accès des enzymes à l'amidon. L'ajout d'enzymes protéolytiques accélère alors significativement la cinétique d'hydrolyse de l'amidon par les enzymes amylolytiques.

Pour la farine de maïs native, la vitesse d'hydrolyse est multipliée par un facteur de 3,8 après utilisation des protéases soulignant le rôle important de barrière des protéines lorsque la structure native des grains d'amidon de maïs est conservée. Le traitement thermomécanique accélère la cinétique d'hydrolyse de l'amidon en le rendant plus amorphe. La calorimétrie différentielle à balayage a permis de mesurer une enthalpie (ΔH) de $3,6\text{J.g}^{-1}$ plus élevée pour la farine native par rapport aux autres matériaux ce qui est probablement à relier au fait qu'un amidon plus cristallin est plus difficilement hydrolysable qu'un amidon amorphe.

V. Conclusion

Cette partie a permis d'élucider les différents paramètres pouvant influencer l'hydrolyse enzymatique des matériaux à base de farine de maïs extrudé-injectés. Dans un premier temps, il s'est avéré que le choix des enzymes est un facteur essentiel qu'il faut prendre en compte lors des essais d'hydrolyse enzymatique. L'utilisation d'un mélange d'enzymes amylolytiques composé d' α -amylase et d'amyloglucosidase aboutit à un meilleur taux d'hydrolyse de l'amidon de la farine native. Néanmoins, le taux d'hydrolyse après 6h reste faible : 42%. Après le traitement thermomécanique, la vitesse initiale d'hydrolyse en sucres réducteurs de l'amidon est accélérée d'un facteur de 8. L'amidon amorphe est plus facilement hydrolysable que l'amidon cristallin. L'utilisation d'un profil à 3 zones de cisaillement provoque la déstructuration totale des grains d'amidon en les rendant complètement amorphes et plus faciles à hydrolyser.

A l'état natif, l'amidon dans la farine de maïs est entouré d'une phase continue de protéines. Cette dernière forme une barrière contre l'attaque enzymatique de l'amidon par des

enzymes amylolytiques. En conséquence, l'utilisation d'un mélange d'enzymes amylolytiques et protéolytiques accélère significativement la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon.

Par ailleurs, la taille des matériaux constitue un facteur limitant l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. Une augmentation de l'aire spécifique des matériaux de 0,74 à 2 mm⁻¹ multiplie la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon par 62. Le modèle mathématique obtenu met en évidence l'existence d'une relation exponentielle entre la vitesse initiale et l'aire accessible. D'après plusieurs auteurs (Helbert *et al.*, 1996), l'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques se déroule selon un mécanisme d'érosion-diffusion. L'augmentation de l'aire spécifique augmente probablement la surface de contact entre le substrat et l'enzyme et rend plus rapide la diffusion de l'enzyme à l'intérieur des grains de l'amidon.

En dehors de ces retombées applicatives, des informations sur la structure des matériaux peuvent également être obtenues en exploitant la grande spécificité des enzymes. Ceci est particulièrement intéressant dans le cadre de nos travaux, en effet, la matière première employée, la farine de maïs est constituée notamment d'amidon, de cellulose et de protéines. Il existe des enzymes capables d'hydrolyser de façon spécifique ces différents biopolymères. Il est donc ainsi envisageable d'employer ces enzymes pour évaluer dans quelle mesure ces biopolymères font barrière à l'hydrolyse du matériau. De plus, la structure de biopolymères tels que l'amidon (cristallin ou amorphe) ou les protéines (natives ou dénaturées) peut également être affectée par les traitements thermomécaniques appliqués avec comme conséquence l'évolution de la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique de ces biopolymères. A titre d'exemple, Timmins *et al.* (1994) ont observé que l'hydrolyse enzymatique de l'amidon est 20 fois plus rapide lorsque celui-ci est amorphe que cristallin.

Dans la partie III, un suivi de la cinétique de la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs et de glycérol par des méthodes normalisées relativement longues dans différents milieux seront présentées afin d'évaluer les corrélations avec les cinétiques enzymatiques qui pourraient alors constituer des tests rapides pour l'évaluation de la biodégradation.

Chapitre III : Matériaux à base de farine de maïs, d'eau et de glycérol

Partie III : Evaluation de la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs en mode aérobie et anaérobie

Au cours de la partie précédente de ce chapitre les hydrolyses enzymatiques se sont révélées comme des tests rapides qui peuvent être employés pour prédire la biodégradation des matériaux. Dans l'objectif de trouver des corrélations entre ces tests enzymatiques et les méthodes de biodégradation normalisées, différents tests d'estimation de la biodégradation en milieu liquide ou solide (par voie aérobie ou anaérobie) ont été employés pour le suivi des cinétiques de biodégradation des matériaux à base de farine de maïs, d'eau et de glycérol en fonction du couple formulation/procédé. Les résultats obtenus ont révélé que quel que soit le milieu, le taux de biodégradation des matériaux est strictement lié à ses propriétés physico-chimiques. Les observations par microscopie électronique à balayage ont mis en évidence que les régions amorphes sont dégradées avant les régions cristallines. De plus, l'augmentation de l'aire spécifique accélère significativement la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs.

Introduction

« Un matériau est dit biodégradable si sous l'action d'organismes vivants, il peut se décomposer en éléments divers dépourvus d'effets dommageables sur le milieu naturel » Journal Officiel du 12 avril 2009. Le caractère biodégradable de matériaux, au delà de son intérêt environnemental parfois discutable tant que des filières de tri sélectif ne permettent leur orientation vers des filières spécifiques comme le compostage, est aujourd'hui devenu un argument marketing auprès des consommateurs poussant à la mise en œuvre de matériaux biodégradables et/ou recyclables répondant aux attentes des consommateurs dans ce domaine. Un certain nombre de tests normalisés de biodégradabilité ont été développés.

Les matériaux développés dans le cadre du projet EMABIO sont exclusivement à base de matières premières biodégradables : de la farine de maïs, du glycérol et de l'eau. Cependant, leur cinétique de biodégradation en fonction des conditions de mise en œuvre (aire spécifique des matériaux, mode aérobie ou anaérobie appliqué en milieu liquide ou solide (compostage)) doit être évaluée.

Des suivis cinétiques de biodégradation sur des durées allant jusqu'à 3 mois suivant différentes normes employées pour évaluer la biodégradabilité des différents matériaux développés ont donc été effectués dans le but d'évaluer si les qualificatifs « biodégradable » ou « compostable » par exemple pouvaient être employés. Ces tests de biodégradabilité étant particulièrement longs (jusqu'à 3 mois), il est apparu intéressant d'évaluer leur corrélation avec les cinétiques d'hydrolyse par des enzymes dégradant de façon spécifique les principaux biopolymères constituant et structurant ces matériaux (l'amidon, la cellulose et les protéines de la farine de maïs).

Evaluer le degré de corrélation entre les méthodes normalisées et ces tests d'hydrolyse enzymatique permettrait si la corrélation était suffisante de disposer d'une méthode rapide de criblage à un stade précoce du développement de matériaux pour évaluer la nécessité de réaliser un test normalisé souvent plus long et coûteux sur uniquement des matériaux "a priori" biodégradables.

Au delà de cet intérêt purement applicatif, pour qualifier le caractère biodégradable d'un matériau, le suivi de leurs cinétiques de biodégradation par voie microbienne ou enzymatique est également à même d'apporter des informations précieuses sur leur structuration, leur sensibilité à l'eau qui sont des paramètres qui conditionnent notamment

leurs propriétés d'usage avant leur fin de vie puis leur dégradation dans l'environnement ou par des filières de traitement par voie biologique des déchets.

L'élaboration de matériaux à base de biopolymères repose sur un ensemble d'étapes de déstructuration plus ou moins poussées de matériaux biologiques pour reformer ensuite de nouvelles structures en recourant à des procédés physiques tels que les traitements thermomécaniques et l'adjonction d'intrants (notamment des plastifiants) dans les formulations pour favoriser cette restructuration et la "processabilité" de ces matières premières.

Une originalité de ces travaux consiste à mettre en regard l'ensemble des propriétés physiques, biologiques et de composition chimique des matières premières et des pré-matériaux élaborés. Ceci doit permettre de mieux comprendre les impacts des couples formulation procédé à chaque étape de déstructuration-restructuration des matériaux sur l'ensemble de leurs propriétés. Ainsi, dans le cadre de ce chapitre, l'accent a été mis sur l'étude de l'impact du nombre de zones de cisaillement en tant que paramètre associé au procédé d'extrusion et l'impact de la teneur en glycérol en tant que paramètre associé à la formulation. Chacun de ces impacts sera évalué selon trois méthodes d'évaluation de la biodégradation qui sont le compostage (par mesure de perte de poids), la respirométrie aérobie (par mesure de DBO) et la respirométrie anaérobie (par mesure du Potentiel BioMéthano-gène BMP).

1. La biodégradation en milieu aérobie

La biodégradation aérobie peut être évaluée selon deux modes :

- Aérobie en milieu solide (compostage) par mesure de perte de poids ou du CO₂ libéré pendant la minéralisation du matériau.
- Aérobie liquide par mesure de la demande biologique en oxygène consommée par les microorganismes dégradant le matériau.

Dans cette étude, la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs a été estimée en utilisant les deux modes aérobies afin de comprendre les différents facteurs influençant la biodégradation des matériaux selon le milieu (solide ou liquide).

1.1. Le compostage

La plupart des travaux qui concernent la biodégradation des polymères sont basés sur un enfouissement dans le sol, une simulation de décharge ou de compost voire même sur une

simulation dans un environnement aqueux. L'enfouissement des matériaux extrudés- injectés dans le compost peut donc constituer un test de dégradation proche des conditions réelles de la biodégradation dans l'environnement. Certains facteurs comme la charge microbienne, la température et l'humidité influencent la dégradation des matériaux dans le compost. L'effet de ces paramètres sera donc pris en compte tout au long du test d'enfouissement.

1.1.1 Evaluation de la biodégradation par mesure de la perte de poids

Les mesures de perte de poids des matériaux extrudés-injectés (à base de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol) enfouis en fonction de leurs aires spécifiques sont présentées sur la figure 64.

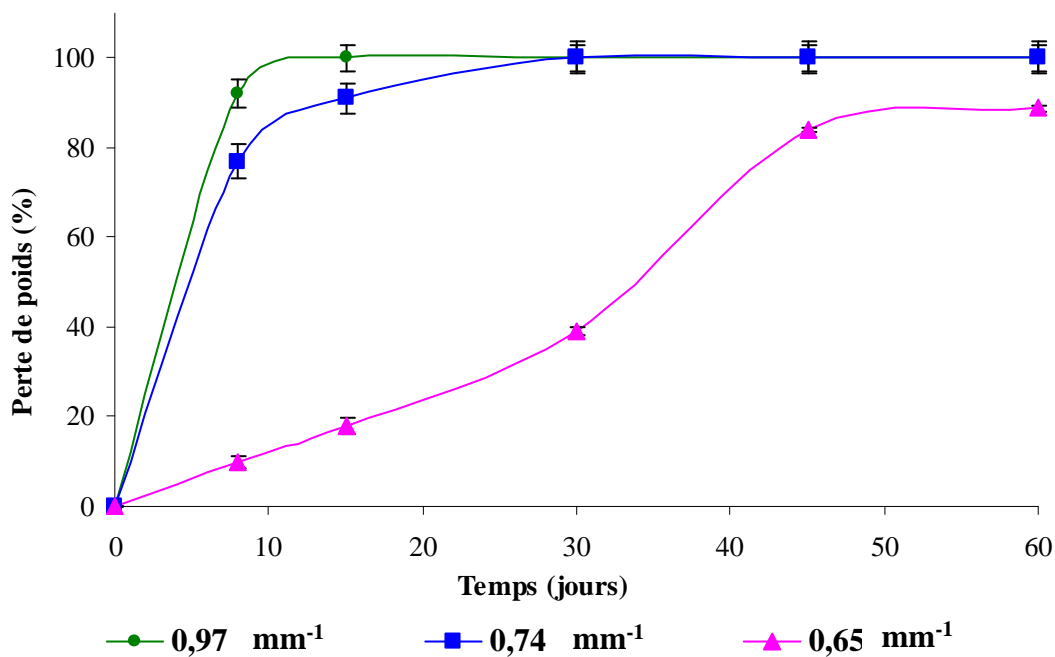


Figure 64 : Suivi de la perte de poids des éprouvettes du matériau extrudé-injecté (à base de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol) pour différentes aires spécifiques dans le compost à 40°C et 90% d'humidité relative en fonction du temps d'enfouissement.

Après 30 jours d'enfouissement, le pourcentage de perte de poids atteint 100% pour les éprouvettes d'aires spécifiques de 0,97 et 0,74 mm⁻¹ contre seulement 39% pour celles de 0,65 mm⁻¹. Pour cette dernière, il faudra 60 jours pour atteindre un pourcentage ultime de perte de poids d'environ 88,8±0,5%. Au delà de 60 jours d'enfouissement, la pesée du matériau devient difficile du fait de sa transformation complète en particules fines intimement mélangées au compost et par conséquent impossibles à extraire pour une pesée. Selon la définition de la norme ISO/DIS 16929, le matériau (à base de 92% de farine de maïs et 8% de

glycérol) est biodégradable dans les conditions testées (à 40°C et 90% d'HR) et ce indépendamment de son aire spécifique.

Les résultats obtenus montrent que le taux de biodégradation ultime dépend essentiellement de l'aire spécifique des matériaux. La même tendance avait été observée précédemment lors des suivis des cinétiques d'hydrolyse de l'amidon par les enzymes amylolytiques (partie II du chapitre III). L'augmentation de l'aire spécifique rend le substrat plus accessible à l'attaque enzymatique. A son tour, l'hydrolyse de ces substrats pourrait accélérer la croissance des microorganismes qui vont produire plus d'enzymes amylolytiques et par conséquent engendrer une augmentation de la vitesse d'hydrolyse, et ainsi de suite.

1.1.2. Observations visuelles de l'évolution du matériau à base de farine de maïs dans le compost

Les observations visuelles du matériau tout au long de l'enfouissement (tableau 9) ont montré un début d'érosion après 15 jours sans aucune colonisation par des moisissures. Après 30 jours, les échantillons ont totalement été colonisés par des moisissures de couleur verte. L'épaisseur du matériau est passée de 4 à 2 mm après 45 jours d'enfouissement. Au delà de 60 jours, il est devenu difficile de récupérer le matériau du compost car il s'est entièrement transformé en particules très fines. Les résultats présentés dans le tableau 9 montrent que la population bactérienne après 60 jours d'enfouissement est dix fois supérieure à celle présente initialement. En revanche, le nombre de champignons et le pH n'ont pas évolué de façon significative.

Tableau 9 : Evolution du matériau (à base de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol) de dimension 45mm x18mm x4mm et de la qualité du compost durant l'enfouissement.

Temps (jours)	Epaisseur (mm)	Erosion	Colonisation fongique	pH	Moisissures (UFC.mL ⁻¹)	Bactéries (UFC.mL ⁻¹)
0	4	absente	non	8,17	1,85.10 ⁴	1,55.10 ⁴
15	4	faible	non	n. d.	n. d.	n. d.
30	3	marquée	totale	n. d.	n. d.	n. d.
45	2	forte	totale	n. d.	n. d.	n. d.
60	0	totale	totale	8,19	1,65.10 ⁴	16,3.10 ⁴

n.d : non déterminé

1.2.3. Observations en microscopie électronique à balayage environnementale des matériaux enfouis

La dégradation et la colonisation de la surface du matériau ont été observées en microscopie électronique à balayage environnementale. Cette technique a permis d'observer l'évolution de la colonisation des échantillons et la dégradation des matériaux au cours de l'enfouissement (figure 65).

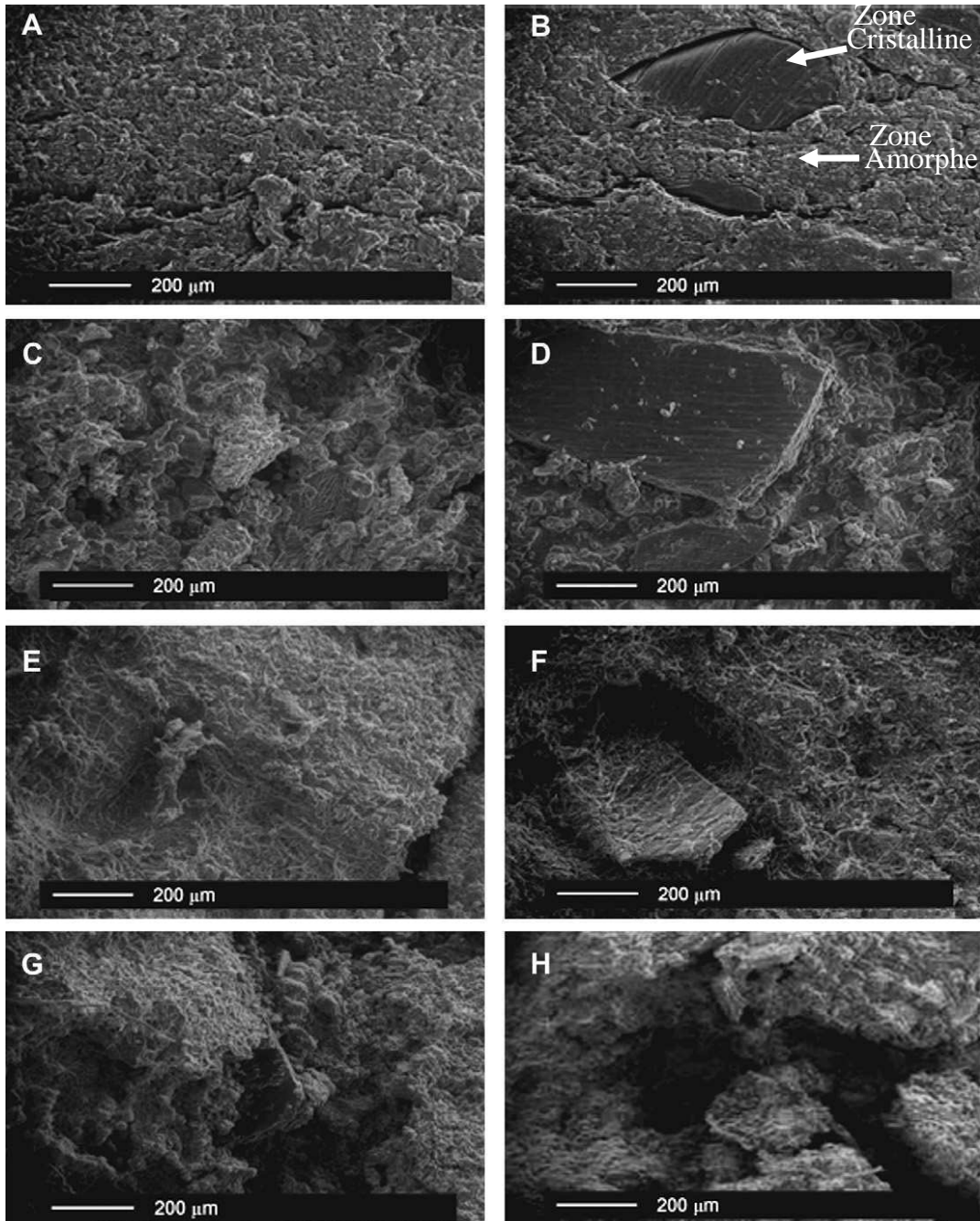


Figure 65 : Observations microscopiques du matériau à base de farine de maïs à différents stades d'enfouissement dans le compost. AB : avant enfouissement, CD : après 15 jours, EF : après 30 jours et GH : après 45 jours d'enfouissement (grossissement x 100).

D'après la figure 65, le matériau a subi une dégradation importante dans le compost. En effet, pendant les 15 premiers jours (figures 65 C et 65 D) la dégradation est simplement due à une érosion suivie ensuite d'une forte colonisation par des moisissures (figures 65 E et 65 F). Ensuite, les mycéliums et les spores envahissent complètement le matériau provoquant ainsi sa dégradation. Les parties lisses qui ne sont pas dégradées correspondent probablement à des régions cristallines. D'après Chandra *et al.* (1998), la dégradation du PCL (polycaprolactone) par les moisissures s'effectue de manière sélective en attaquant en premier lieu les parties amorphes avant les parties cristallines. En effet, les microorganismes produisent des enzymes extracellulaires responsables de cette dégradation sélective. Cette sélectivité peut être justifiée par le fait que les régions amorphes sont moins ordonnées et moins denses ce qui facilite par conséquent l'accès des enzymes aux chaînes des polymères (Chandra *et al.*, 1998). Sur la totalité des échantillons, les observations en MEBE de la structure des filaments et des spores de moisissures indiquent qu'il s'agit très probablement de champignons appartenant à la famille des *Aspergillus* (figure 66).

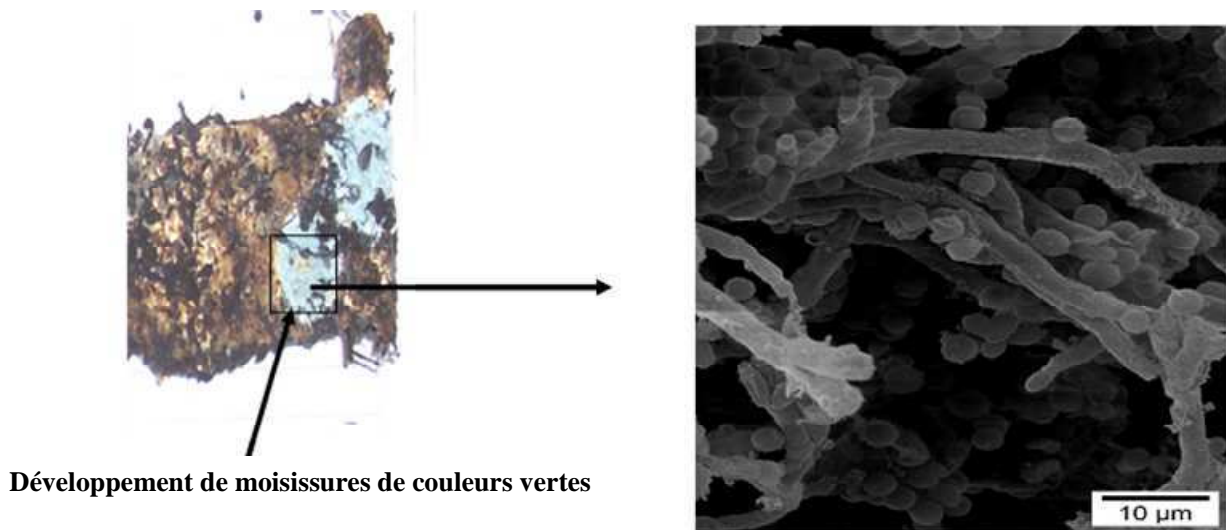


Figure 66 : Observation de la colonisation du matériau par des moisissures de couleur vertes.

De plus, la couleur verte des spores (selon les observations visuelles) indique qu'il s'agirait d'*Aspergillus oryzae* qui est connu pour coloniser des produits céréaliers. Ce type de champignon, tout comme *Aspergillus niger* produit des enzymes appartenant à la famille des glucosidases qui hydrolysent les liaisons α (1-4) et α (1-6) de l'amidon (Nigam *et al.*, 1995).

1.1.4. Etude de l'influence de la formulation (taux de glycérol) et du cisaillement sur la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs dans le compost

Les microorganismes (bactéries, actinomycètes, champignons, protozoaires et algues) d'origine tellurique dégradent la matière organique durant le processus de compostage *via* la production d'enzymes. La composition et la granulométrie de la matière première, l'espace lacunaire, la diffusion d'oxygène, la température, l'humidité et le pH constituent les paramètres majeurs influençant le bon déroulement du compostage. Ils interviennent simultanément au cours du processus de compostage. Le contrôle de ces paramètres est essentiel pour mener à bien l'évolution de la matière organique et obtenir une bonne dégradation de la matière organique. Les microorganismes, par leur activité modifient ces paramètres au cours de l'opération de compostage. Pour cette raison un suivi de la qualité biologique et physique du compost est nécessaire

Avant d'évaluer l'influence du taux de glycérol et du cisaillement sur la cinétique de biodégradation, le compost, avant et après enfouissement des différents matériaux est caractérisé au travers de la mesure du pH et de l'évolution du nombre de bactéries et de moisissures. [Le tableau 10](#) regroupe ces différents résultats.

Tableau 10 : Evolution du nombre de bactéries (sur milieu PCA) et de champignons (sur milieu Sabouraud) et du pH avant et après la dégradation des matériaux en compost.

	Caractéristiques du compost avant compostage et en l'absence de matériau	Caractéristiques du compost après 25 jours de compostage				
		En l'absence de matériau	En présence de matériau			
			Matériau à 10% glycérol		Matériau à 5% glycérol	
			3 zones de cisaillement	1 zone de cisaillement	3 zones de cisaillement	1 zone de cisaillement
pH	7,9 0±0,04	8,25±0,38	5,46±0,2	5,81±0,05	5,83±0,01	5,88±0,03
Bactéries (UFC.mL⁻¹)	1,8.10 ⁶	1,8.10 ⁷	2,0.10 ⁵	1,6.10 ⁴	2,6.10 ⁴	3,0. 10 ⁴
Moisissures (UFC.mL⁻¹)	0,8. 10 ⁵	0,3.10 ⁶	4,3.10 ⁶	1,5.10 ⁶	2,1.10 ⁶	0,4.10 ⁶

Le pH relativement basique (7,9) du compost utilisé dans cette étude est resté stable après 25 jours d'incubation à 35°C ([tableau 10](#)). En revanche, le pH des mélanges compost-

matériau a baissé jusqu'à 5. Cette acidification du milieu est probablement liée à la production d'acides organiques durant le processus de la dégradation (Chakroune *et al.*, 2004). Le dénombrement des microorganismes dans le compost seul montre une dominance bactérienne par rapport aux moisissures avant et après incubation à 35°C. Cependant, pour les mélanges compost - matériau, une augmentation de la population des moisissures au détriment des bactéries a été mise en évidence (tableau 10). Cette augmentation est liée à l'acidification du milieu qui le rend plus favorable à la croissance des moisissures qui ont un pH optimum de développement compris entre 5,5 et 7,5.

La figure 67 présente l'évolution du CO₂ libéré durant les 25 jours de dégradation des matériaux élaborés en compost à 35°C.

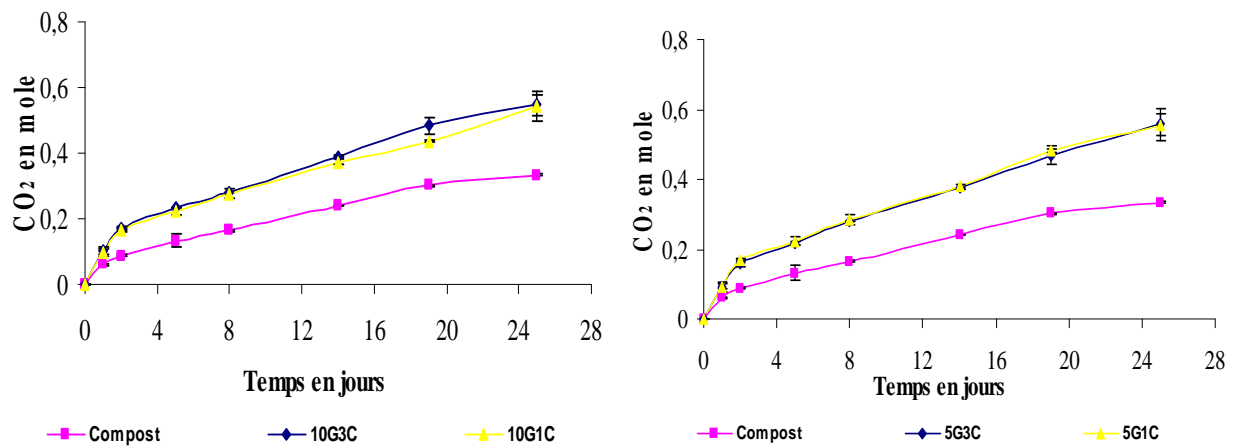


Figure 67 : Evolution de la biodégradation d'un matériau à base de farine de maïs, de glycérol et de l'eau par mesure du CO₂ libéré en fonction du nombre de cisaillements après 24 jours de compostage à 35°C (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3). 10G1C et 10G3C : matériaux extrudés-injectés à base de 10% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement. 5G1C et 5G3C : matériaux extrudés-injectés à base de 5% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement.

Quels que soient la formulation ou le nombre de cisaillements, le mélange compost-matériau montre une production de CO₂ plus importante par rapport au compost seul. En revanche, la comparaison des matériaux cisailés 1 ou 3 fois ne révèle aucune différence significative concernant le nombre de moles de CO₂ libérées. Après 25 jours d'incubation les matériaux ont atteint un pourcentage de biodégradation ultime (tableau 11).

Tableau 11 : Pourcentages de biodégradation ultimes après 25 jours d’incubation en compost à 35°C.

	10G1C	10G3C	5G1C	5G3C
Pourcentage de biodégradation après 25 jours	99 ± 9 %	101 ± 5%,	105 ± 6%	107 ± 4%

Ces résultats indiquent que ni la formulation, ni le cisaillement n’ont un effet sur le taux de biodégradation en compost après 25 jours.

En se basant sur la norme ISO 14855/1999 qui exige un pourcentage de biodégradation ultime de plus de 70% au bout de 45 jours, les matériaux à base de farine de maïs sont biodégradables par minéralisation en compost.

1.2.Respirométrie aérobie en milieu liquide par mesure de la demande biologique en oxygène (DBO)

1.2.1. Activité de l’inoculum selon la saison

La figure 68 montre que la demande biologique en oxygène de l’inoculum varie de façon remarquable selon la saison. Au mois de mars la boue a une activité plus faible qu’au mois d’avril, cette activité étant elle même inférieure à celles des mois de mai et juin.

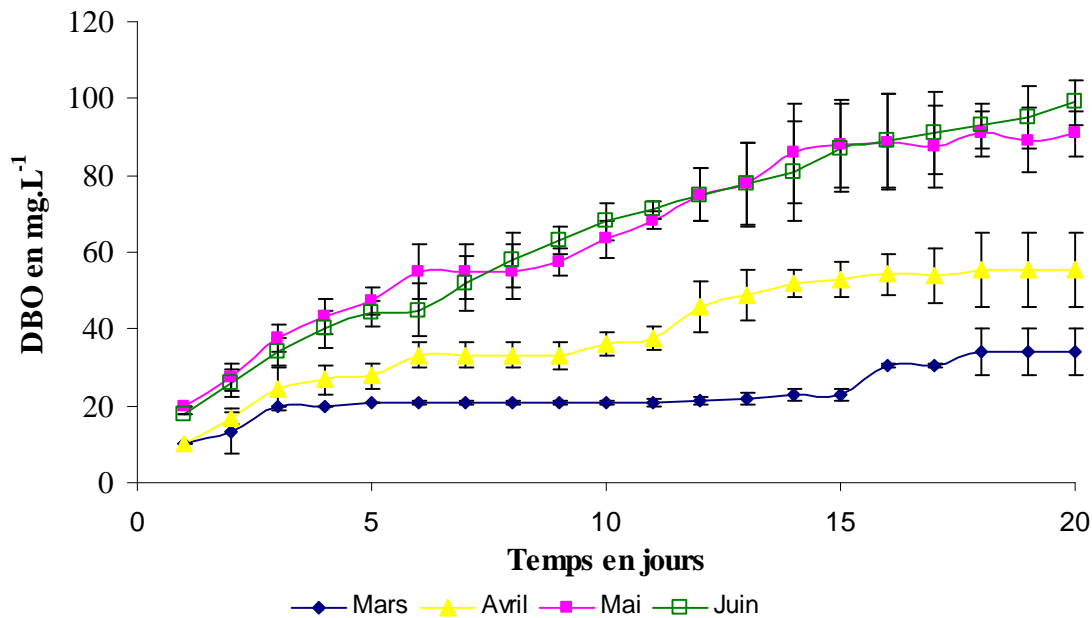


Figure 68 : Evolution de la demande biologique en oxygène de la boue aérobie en fonction des périodes de l’année.

Ce résultat est probablement à relier à l’augmentation de la température à partir du mois d’avril. Ces résultats révèlent une limite de la méthode respirométrique puisque la

biodégradation des matériaux va dépendre aussi des saisons et qu'une étude réalisée en hiver ne sera pas comparable à une autre réalisée en printemps ou en été. D'autres études ont montré que la qualité et la source de l'inoculum microbien affectent très significativement les résultats de la biodégradabilité d'un polymère (Mezzanotte *et al.*, 2005). Par ailleurs, Stanojlovic-Davidovic (2006) a mis en évidence une faible reproductibilité de la DBO pour l'amidon liée à l'hétérogénéité de la biomasse de la boue et qui se traduit par un temps de latence variable. Cependant, si des tests sont lancés simultanément avec plusieurs matériaux et le même inoculum, des différences de biodégradabilité pourront bien être attribuées aux différences entre matériaux.

1.2.2. Isolement de souches microbiennes dégradant les matériaux à base de farine de maïs à partir de la boue en utilisant la méthode des zones claires

Dans l'objectif d'isoler des souches dégradant les matériaux à base de farine de maïs à partir de la boue aérobie, un ensemencement avec de la boue d'un milieu gélosé mélangé avec du matériau broyé a été effectué. Grâce au lugol, il est facile d'observer les grains de matériau broyé présents dans la gélose (figure 69).

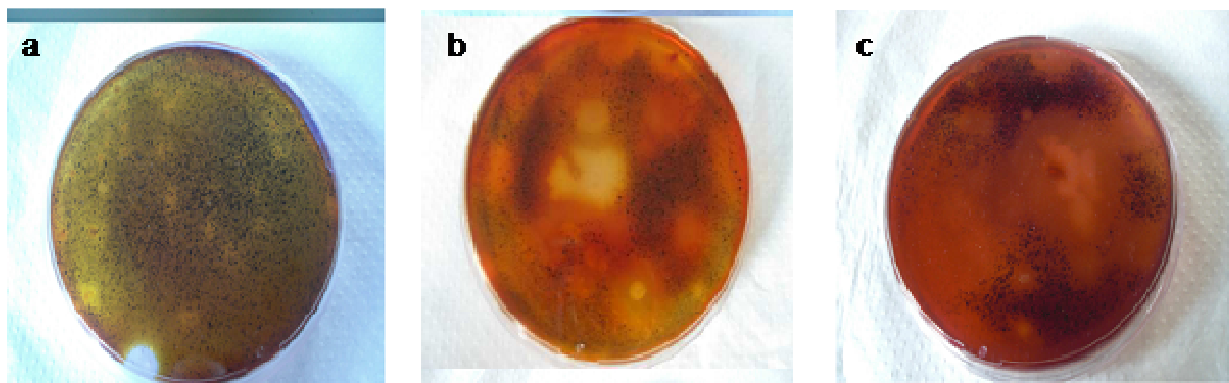


Figure 69 : Apparition des zones claires autour des colonies dégradant le matériau (à base de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol). (a) Boîte de Petri après 2 jours d'incubation, (b) après 5 jours et (c) après 6 jours d'incubation.

Après 48h d'incubation, l'hydrolyse et la diffusion des enzymes ne sont pas assez avancées pour permettre l'observation de halo, la gélose est donc recouverte de grains de matériau colorés en bleu. En revanche, après 5 jours, on observe nettement l'action des enzymes sur le matériau et donc la disparition des grains d'amidon. Ce phénomène est encore plus marqué après 6 jours d'incubation. Il est à noter que pour la gélose à l'amidon (témoin positif), 3 jours ont suffi à l'apparition d'un halo (figure 70).

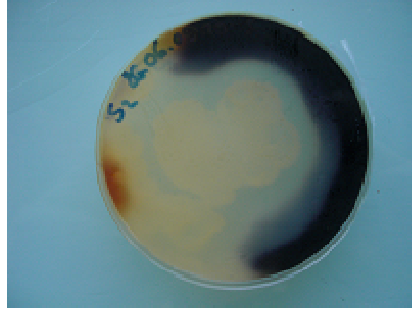


Figure 70 : Apparition d'une zone claire après 2 jours d'incubation autour de la colonie hydrolysant l'amidon.

Cette différence de temps d'incubation est probablement due à la différence de disponibilité de l'amidon dans les deux milieux. En effet, pour le témoin positif, l'amidon est directement disponible alors que dans la gélose contenant le matériau, l'amidon est entouré d'une couche de protéines le rendant plus difficilement accessible aux enzymes amylolytiques synthétisées par les microorganismes de la boue.

L'identification de la souche présentant le plus grand halo, a mis en évidence un bacille Gram⁺, catalase positive et qui hydrolyse l'amidon. D'après les résultats de la galerie API 50 CHB, il s'agit de *Bacillus subtilis* à 98,9 %. D'après [Nigam et al. \(1995\)](#), *Bacillus subtilis* fait partie des microorganismes producteurs d' α -amylase et d'amyloglucosidase.

1.2.3. Evaluation de la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs : influence du matériau et du procédé

Dans un premier temps l'influence du traitement thermomécanique imposé par le procédé d'extrusion-injection sur la biodégradation en milieu liquide de matériau (à base de 92% de farine de maïs et de 8% de glycérol) a été évaluée par des essais en respiromètres fermés ([figure 71](#)).

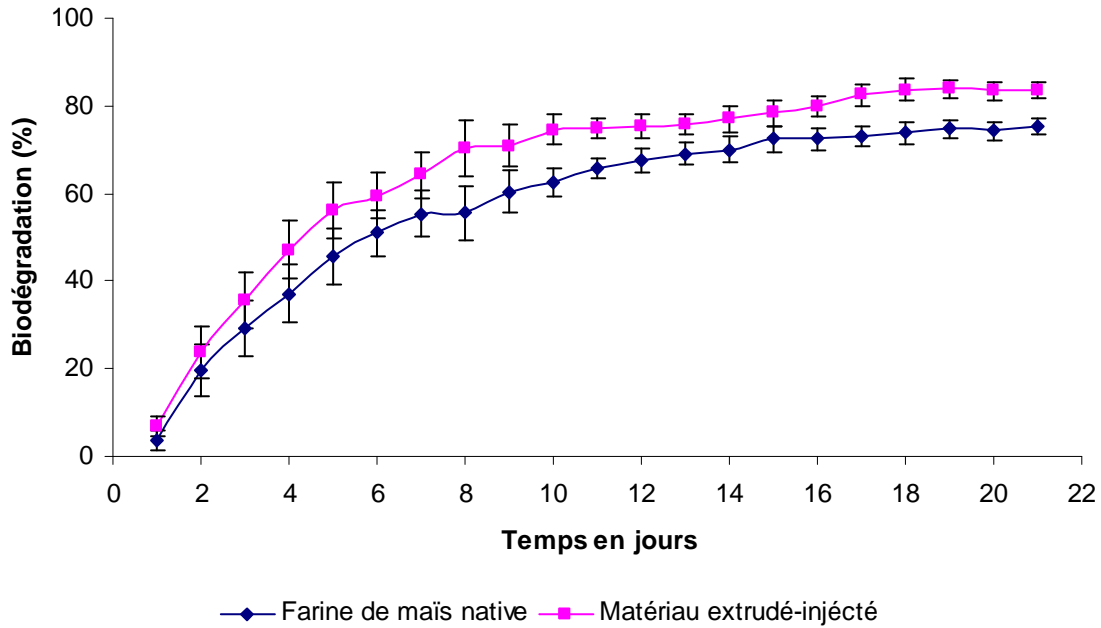


Figure 71 : Evolution du pourcentage de biodégradation de la farine de maïs avant et après le traitement thermomécaniques d'extrusion et d'injection.

La [figure 71](#) montre qu'après 20 jours d'incubation, la farine non extrudée atteint 75% de biodégradation contre 85% pour le matériau extrudé-injecté. Ce résultat met en évidence une augmentation de 10% du pourcentage de biodégradation suite au traitement thermomécanique. Ce résultat s'explique probablement par le fait que le traitement thermomécanique rend l'amidon amorphe et faciliterait ainsi son hydrolyse par les enzymes amylolytiques synthétisées par les microorganismes présents dans la boue. Ces résultats rejoignent ceux de [Stanojlovic-Davidovic \(2006\)](#) qui a montré qu'au bout de 31 jours d'incubation, l'amidon expansé atteint un taux de biodégradation de l'ordre de 73% contre 21% pour l'amidon natif

Dans un second temps, l'influence de la formulation d'une part et du taux de cisaillement lors de l'extrusion d'autre part sur la biodégradation a été évaluée par mesure de la demande biologique en oxygène ([La figure 72](#)).

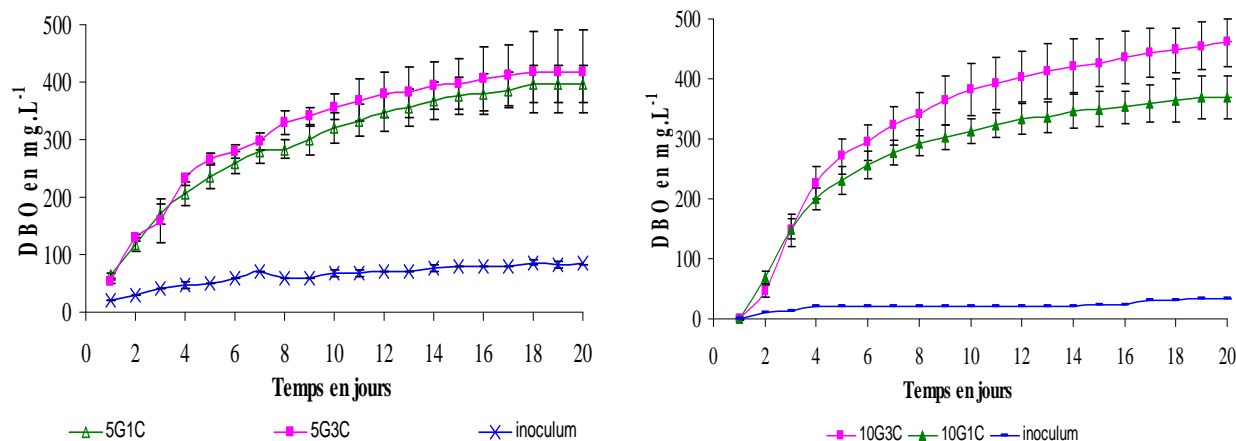


Figure 72 : Evolution de la demande biologique en oxygène à 23°C des matériaux 5G1C, 5G3C, 10G1C et 10G3C broyés et tamisés avec un tamis de diamètre 0,2 mm. 10G1C et 10G3C: matériaux extrudés-injectés à base de 10% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement. 5G1C et 5G3C: matériaux extrudés-injectés à base de 5% glycérol ayant subi 1 ou 3 zones de cisaillement.

Les résultats obtenus révèlent que les matériaux cisailés trois fois ont une demande biologique en oxygène significativement plus importante que celle des matériaux cisailés une fois. L'analyse des résultats présentés dans le [tableau 12](#) montre que le cisaillement améliore significativement le processus de la biodégradation pour les matériaux à base de farine de maïs quelle que soit la formulation. De plus, les matériaux à 10% de glycérol présentent un taux de biodégradation plus élevé que ceux à 5% de glycérol.

Tableau 12 : Evolution de la biodégradation dans le temps selon le profil de cisaillement

Matériau	Pourcentage de biodégradation après 20 jours (%)
10G1C	95±10,2
10G3C	110±11,3
5G1C	88±9,6
5G3C	93±3,6

Selon la norme ISO 15851/1999, un matériau plastique est considéré biodégradable en utilisant le test de DBO en milieu aqueux dans un respiromètre fermé si le taux de biodégradation ultime dépasse 60% en fin de l'essai (quand la DBO atteint un niveau stationnaire). Dans notre cas, quels que soient la formulation et le taux de cisaillement utilisés les matériaux à base de farine de maïs sont biodégradables en milieu liquide aérobie.

2. La biodégradation en milieu anaérobie

Afin d'évaluer la biodégradabilité des matériaux à base de farine de maïs dans un milieu anaérobie liquide, des tests de biodégradation utilisant la boue anaérobie comme inoculum ont été réalisés par mesure de la capacité de l'inoculum à produire du méthane en utilisant les matériaux comme seule source de carbone.

2.1. Caractérisation du matériau et de l'inoculum

Le tableau 13 présente les valeurs de la matière sèche, de la matière volatile et le pourcentage de carbone organique total de la farine de maïs et des matériaux extrudés-injectés à base de farine de maïs ainsi que de la boue anaérobie utilisée lors des essais de biodégradation.

Tableau 13 : Pourcentages de matière sèche et de matière volatile sèche des échantillons et de la boue anaérobie.

	Pourcentage de matière sèche (MS)	Pourcentage matière volatile sèche (MVS)	Pourcentage de carbone organique total COT	DCO en mg O ₂ /g MS
Boue anaérobie	2,00 ± 0,03	53,54 ± 0,63	-	-
farine de maïs	92,52 ± 0,73	97,47 ± 1,40	42,15 ± 0,62	1243 ± 40
10G1C*	91,71 ± 0,51	98,56 ± 0,37	42,30 ± 0,93	1252 ± 40
5G1C*	91,31 ± 0,47	98,77 ± 0,04	42,31 ± 0,56	1235 ± 43
8G*	93,59 ± 0,55	99,08 ± 0,80	43,41 ± 2,17	1190 ± 48

* **10G1C** : matériaux à base de 75% de farine de maïs, 10% glycérol et 15% d'eau obtenus en utilisant 1 seule zone de cisaillement. **5G1C** : matériaux à base de 75% de farine de maïs, 5% glycérol et 20% d'eau obtenus en utilisant 1 seule zone de cisaillement. **8G** : matériaux à base de 92% de farine de maïs et 8% glycérol.

L'analyse des résultats montre que ni la formulation, ni le procédé d'extrusion-injection n'ont une influence significative sur le pourcentage de matière sèche, de matière volatile et du carbone organique total. Les valeurs de demande chimique en oxygène (DCO) obtenues vont servir pour le calcul du pourcentage de méthane théorique qui devrait être produit par les échantillons si leur biodégradation était totale. La boue anaérobie utilisée pour

les tests biométhanogènes est quant à elle constituée de seulement 2% de matière sèche dont 53% était de la matière volatile.

2.2. Evaluation de la biodégradation par mesure de production de biogaz de matériaux à base de farine de maïs

2.2.1. Influence du traitement thermomécanique

L'évolution de la production de biogaz durant l'incubation de la farine native et du matériau extrudé-injecté (92% de farine de maïs et 8% glycérol) est présentée dans la figure 73.

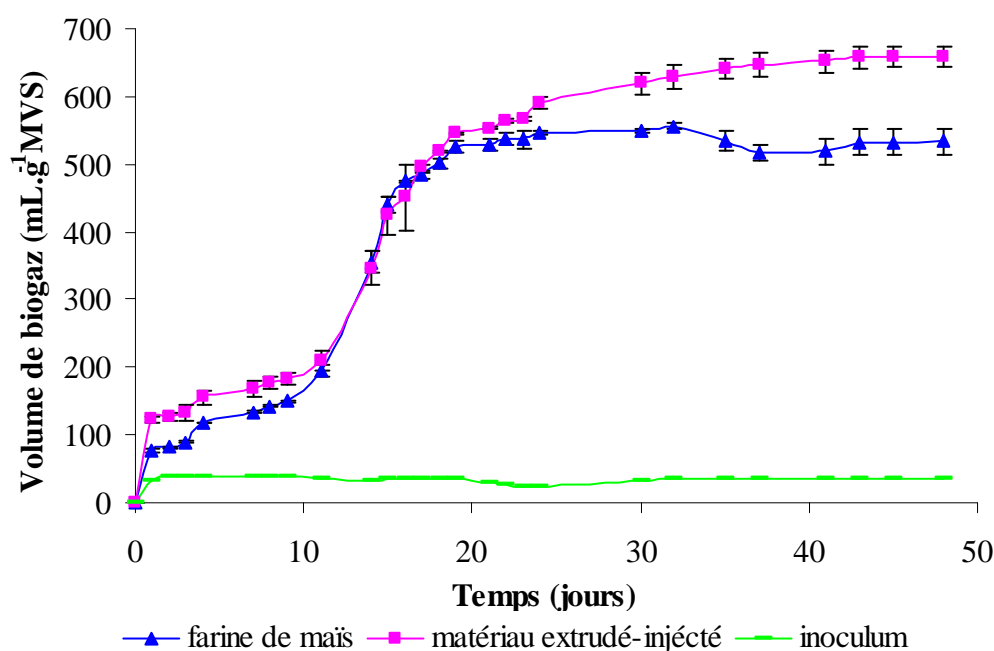


Figure 73 : Evolution de la production de biogaz durant 48 jours lors de la biodégradation anaérobie à 35°C de la farine de maïs non extrudée et des matériaux élaborés par extrusion puis injection d'un mélange de 92% (m/m) de farine de maïs et de 8% (m/m) de glycérol. (Les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3).

En premier lieu, il est noté que la production de biogaz pour les deux échantillons testés ne présente pas la phase de latence habituellement retrouvée pour d'autres matériaux tels le PLA et le PCL (Yagi *et al.*, 2009). Par ailleurs, les résultats obtenus montrent une production finale après 48 jours d'incubation de $658 \pm 15,6$ mL.g⁻¹MVS de biogaz pour le matériau extrudé-injecté contre seulement $551 \pm 19,14$ mL.g⁻¹MVS pour la farine n'ayant subi aucun traitement thermomécanique. En revanche la composition du biogaz produit ne présente aucune différence entre le matériau extrudé et la farine native avec une dominance

marquée du CO₂ et une phase de latence de la production du méthane d'environ 10 jours (figure 74).

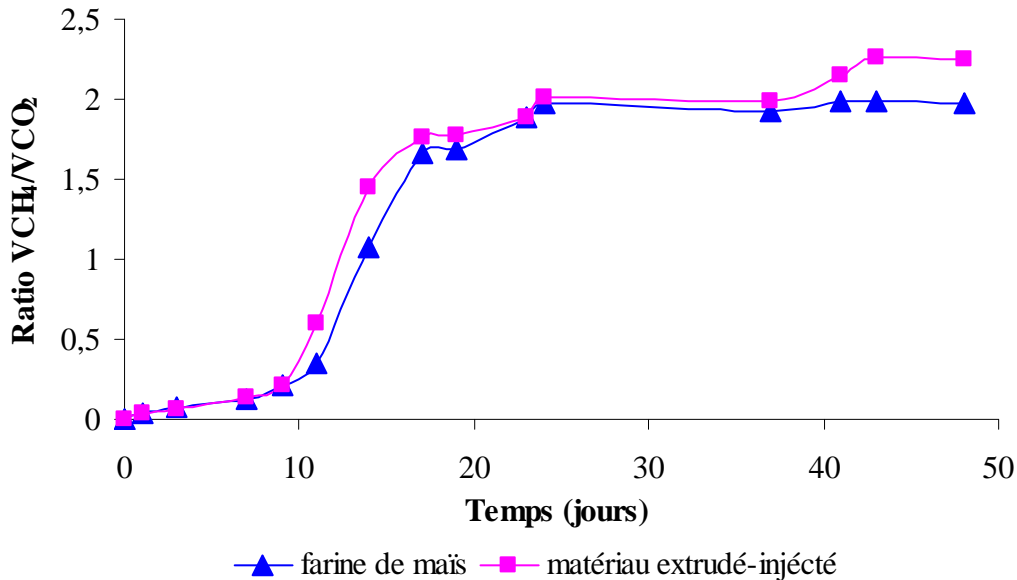


Figure 74 : Evolution de la production de CO₂ et de CH₄ durant 48 jours de la biodégradation anaérobie à 35°C en fonction du traitement thermomécanique.

Selon [Massardier-Nageotte *et al.* \(2006\)](#), cette phase de latence correspond au temps nécessaire à l'adaptation de l'inoculum au substrat. A la fin du test, le rapport CH₄/CO₂ atteint une valeur de 2,24 ce qui est du même ordre de grandeur que les résultats obtenus par ces mêmes auteurs sur la cellulose dans les mêmes conditions opératoires.

Les 10 premiers jours correspondent à l'étape d'acidogénèse et d'acétogénèse qui sont connues par la production du CO₂ par des bactéries acidogènes et acétogènes ([Batstone *et al.*, 2002](#)). Les produits de dégradation issus de la phase acétogène sont utilisés par les bactéries méthanogènes qui ne sont capables d'utiliser qu'un petit nombre de substrats organiques nécessaires pour leur croissance ce qui explique la phase de latence de la production du méthane.

Le [tableau 14](#) révèle une augmentation du pourcentage de biodégradation ultime de 11 % après le traitement thermomécanique de la farine de maïs.

Tableau 14 : Evolution du pourcentage de biodégradation en fonction du traitement thermomécanique (les pourcentages de biodégradation correspondent à la moyenne de 3 essais et sont suivis de l'écart type).

Echantillon	Pourcentage de biodégradation après 48 jours d'incubation à 35°C
farine de maïs non extrudée	85,1±8,0
matériau extrudé-injecté (farine 92% -glycérol 8%)	96,9±0,8

Le traitement thermomécanique généré par le procédé d'extrusion/injection semble donc améliorer la biodégradation du matériau testé. Ce résultat est lié de la même façon que pour les résultats obtenus pour ces tests de biodégradation par respirométrie aérobie, à la déstructuration de l'amidon au cours du procédé rendant le matériau plus accessible aux enzymes synthétisées par les microorganismes anaérobies.

2.2.2. Influence de la formulation (taux de glycérol) et du procédé (taux de cisaillement) sur la biodégradation anaérobie

De la même façon que précédemment, pour mettre en évidence l'influence de la formulation et du procédé sur la biodégradation anaérobie des matériaux à base de farine de maïs, deux taux de glycérol et deux profils de cisaillement ont été utilisés pour produire des matériaux. L'évolution de la production de biogaz pour chacun des 4 matériaux est présentée dans la [figure 75](#).

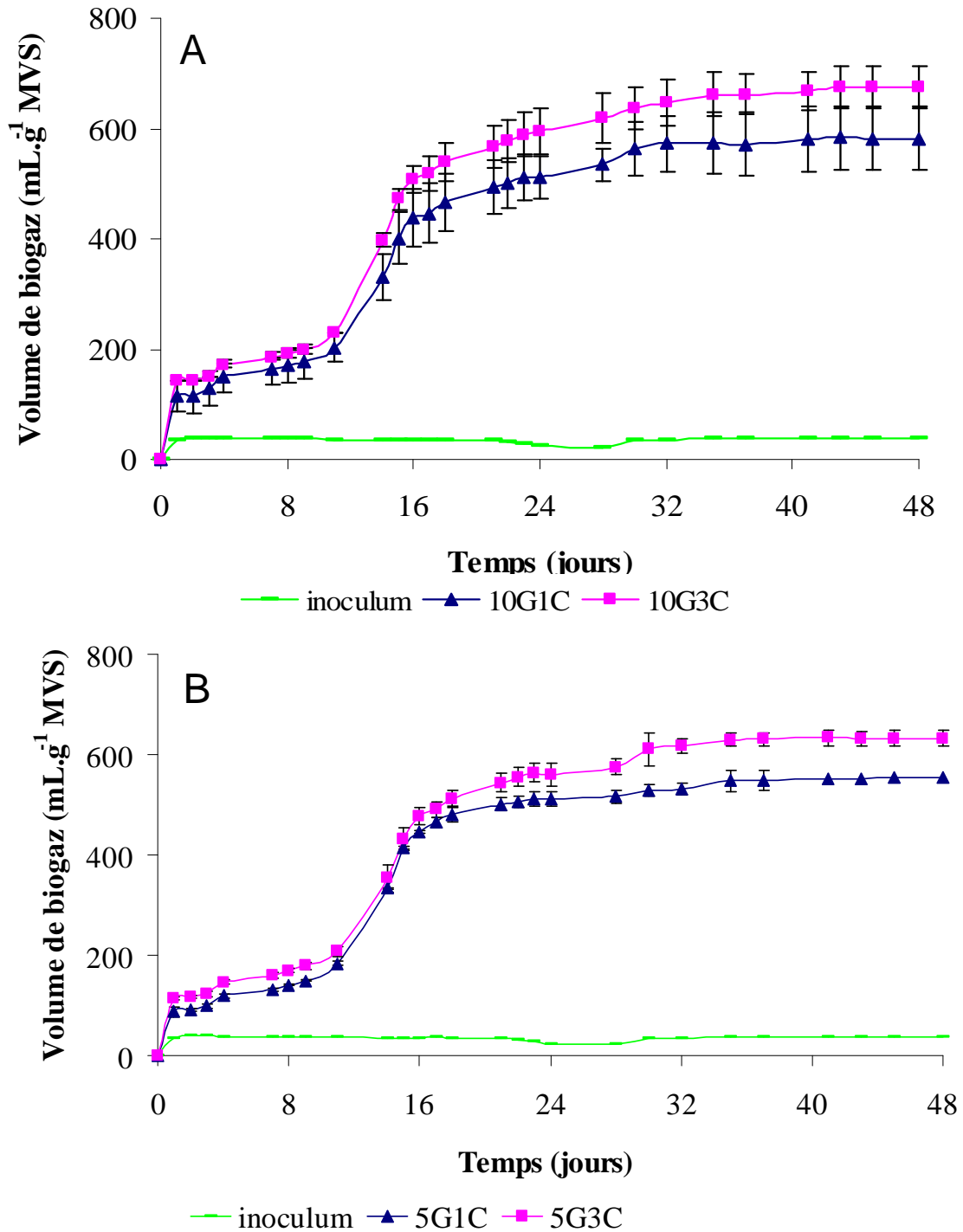


Figure 75 : Evolution de la production de biogaz durant 48 jours de biodégradation anaérobie à 35°C des matériaux extrudés-injectés en fonction du taux de cisaillement appliqué. A correspond au matériau à 10% glycérol cisailé 1 (10G1C) ou 3 fois (10G3C) et B correspond au matériau à 5% glycérol cisailé 1 (5G1C) ou 3 fois (5G3CC). (les valeurs de biogaz reportées correspondent à la moyenne de 3 essais et les barres d'erreur correspondent à l'écart type).

Pour la formulation à 10% glycérol, l'utilisation d'un profil à 3 zones de cisaillement au lieu d'une seule fait passer le volume de biogaz ultime (après 48 jours) de 584 mL.g⁻¹MVS (pour le matériau 10G1C) à 675 mL.g⁻¹MVS (pour le matériau 10G3C) (figure 75 A).

Pour la formulation à 5% de glycérol, la quantité de biogaz ultime produite est de 554,81 mL.g⁻¹MVS ($\pm 5,43$) pour le matériau 5G1C et 632 mL.g⁻¹MVS ($\pm 15,05$) pour le matériau 5G3C (figure 75 B). Par conséquent, pour les deux taux de plastifiant testés, l'augmentation du cisaillement favorise significativement la production de biogaz et la biodégradation.

Par ailleurs, pour les quatre matériaux (10G1C, 10G3C, 5G1C et 5G3C), une phase de latence d'environ 10 jours est observée pour la production du méthane qui correspond probablement au temps d'adaptation de l'inoculum au substrat à dégrader. Pendant les 10 premiers jours le biogaz produit a été essentiellement composé de CO₂ (figure 76). L'analyse des résultats présentés dans la figure 13 montre que la composition du biogaz produit n'est affectée ni par le taux de glycérol, ni par le profil de cisaillement des matériaux au cours de l'extrusion.

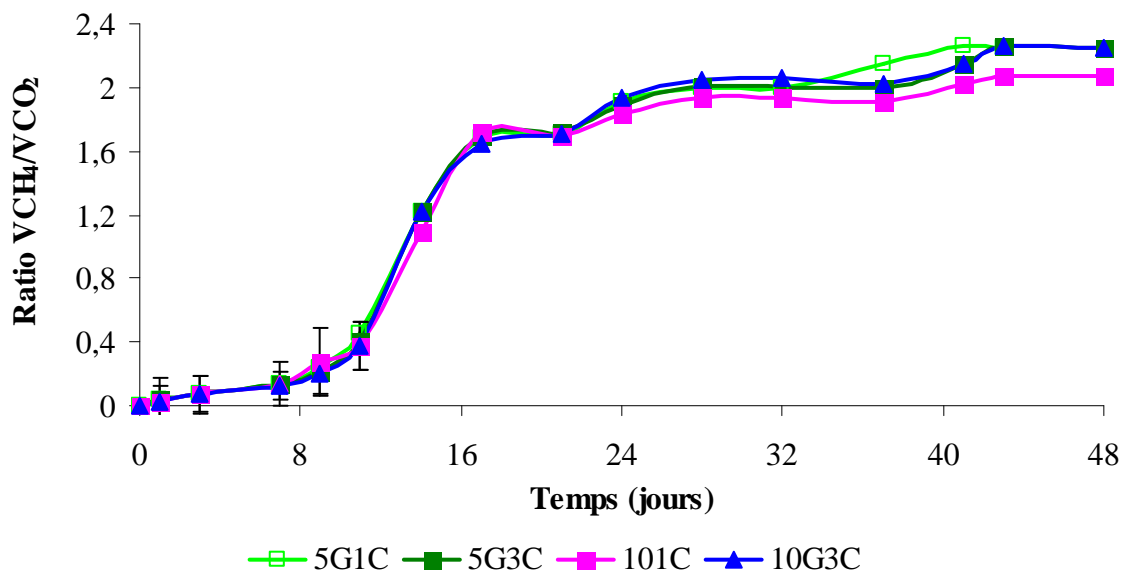


Figure 76 : Evolution du ratio CH₄/ CO₂ produit durant 48 jours lors de la biodégradation anaérobie à 35°C en fonction du taux de glycérol et du nombre de cisaillements (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3).

Le tableau 15 rassemble les pourcentages de biodégradation ultime des 4 matériaux élaborés à base de farine de maïs.

Tableau 15 : Evolution du pourcentage de biodégradation en fonction de la formulation et du profil de cisaillement.

Matériaux	Pourcentage de biodégradation après 48 jours d'incubation
5G1C	68,5±4,6
5G3C	79,2±4,2
10G1C	83,2±6,8
10G3C	100,6±8,3

Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation très significative du pourcentage de biodégradation (de 17% pour les matériaux à 10% de glycérol et de 10% pour les matériaux à 5% de glycérol) lorsque 3 zones de cisaillement au lieu d'une seule sont présentes dans la zone de convoyage de l'extrudeuse. La comparaison des deux formulations montre que la formule à 10% de glycérol présente un pourcentage de biodégradation ultime plus élevé que la formule à 5% quelque soit le profil de cisaillement utilisé. Cela pourrait être lié à la structure des matériaux. En effet, la formule à 10% de glycérol est plus facilement dégradée par les microorganismes par rapport à la formule à 5% de glycérol car l'augmentation du pourcentage de glycérol et du taux de cisaillement conduit à une déstructuration plus poussée de l'amidon et des protéines (cf partie I du chapitre III) facilitant ainsi probablement l'accessibilité des microorganismes.

Contrairement à l'étude par respirométrie aérobie, on note ici l'influence d'un couplage formulation/procédé sur la biodégradabilité dans le sens où le taux de cisaillement améliore la biodégradation et ce d'autant plus que la farine de maïs est formulée avec un taux de glycérol plus important.

Quels que soient la formulation et le profil de cisaillement utilisés, les matériaux à base de farine de maïs peuvent être considérés biodégradables en milieu anaérobie selon la norme ISO 11734/1995 qui exige une dégradation en biogaz d'au moins 50% de matériau au bout de 2 mois.

2.2.3. Adaptation de l'inoculum à son substrat

La dégradation des matériaux chimiques ou organiques en milieu anaérobie nécessite une phase de latence qui correspond à la durée mesurée en jours à partir du début de l'essai jusqu'à l'adaptation et/ou la sélection des microorganismes responsables de la dégradation. Cette phase dure jusqu'à ce que le pourcentage de biodégradation du matériau atteigne environ 10% du niveau maximal de la biodégradation. En revanche, la durée peut être variable d'un inoculum à un autre. Afin de pallier au problème de la phase de latence de la production de méthane, un deuxième ajout du matériau a été effectué en utilisant le même milieu que le premier test. L'objectif était ainsi d'évaluer si une adaptation de l'inoculum au substrat influençait la durée et le pourcentage de biodégradation. Les résultats présentés dans la figure 77 mettent en évidence une accélération de la production de biogaz total quels que soient la formulation et le profil de cisaillement employé.

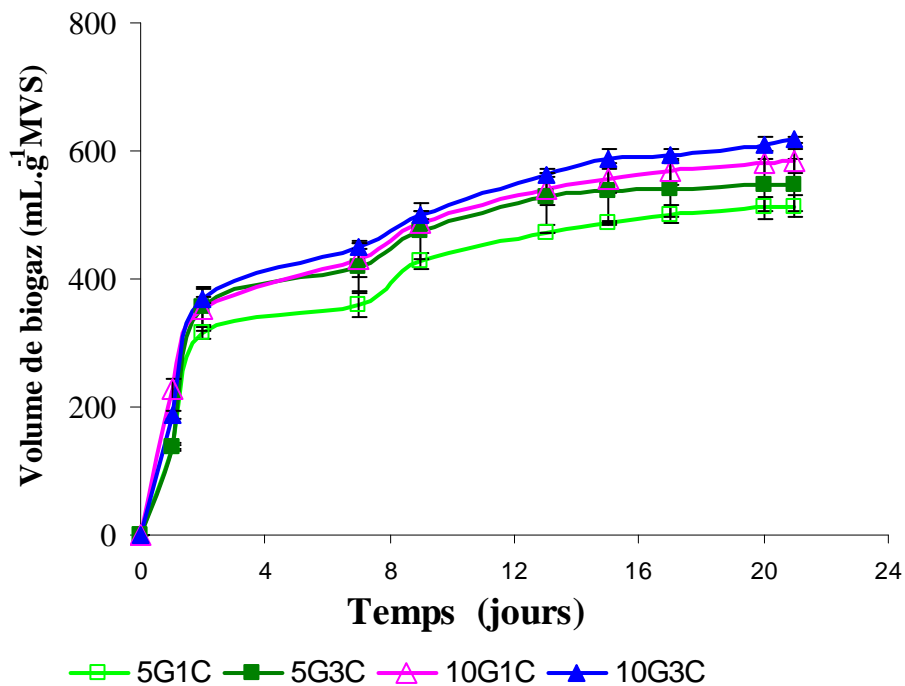


Figure 77 : Evolution de la production de biogaz durant 21 jours de biodégradation anaérobie à 35°C en fonction du nombre de cisaillements et du pourcentage de glycérol après un 2^{ème} rajout de matériau (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec n = 3).

La production de biogaz atteint le plateau au bout de 20 jours au lieu de 48 jours. De plus, la production initiale de méthane est accélérée de 20 fois par rapport au premier ajout (figure 78). Dès le premier jour, la quantité de CH₄ produite est égale à celle de CO₂ puis elle passe au dessus à partir du dixième jour.

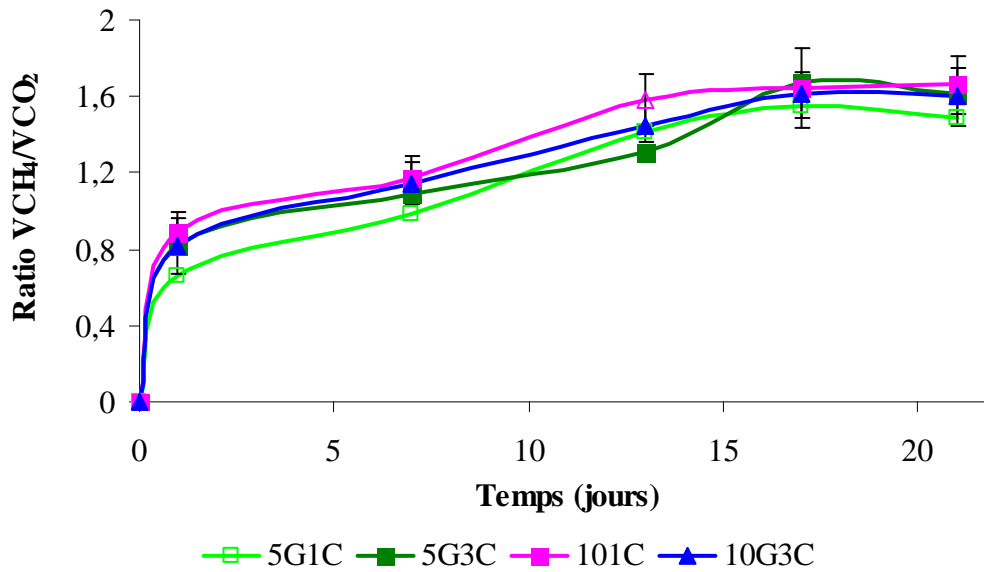


Figure 78 : Evolution du ratio CH_4/CO_2 produit durant 21 jours de la biodégradation anaérobie à 35°C en fonction des traitements thermomécaniques (1 ou 3 zones de cisaillement) et de la formulation (mélange de farine de maïs-glycérol à 5 ou 10%) des matériaux après le 2^{ème} rajout de matériau.

2.2.4. Influence de l'aire spécifique du matériau

Les cinétiques d'hydrolyse enzymatique des matériaux à base de farine de maïs par des enzymes amylolytiques présentées dans la partie II du chapitre III ont montré l'existence d'une relation exponentielle entre la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon et l'aire spécifique ce qui a suggéré que l'accessibilité de l'amidon est probablement limitée par la diffusion des enzymes dans le substrat. Dans ce contexte, l'influence de l'aire spécifique des matériaux à base de farine de maïs sur le taux de biodégradation en milieu anaérobie a également été étudiée (figure 79).

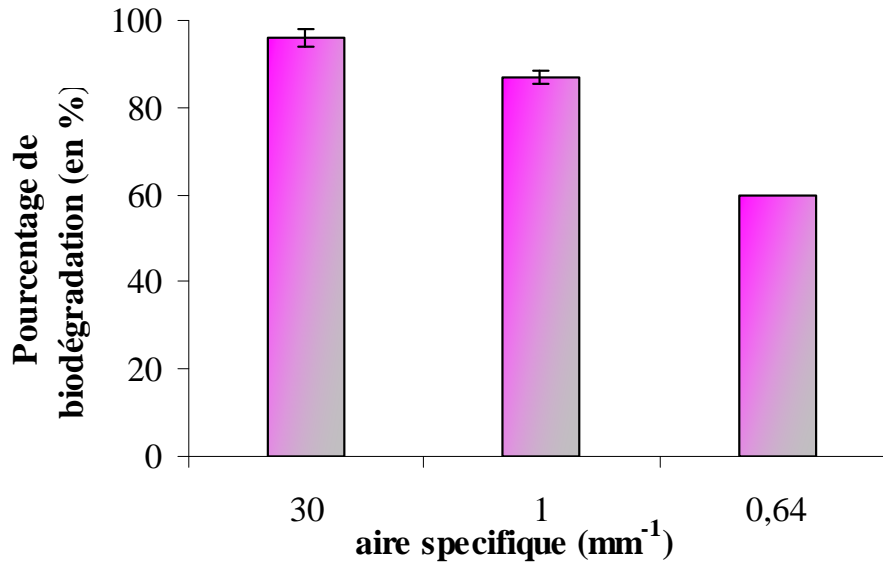


Figure 79 : Evolution de la biodégradation anaérobie en fonction de l'aire spécifique du matériau (à base de 92% de farine de maïs et de 8% glycérol) extrudé-injecté après 48 jours d'incubation à 35°C en conditions anaérobies (les barres d'erreur correspondent à l'écart type avec $n = 3$).

La figure 79 montre une augmentation significative du pourcentage de biodégradation liée à l'augmentation de l'aire spécifique du matériau. Les résultats obtenus révèlent que l'augmentation de l'aire spécifique des matériaux conduit à une augmentation de 36% du pourcentage de biodégradation lorsque celle-ci passe de 0,64 à 30 mm⁻¹ et pour une aire spécifique de 30 mm⁻¹ au bout de 48 jours le pourcentage de biodégradation de 97,0 ± 2% est très proche de 100% et peut donc être considéré comme ultime. Broyer plus finement les matériaux pour augmenter l'aire spécifique constitue donc aussi un moyen pour réduire la durée des tests de biodégradation par voie microbienne.

3. Conclusion générale

Les différentes méthodes d'évaluation de la biodégradabilité (aérobie en milieu liquide, compostage (aérobie en milieu semi solide) et anaérobie en milieu liquide) employées dans cette étude ont permis de mettre en évidence plusieurs résultats intéressants tant sur l'influence du matériau au travers de la formulation que sur l'influence du procédé. Il a été montré que le traitement thermomécanique d'extrusion/injection améliore le pourcentage de la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs quelque soit le milieu de biodégradation. De plus, la formulation et le profil de cisaillement influencent aussi la biodégradation.

L'utilisation d'un profil avec trois zones de cisaillement et un taux élevé en glycérol (10%) accélèrent significativement la biodégradation en milieu aérobie et anaérobie liquide. En revanche en compost, ni la formulation, ni le taux de cisaillement ne semblent avoir un effet sur le taux de biodégradation. Néanmoins, les observations en MEBE de l'évolution des matériaux au cours du compostage ont révélé que la dégradation des matériaux est effectuée par des moisissures dont les enzymes dégradent d'abord les régions amorphes. En effet, les résultats des hydrolyses enzymatiques des matériaux par des enzymes amylolytiques ont aussi révélé que le traitement thermomécanique accélère la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon. Le traitement thermomécanique (extrusion/injection) rend l'amidon partiellement amorphe ce qui facilite l'attaque enzymatique des matériaux par des enzymes amylolytiques synthétisées par les microorganismes présents dans le milieu de dégradation. De plus, l'augmentation du stress mécanique (nombre de zones de cisaillement) permet une amorphisation totale de l'amidon ($\Delta H=0\text{J.g}^{-1}$) et une dénaturation des protéines qui à l'état natif, jouent un rôle barrière contre l'attaque enzymatique de l'amidon. Il a déjà été montré que l'amidon amorphe est plus facilement hydrolysable que l'amidon cristallin. Les matériaux à 10% glycérol présentent un pourcentage de biodégradation plus élevé que ceux à 5% de glycérol. Les résultats de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), de la diffraction des rayons X (RX) et de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) ont montré que l'augmentation du taux de glycérol conduit à une meilleure déstructuration de l'amidon et des protéines et par conséquent à une meilleure accessibilité de l'amidon à l'attaque microbienne et enzymatique.

En plus du traitement thermomécanique, l'aire spécifique des matériaux influence significativement le taux et le temps de biodégradation. Plus l'aire spécifique est grande, plus la biodégradation est accélérée. Plusieurs études ont relié cela à un phénomène d'érosion-diffusion (Helbert *et al.*, 1996, Al-Rabadi *et al.*, 2009). Dans un premier temps, le substrat insoluble subit une érosion de la surface qui facilite par la suite la diffusion des enzymes. En revanche, le temps nécessaire à la biodégradation des matériaux reste aussi conditionné par la méthode de dégradation employée. Quelle que soit la méthode utilisée, l'augmentation de l'aire spécifique des matériaux à base de farine de maïs conduit à une diminution du temps nécessaire pour atteindre 50% de biodégradation (figure 80). La relation entre le temps nécessaire pour obtenir 50% de biodégradation et l'aire spécifique n'est pas linéaire pour les tests en milieu liquide (dégradations enzymatique et anaérobie). Pour les deux tests anaérobie et enzymatique, une accélération légère du processus de biodégradation est observée pour des aires spécifiques comprises entre 1 et 3 mm^{-1} . Cela indique que pour des particules ayant un diamètre supérieur à 6 mm (aire spécifique inférieure à 1 mm^{-1}), la farine de maïs contenue

dans le matériau extrudé est difficilement accessible aux agents de la biodégradation (enzymes et/ou microorganismes). En revanche, le caractère hygroscopique du matériau, le gonflement dans l'eau et l'amorphisation de l'amidon suite au traitement thermomécanique pourraient favoriser le phénomène d'érosion-diffusion par les enzymes au cours du processus de la biodégradation. La relation entre l'aire spécifique et la biodégradation par enfouissement dans le compost pour des aires spécifiques comprises entre 1 et 30 mm⁻¹ n'a pas pu être mesurée. Cependant, pour l'enfouissement dans le compost qui est un test de biodégradation réalisé en milieu solide ou semi solide, la limitation du transfert de matière est probablement différente de celle en milieu liquide.

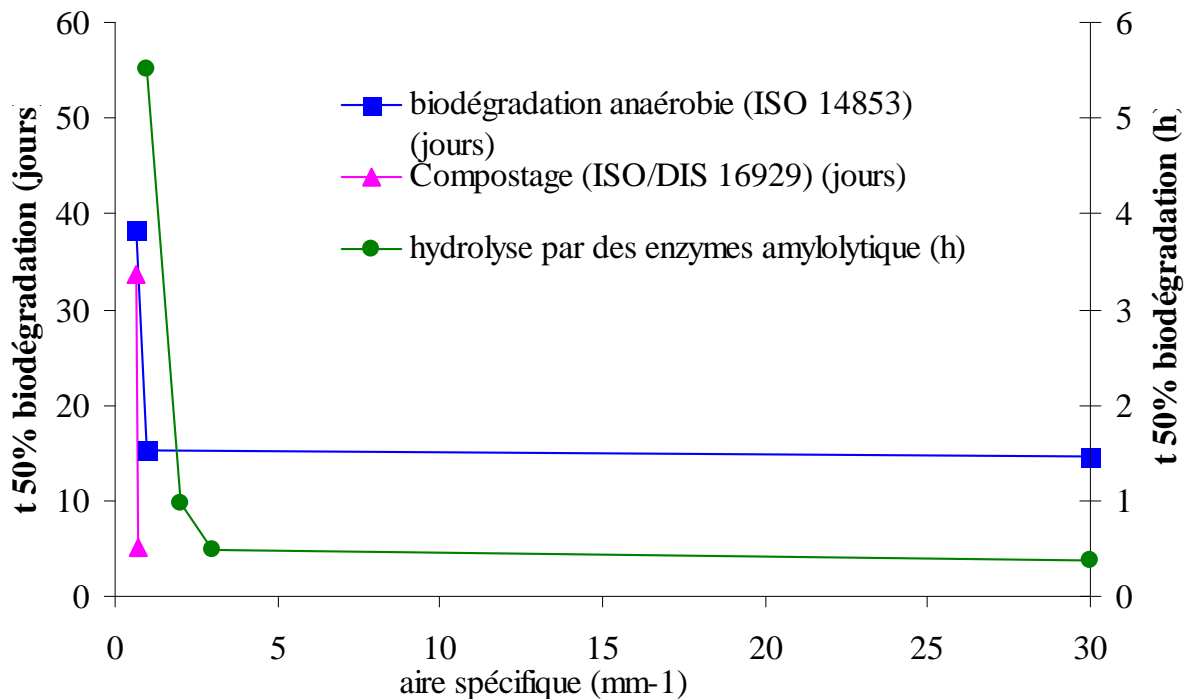


Figure 80 : Temps nécessaire pour atteindre 50% de biodégradation des matériaux à base de farine de maïs en fonction de leurs aires spécifiques pour la biodégradation anaérobie, le compostage et enzymatique.

L'inoculum s'est aussi avéré être un facteur influençant le taux et le temps de biodégradation des matériaux à base de farine de maïs. Pour les boues aérobies, l'activité de l'inoculum (demande biologique en oxygène) est directement liée à la saison ce qui peut perturber les résultats obtenus. Pour pallier cela, il est préférable de réaliser les tests de biodégradation avec le même échantillon de boue. En plus de la saison, les boues anaérobies ont besoin d'une adaptation au préalable au substrat afin de réduire la phase de latence pour accélérer le processus de biodégradation.

Quelle que soit la méthode employée pour estimer la biodégradabilité des matériaux à base de farine de maïs, les résultats obtenus convergent vers les mêmes conclusions qui ont pu révéler que le taux de biodégradation des matériaux est strictement lié à ses propriétés physico-chimiques. Les tests enzymatiques ont permis de donner une idée précise sur l'état physique de l'amidon (semi cristallin ou amorphe) et sur l'organisation du réseau protéique autour des grains d'amidon en fonction de la formulation et du procédé et complètent ainsi les résultats obtenus par la DSC, RX et la MCBL. En plus de la structure des matériaux, les tests enzymatiques peuvent constituer un test rapide d'estimation de dégradation des matériaux à base de farine de maïs.

Le caractère hygroscopique des matériaux à base de farine de maïs peut être propice au développement des microorganismes à leur surface. L'ajout d'agents antimicrobiens dans la formulation pourrait limiter ce risque. Des résultats préliminaires visant à incorporer des agents antimicrobiens biodégradables dans la formulation avant le traitement thermomécanique d'extrusion sont présentés dans le paragraphe suivant.

Matériaux antimicrobiens à base de farine de maïs

En vue d'une application pour le conditionnement de produits alimentaires, il convient que les matériaux à base de farine de maïs ne constituent pas des vecteurs potentiels de contamination des aliments par des flores d'altérations ou pathogènes. Ce risque pouvant être accru dans le domaine des matériaux biodégradables, l'intégration de conservateurs naturels également biodégradables a été envisagée. D'après Appendini *et al.* (2002), les voies traditionnelles utilisées pour obtenir un emballage actif sont les suivantes: (i) addition dans l'emballage de sachets/pads contenant des agents antimicrobiens, (ii) dépôt des antimicrobiens sur la surface du polymère, (iii) immobilisation des antimicrobiens sur le polymère par des liaisons ioniques ou covalentes et (iv) incorporation directe d'un agent antimicrobien volatil ou non volatil dans le polymère. Pour cette dernière, l'incorporation se fait habituellement par voie solvant ou casting. En revanche, dans des études récentes, l'incorporation de l'agent antimicrobien avant extrusion a été évaluée ce qui fait subir à la molécule antimicrobienne un stress thermique et mécanique (Nam *et al.*, 2007) mais rend le processus industrialisable. Au cours de cette étude, il a été observé que la teneur en eau de l'amidon de pois influence l'activité antimicrobienne du lysozyme. La formulation à 40% d'eau a préservé jusqu'à 48% de son activité initiale après extrusion à 90°C. En revanche, l'application d'un cisaillement fort a conduit à une inactivation de l'activité antimicrobienne du lysozyme. Dans la même optique, 1% de lysozyme a été incorporé dans la farine de maïs

préalablement plastifié à des taux variables en glycérol puis extrudée à différentes températures. Il a été possible de faire varier la teneur en eau en pré-conditionnant la farine plastifiée dans des atmosphères d'humidités relatives comprises entre 58 et 75% pendant 72h à 25°C. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'influence du traitement thermomécanique d'extrusion, du taux du glycérol et du taux de l'humidité relative sur la stabilité de l'activité du lysozyme.

L'activité résiduelle du lysozyme, préalablement incorporé à 1% dans le matériau puis extrait du matériau extrudé par une hydrolyse par des enzymes amylolytiques, a été dosée en mesurant la diminution d'absorbance à 450 nm d'une suspension de parois bactériennes de *Micrococcus lysodeikticus*. En effet, le lysozyme catalyse l'hydrolyse des liaisons osidiques β -(1-4) entre l'acide N-acétylmuramique (M) et la N-acétyl glucosamine (G) du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Cela entraîne une diminution de l'absorbance ce qui permet de déterminer l'activité catalytique de l'enzyme.

Les influences de la température d'extrusion (de 90 à 120°C), du taux d'humidité et du taux de glycérol sur l'activité résiduelle du lysozyme ont été évaluées. L'augmentation de la température d'extrusion a diminué significativement l'activité résiduelle du lysozyme avec une inactivation quasi-totale pour des températures supérieures à 100°C (figure 81). Le pourcentage de glycérol a également influencé l'activité de l'agent antimicrobien, avec une activité résiduelle divisée par 7 lorsque la concentration en glycérol dans le matériau passe de 30% à 25% (figure 81).

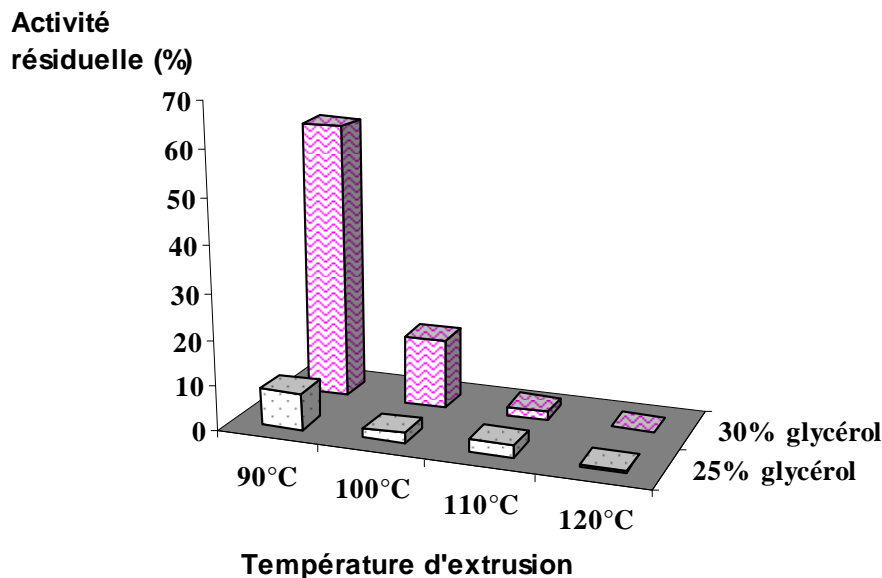


Figure 81 : Evolution de l'activité résiduelle du lysozyme en fonction de la température (90, 100, 110 et 120°C) d'extrusion et du taux de glycérol dans la farine de maïs (25 et 30 % de glycérol). La farine de maïs est pré-conditionnée à 50% HR avant extrusion.

Par ailleurs, un conditionnement préalable de la farine de maïs plastifiée à des humidités relatives supérieures à 50% a favorisé l'inactivation du lysozyme au cours de l'extrusion (figure 82).

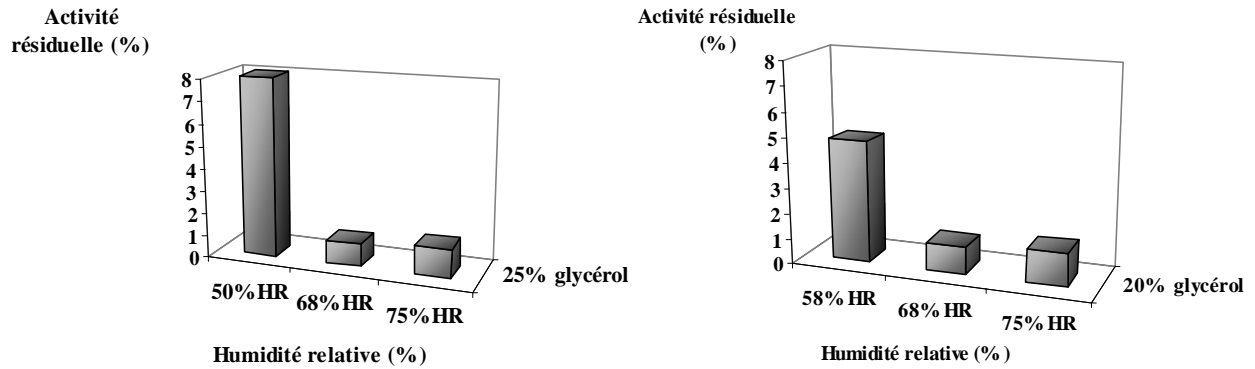


Figure 82 : Evolution de l'activité résiduelle du lysozyme en fonction du pourcentage d'humidité relative (HR) des matériaux à 20 et 25% glycérol extrudé à 90°C.

Pour compléter cette étude, la vérification du caractère bactériostatique des matériaux antimicrobiens à base de farine de maïs contenant du lysozyme sur des souches bactériennes sensibles est envisagée. Le choix du lysozyme a été basé sur la facilité du dosage de l'activité résiduelle après extrusion, il est donc nécessaire à ce stade d'effectuer la même étude sur d'autre molécules comme la nisine très étudiée au laboratoire BioDyMIA ou des composés antifongiques comme le sorbate de potassium car ce sont surtout des moisissures qui risquent de se développer sur la surface des matériaux à base de farine de maïs élaborés

Chapitre IV : Matériaux à base de mélanges de farine de maïs, de glycérol et de polybutylène succinate (PBS)

Dans le chapitre précédent, la caractérisation des matériaux à base de farine de maïs a montré qu'ils présentent une hygroscopicité élevée et des faibles propriétés mécaniques. Afin d'améliorer ces caractéristiques, le polybutylène succinate (polyester) a été ajouté à la farine de maïs plastifiée. Dans ce chapitre, l'impact du taux de PBS sur les propriétés physico-chimiques et la biodégradation des matériaux a été évalué. Les observations par microscopie électronique à balayage ont montré que la farine de maïs et le PBS sont incompatibles. Pour cela trois types de morphologies ont ainsi été observées :(i) de l'amidon dispersé dans une matrice de PBS, (ii) de l'amidon forme une phase co-continue avec le PBS et (iii) le PBS dispersé dans une matrice d'amidon. Cette incompatibilité est à l'origine des faibles propriétés mécaniques de ces mélanges. Cependant, une diminution significative de l'hygroscopicité après l'ajout du PBS à la farine de maïs a été observée. L'hydrolyse enzymatique de l'amidon de la farine de maïs par des enzymes amylolytiques en présence ou absence d'enzymes lipolytiques aptes à hydrolyser les liaisons ester du PBS ont permis de montrer que le PBS forme une barrière limitant l'accès des enzymes amylolytiques à l'amidon et ce d'autant plus que les matériaux présentaient un taux élevé de PBS dans les formulations mises en œuvre. Pour finir, les différents tests de biodégradabilité ont mis en évidence la faible biodégradation du PBS et des formulations contenant plus de 50% de PBS.

Introduction

L'hydrophilie, le vieillissement et les faibles propriétés mécaniques limitent l'utilisation des matériaux à base d'amidon dans le domaine de l'emballage. Pour pallier ce problème, il est nécessaire d'améliorer les propriétés physico-chimiques de l'amidon par modification chimique ou par de l'incorporation de charges ou de renforts (Liu *et al.*, 2009). Cependant, les stratégies envisagées doivent préserver le caractère intrinsèquement biodégradable de ces matériaux biosourcés. Le recours aux matériaux constitués de mélanges de polymères issus d'agroressources s'est fortement développé ces dernières années, avec un intérêt croissant pour les matériaux polyesters/amidon (Kim *et al.*, 2006). Cette étude s'est focalisée sur les mélanges farine de maïs/PolyButylène Succinate (PBS) pour son caractère semi-polaire et ses propriétés mécaniques intéressantes. L'ajout de PBS à la farine de maïs plastifiée a pour but de lui conférer des propriétés mécaniques améliorées (module de Young et contrainte à la rupture plus élevés) plus en adéquation avec les applications envisageables dans le secteur des matériaux en contact des aliments.

Les formulations retenues sont présentées dans le tableau 6 (Chapitre II.1). Le rapport farine de maïs/glycérol est choisi constant dans les proportions massiques 3/4-1/4. A ce pré-mélange ont été ajoutés 30, 50 et 70 % de PBS pour obtenir des mélanges dénommés PBS 30, PBS50 et PBS 70, la formulation PBS 100 constituant un témoin pur PBS (sans farine /glycérol préparée dans des conditions identiques). Les différents matériaux ont été élaborés par extrusion selon un profil de température compris entre 100 et 135°C, suivie d'une étape d'injection-moulage sous forme d'éprouvettes haltères standards (A₁).

L'objectif de ce travail sera donc étudier l'effet de différents taux de PBS (mélangés à de la farine de maïs et du glycérol) sur les propriétés physico-chimiques (hydrophilie, cristallinité, propriétés mécaniques et morphologie) et la cinétique de biodégradation de ces matériaux élaborés à partir des mélanges PBS-farine de maïs-glycérol afin de déterminer le taux de polyester nécessaire permettant de réduire l'hydrophilie de la farine de maïs tout en préservant le caractère biodégradable des matériaux obtenus.

Des essais d'hydrolyse enzymatique de ces matériaux par des enzymes amylolytiques et/ou lipolytiques (des lipases) ont été menés pour déterminer les cinétiques d'hydrolyse. Des tests de biodégradabilité aérobie (compostage et respirométrie) et anaérobie ont été également

mis en œuvre pour évaluer l'effet du pourcentage de PBS sur la biodégradation des matériaux composites.

En préalable, l'hydrophilie des matériaux a été évaluée en déterminant les isothermes de sorption d'eau à 25°C. Le degré de cristallinité a été déterminé par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). La morphologie des matériaux obtenus a également été observée en microscopie électronique à balayage. Pour ces différentes analyses, les matériaux ont été broyés et tamisés pour obtenir un substrat identique à ceux utilisés pour les hydrolyses. Ensuite, des mesures des propriétés mécaniques en traction ont été effectuées afin d'évaluer l'effet de l'ajout du PBS sur le module de Young, la contrainte à la rupture et l'allongement de ces matériaux.

I. Caractérisation physico-chimique des matériaux PBS-farine de maïs-glycérol

I.1. Isothermes de sorption de l'eau des matériaux

La figure 83 présente les isothermes de sorption d'eau à 25°C des matériaux à base de farine de maïs plastifiée et de PBS.

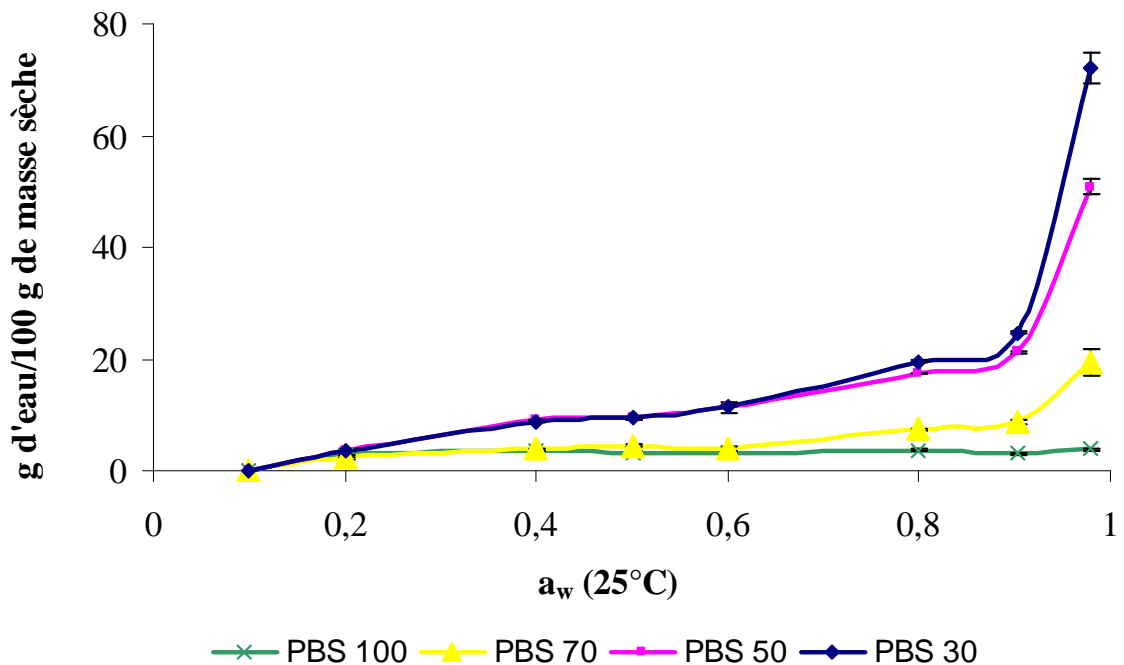


Figure 83 : Isotherme de sorption à 25°C des matériaux broyés et tamisés à 0,2 mm.

Les résultats obtenus montrent de façon attendue que le PBS seul absorbe peu d'eau quelle que soit l' a_w . En revanche, l'ajout de la farine de maïs (à 25% de glycérol) augmente

significativement la quantité d'eau sorbée. A une a_w de 0,98, le matériau à 30% de PBS sorbe jusqu'à $72 \pm 2,7$ contre $51 \pm 1,3$, $19 \pm 2,2$ et $4 \pm 0,1$ g d'eau/100g de matière sèche de matériau respectivement pour les matériaux à 50%, 70%, et 100% de PBS.

Ces résultats montrent que le PBS diminue significativement l'hydrophilie des matériaux à base de farine de maïs. Cependant, il est nécessaire d'ajouter un taux élevé de PBS dans la formulation pour réduire notablement le caractère hygroscopique des matériaux (figure 84). Par exemple, à partir d'une concentration critique seuil en PBS de 70%, les taux d'hydratation des matériaux sont quasi identiques à celui du PBS seul. D'autres travaux ont également montré que l'incorporation de polyester conduit à l'augmentation de l'hydrophobie de matériaux à base d'amidon thermoplastique (Avérous *et al.*, 2001).

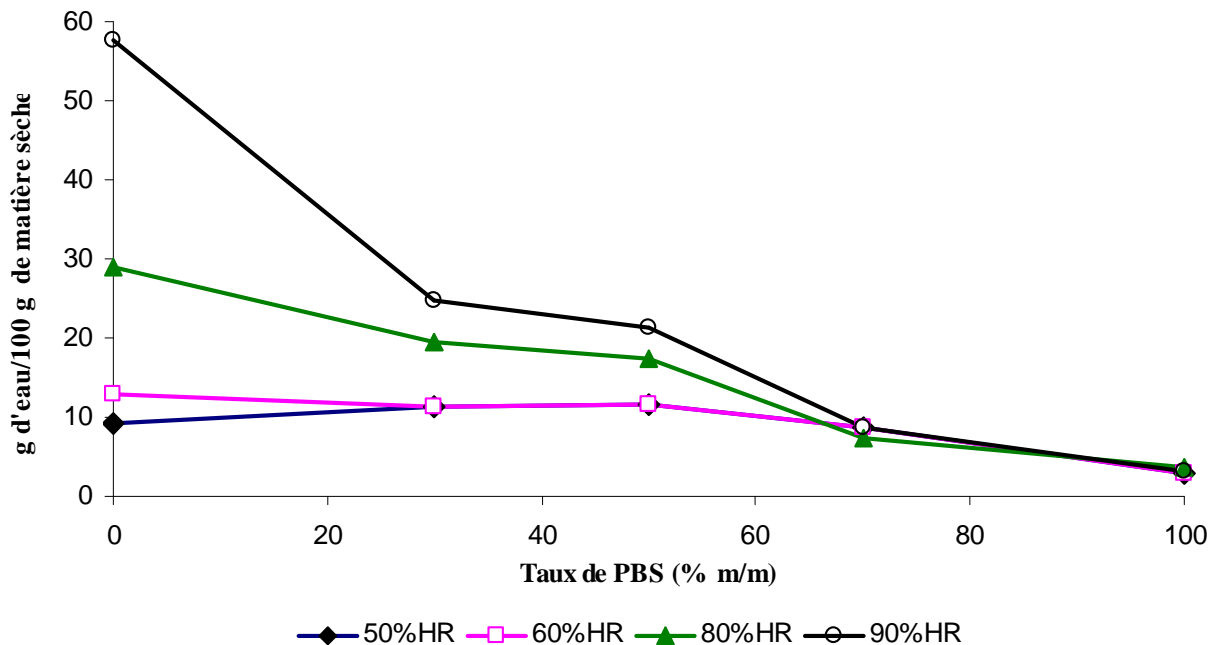


Figure 84 : Evolution du taux d'hydratation en fonction de la teneur en PBS à différentes humidités relatives (à 25°C).

I.2. Cristallinité des matériaux à base de farine de maïs, de glycérol et de PBS

Les thermogrammes de matériaux à base de farine de maïs et de PBS sont présentés dans la figure 85. Les enthalpies de fusion endothermiques mesurées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permettent de déterminer le taux de cristallinité pour chaque matériau (tableau 17).

Le pourcentage de cristallinité correspond au rapport entre l'enthalpie endothermique (ΔH) de fusion obtenu par DSC et le ΔH théorique (obtenu par le calcul selon la théorie des

contributions des groupes) du PBS 100% cristallin qui est de l'ordre de 110 J.g^{-1} (Nikolic *et al.*, 2003). D'après les résultats du [tableau 17](#), les pourcentages de cristallinité des matériaux augmentent évidemment avec l'introduction du PBS semi-cristallin. Cependant, les pourcentages de cristallinité relatifs aux pourcentages de PBS introduits et obtenus pour les mélanges (PBS 30, PBS 50 et PBS 70) ne sont pas constants. Ils sont nettement inférieurs aux valeurs théoriques. Pour le PBS 70, seuls 50% sont capables de cristalliser. Les pourcentages de cristallisation atteignent 35% et 19% respectivement pour le PBS 50 et le PBS 30. Cela montre que l'amidon empêche partiellement la recristallisation du PBS, et ceci d'autant plus qu'il est présent dans le mélange en faible taux. L'ajout de la farine de maïs au PBS conduit à une fusion et une cristallisation plus précoce se manifestant par une baisse de la température de fusion et l'augmentation de la température de cristallisation ([tableau 16](#)).

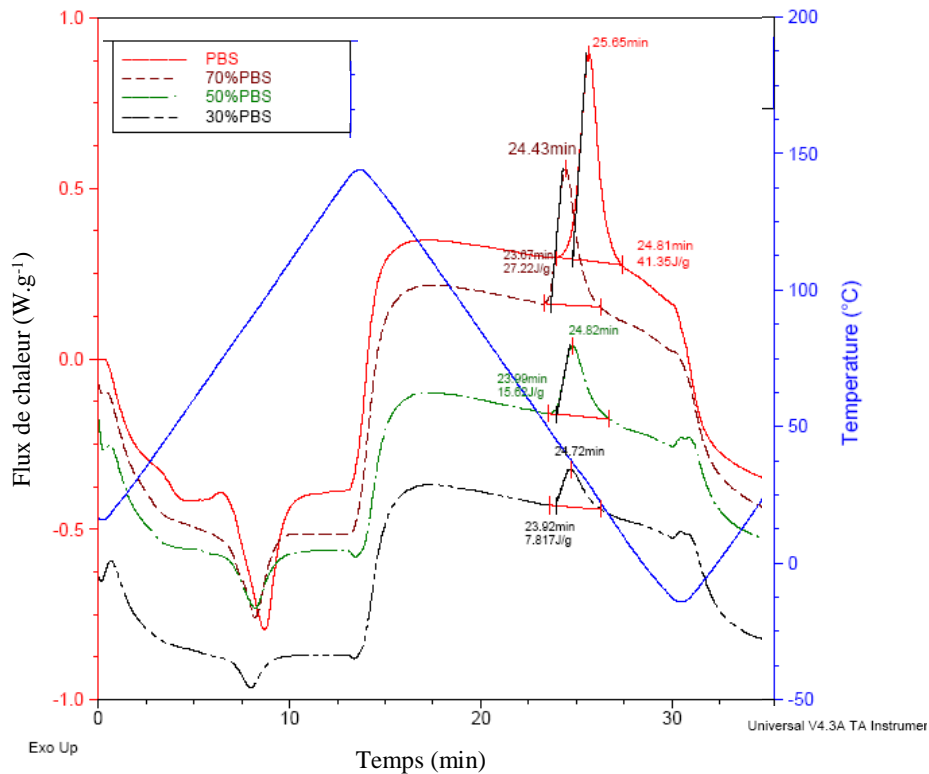


Figure 85 : Thermogrammes des matériaux à base de farine de maïs et de PBS obtenus par extrusion et injection.

Tableau 16 : Enthalpie de fusion et taux de cristallinité du PBS en fonction du taux de PBS incorporé dans le matériau.

	PBS 30	PBS 50	PBS 70	PBS 100
ΔH de fusion $J.g^{-1}$	7,91	14,64	20,80	41,00
Pourcentage de cristallinité du matériau (PBS + farine)	7,19	13,30	18,90	37,27
Pourcentage de cristallinité relatif au PBS seul	2,15	6,65	13,23	37,27
Température de fusion ($^{\circ}C$)	90,62	91,66	93,75	100
Température de recristallisation($^{\circ}C$)	37,00	31,25	35,00	25,00

D'une part, la diminution de la cristallinité du PBS liée à l'ajout de la farine de maïs et du glycérol va favoriser l'augmentation de la sorption d'eau par les mélanges sachant que les régions cristallines sont imperméables à l'eau par rapport aux régions amorphes. D'autre part, cet effet est important car il peut modifier la sensibilité de ces matériaux à l'hydrolyse enzymatique : les domaines cristallins du PBS sont moins accessibles à l'hydrolyse que les domaines amorphes et par conséquent la cinétique de biodégradation peut être influencée par cette morphologie différenciée du PBS au sein des différents mélanges.

1.3. Propriétés mécaniques

- *Le module de Young*

La figure 86 présente le module de Young (MPa) (en traction) en fonction de la quantité de PBS ajoutée à la farine de maïs plastifiée. L'analyse de ces résultats met en évidence une augmentation significative du module de Young après ajout du PBS. En revanche, à partir de 70% de PBS le module de Young reste stable et égal à celui du PBS pur.

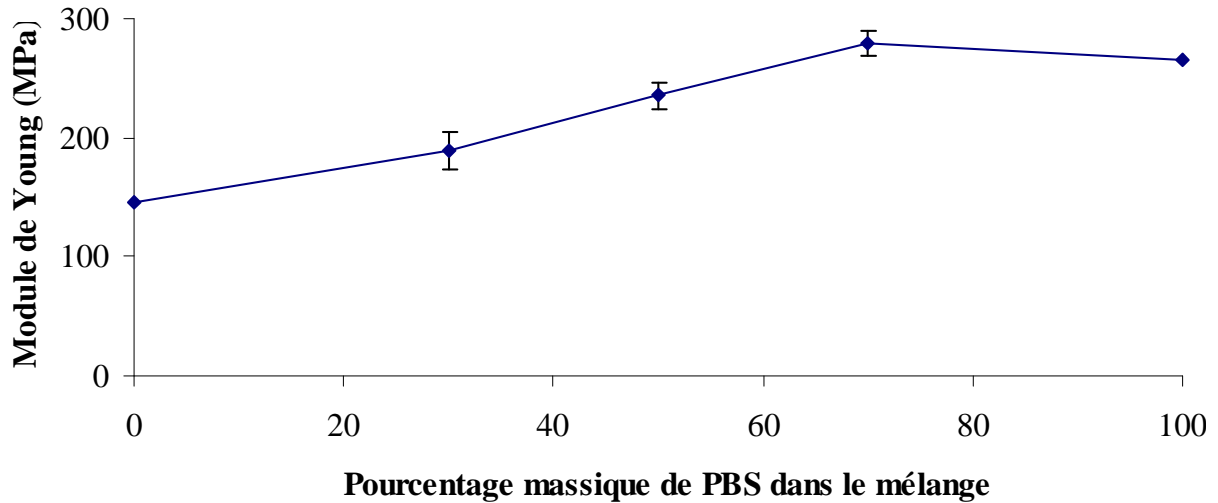


Figure 86 : Evolution du module de Young en fonction de la quantité de PBS ajoutée à la farine de maïs plastifiée.

Ces résultats sont en adéquation avec les travaux d'Avérous *et al.* (2001) qui ont montré que pour un amidon thermoplastique ayant des teneurs en glycérol comprises entre 18 et 35 %, l'ajout de PBSA (PolyButylène Succinate Adipate) conduit à une augmentation du module de Young. Cependant, d'autres études ont montré que pour des films à base d'amidon non plastifié, l'ajout de PBSA conduit à une diminution du module de Young (Ratto *et al.*, 1999).

- La contrainte à la rupture

La figure 87 montre l'évolution de la contrainte à la rupture en fonction de la quantité de PBS ajoutée au mélange farine/glycérol.

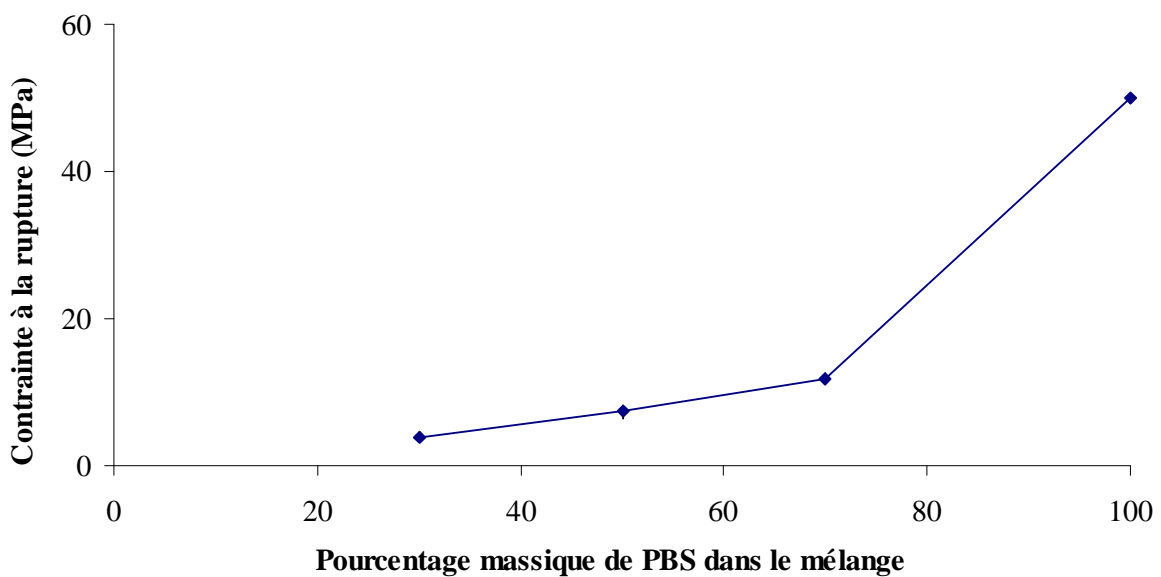


Figure 87 : Evolution de la contrainte à la rupture en fonction de la quantité de PBS ajoutée à la farine de maïs plastifiée.

Les résultats obtenus montrent que jusqu'à 70% de PBS ajouté, la contrainte à la rupture augmente très progressivement, améliorant les propriétés à rupture du matériau de manière notable (8%). Cependant, la contrainte à la rupture du PBS pur est beaucoup plus élevée témoignant d'un matériau pur et homogène, la farine de maïs le fragilise même si seuls 30% sont ajoutés (division par 4 de la contrainte à la rupture en passant du PBS pur au PBS 70).

Selon [Kim et al. \(2005\)](#), la diminution de la contrainte à la rupture en ajoutant le PBS à la farine de riz serait due à une faible adhérence entre la farine et PBS ce qui entraînerait la formation de microfissures au niveau des interfaces ou limiterait le transfert des contraintes mécaniques à l'interface. La même étude a montré que la diminution de la taille des particules de la farine conduit à une augmentation de la contrainte à la rupture. L'augmentation de la surface spécifique mène à une dispersion des particules dans la matrice de PBS et améliore l'adhésion entre les deux polymères ([Kim et al., 2005](#)). Cela met en évidence l'importance de la morphologie du mélange pour les propriétés mécaniques du matériau.

- L'allongement à la rupture

Le pourcentage d'allongement à la rupture des différents mélanges est présenté dans la [figure 88](#).

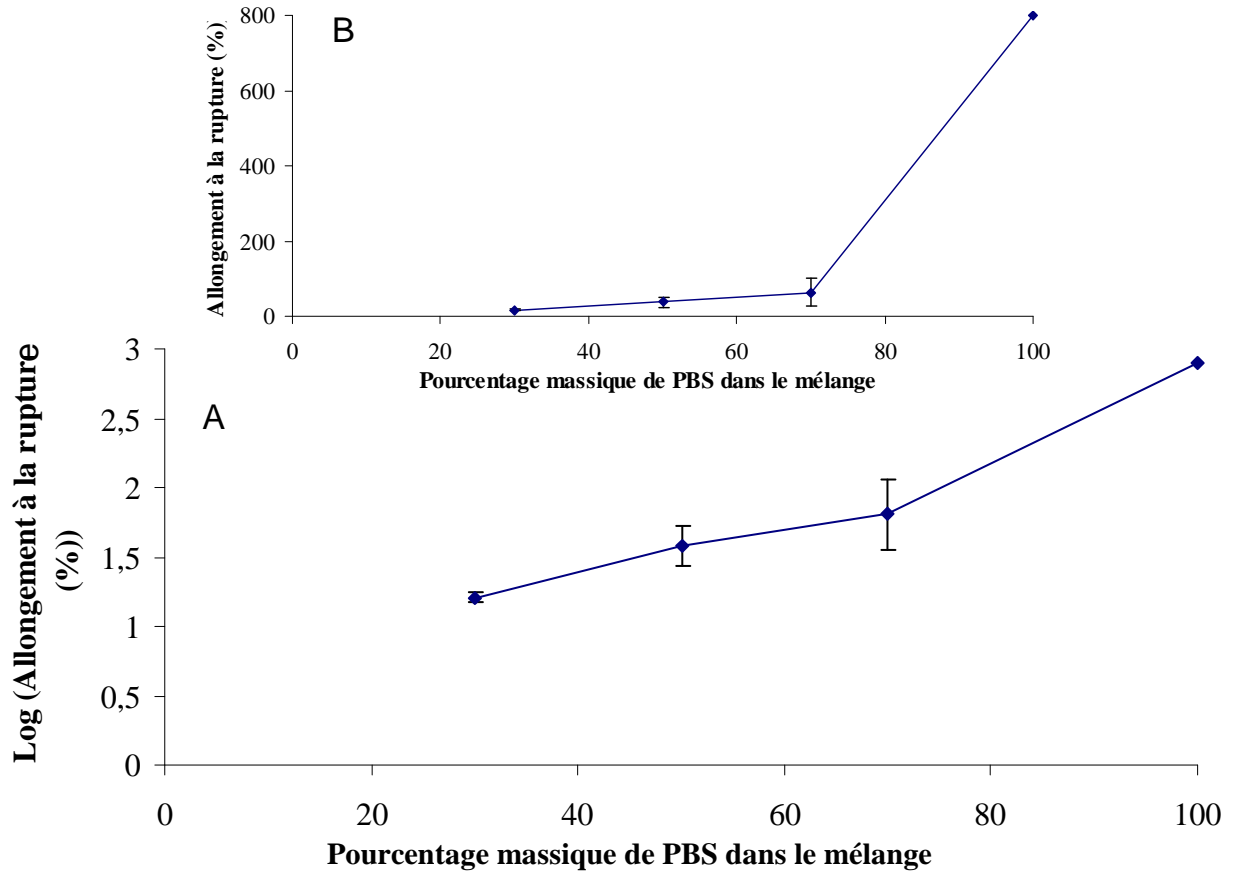


Figure 88 : Evolution du logarithme (Log) de l'allongement à la rupture en fonction de la quantité de PBS ajoutée à la farine de maïs plastifiée (A). B présente l'évolution de l'allongement à la rupture (%).

Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation de l'allongement avec l'augmentation de la quantité de PBS ajoutée. A 100% de PBS, une augmentation brusque de l'allongement est observée pour atteindre 800%.

Ces résultats sont en adéquation avec les travaux de [Ratto et al.\(1999\)](#) qui ont montré qu'à des teneurs faibles en PBS, les valeurs d'élongation des biocomposites à base d'amidon et de PBSA sont faibles par rapport à la valeur d'élongation du PBSA seul ([Liu et al., 2009](#)). En général, le comportement contrainte-déformation pour les biocomposites est non linéaire en raison de la déformation de la matrice du polymère-PBS ([Kim et al., 2005](#)). Dans le cas présent, la présence de farine de maïs rend les matériaux fragiles alors que le PBS est ductile. La présence de plus de 70% de PBS semble nécessaire pour que les mélanges PBS-farine de maïs donnent des matériaux ductiles.

I.4. Propriétés morphologiques des matériaux élaborés à partir de PBS, de farine de maïs et de glycérol

L'observation de la morphologie des différents matériaux a été réalisée par microscopie électronique à balayage. La figure 89 révèle une différence manifeste de structure entre les trois matériaux contenant 30 %, 50% et 70% de PBS. Pour le matériau à 30% de PBS, le PBS est dispersé dans la farine de maïs. Cette morphologie passe d'une phase de PBS dispersée dans une phase amylicée continue (PBS 30%) à une phase co-continue pour le matériau à 50% PBS. L'augmentation du taux de PBS à 70% dans le matériau entraîne une inversion de phase et donc une morphologie pour laquelle la farine de maïs est dispersée dans la matrice de PBS.

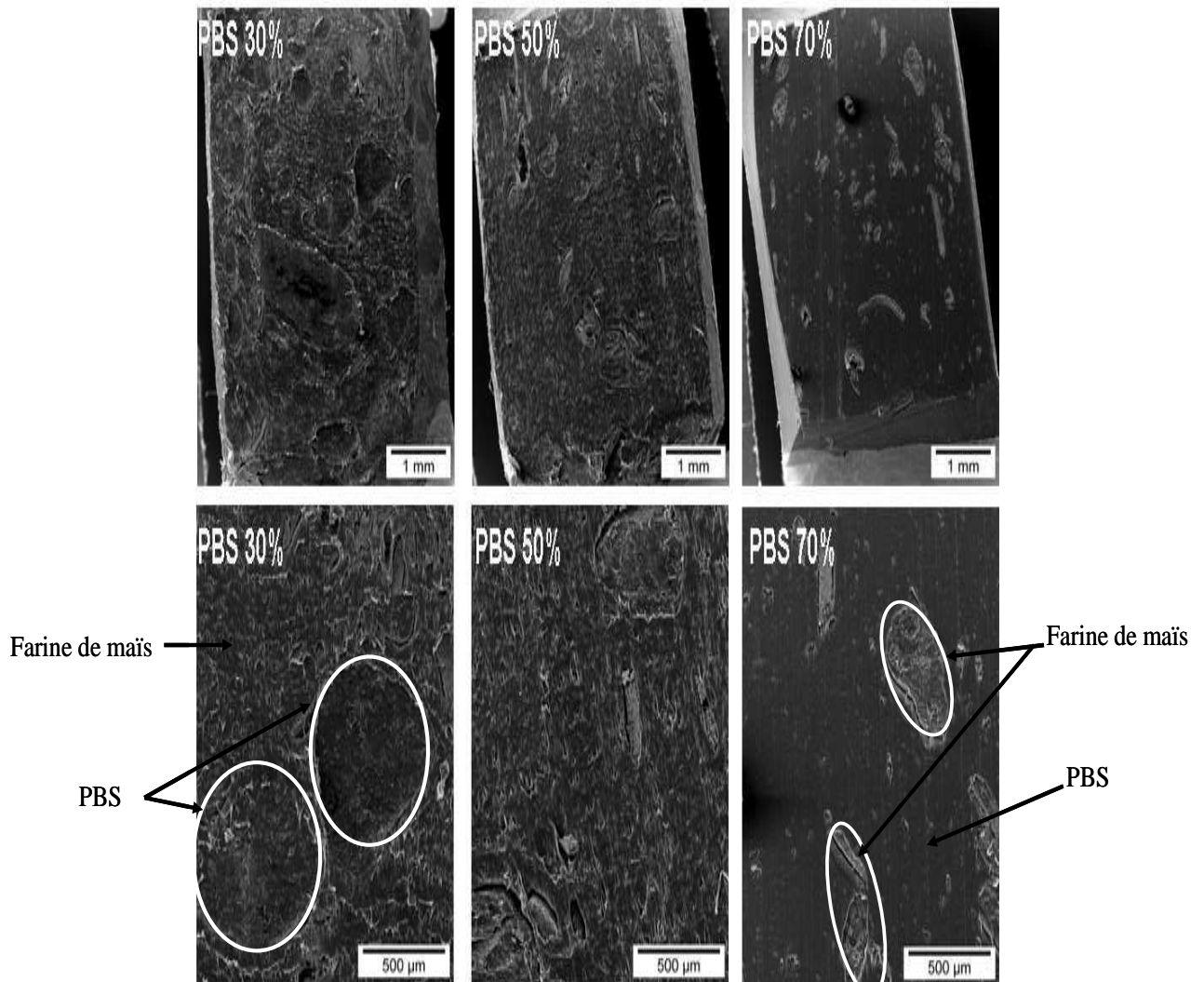


Figure 89 : Observations en microscopie électronique à balayage des matériaux composés d'un mélange de farine de maïs, de glycérol et de PBS en proportions variables.

Schwach *et al.* (2004) ont montré que les mélanges amidon de blé-PCL et amidon de blé-PBSA sont non compatibles et donnent aussi naissance à une morphologie où les polyesters (PCL ou PBSA) à faible teneur passent d'une phase dispersée dans une matrice d'amidon à une phase co-continue pour une teneur de PCL d'environ 40%. A des teneurs en polyester supérieures à 60 %, Shin *et al.*, (2004) ont montré que dans ce cas, la morphologie passe d'une phase où l'amidon est dispersé dans la matrice PCL à une phase co-continue.

Cette incompatibilité observée entre le PBS et la farine de maïs explique les faibles propriétés mécaniques obtenues pour ces mélanges. Pour pallier ce problème d'incompatibilité, il est suggéré d'utiliser un comptabilisant comme la carboxyméthylcellulose (CMC) qui peut transformer un mélange incompatible en un matériau compatible en réduisant la tension de surface et en créant des microstructures plus stables qui présentent une résistance mécanique améliorée (Mani *et al.*, 1998) .

II. Etude de l'effet du PolyButylène Succinate (PBS) sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'amidon de la farine de maïs par des enzymes amylolytiques

L'évaluation de l'influence de la présence de PBS sur l'accessibilité de l'amidon à l'hydrolyse a été effectuée en réalisant des hydrolyses par des enzymes amylolytiques (α -amylase et amyloglucosidase) seules ou associées à une lipase de *Pseudomonas cepacia* (Sigma, 62309) qui permet l'hydrolyse des liaisons esters du PBS. Les sucres réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse de l'amidon ont été dosés en utilisant une méthode colorimétrique (DNS) et les résultats sont présentés dans la figure 90. En revanche, cette méthode ne permet pas de doser les produits issus de la dégradation du PBS (l'acide succinique et le 1, 4- butanediol). Dans ce but, un suivi de la libération de l'acide succinique a été réalisé à l'aide d'une analyse par HPLC sur colonne Metacarb 87H à 35 °C.

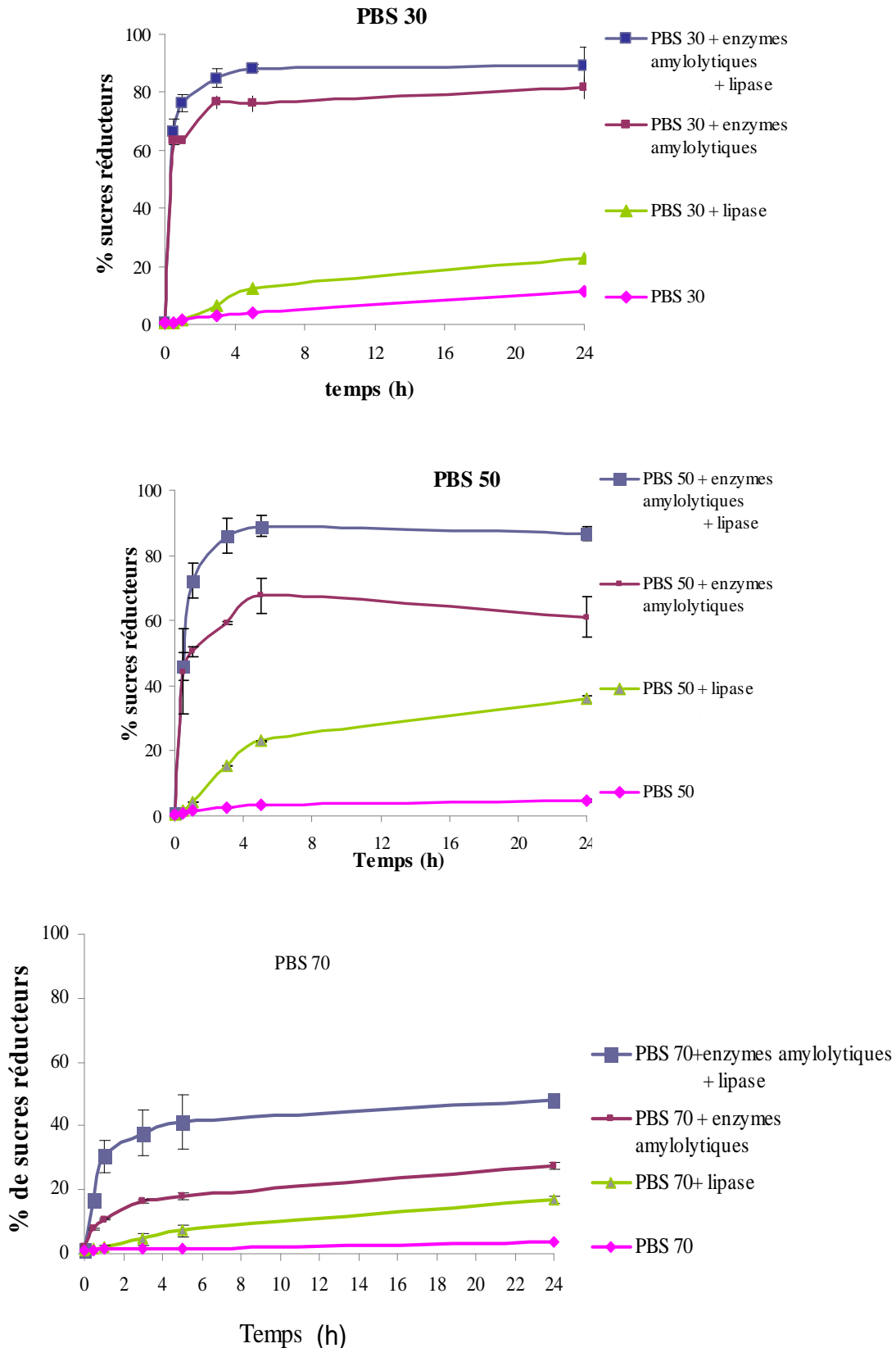


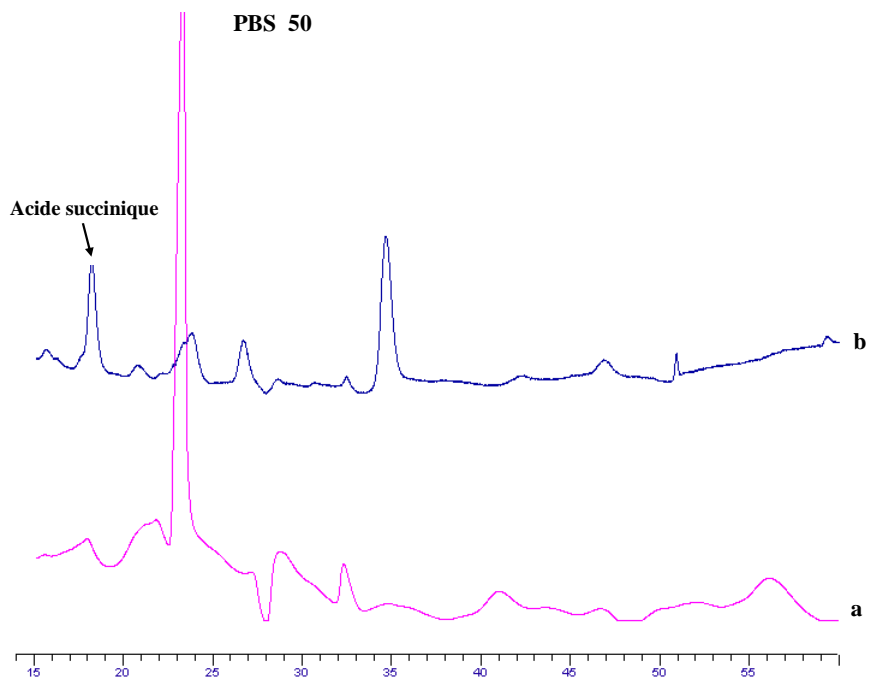
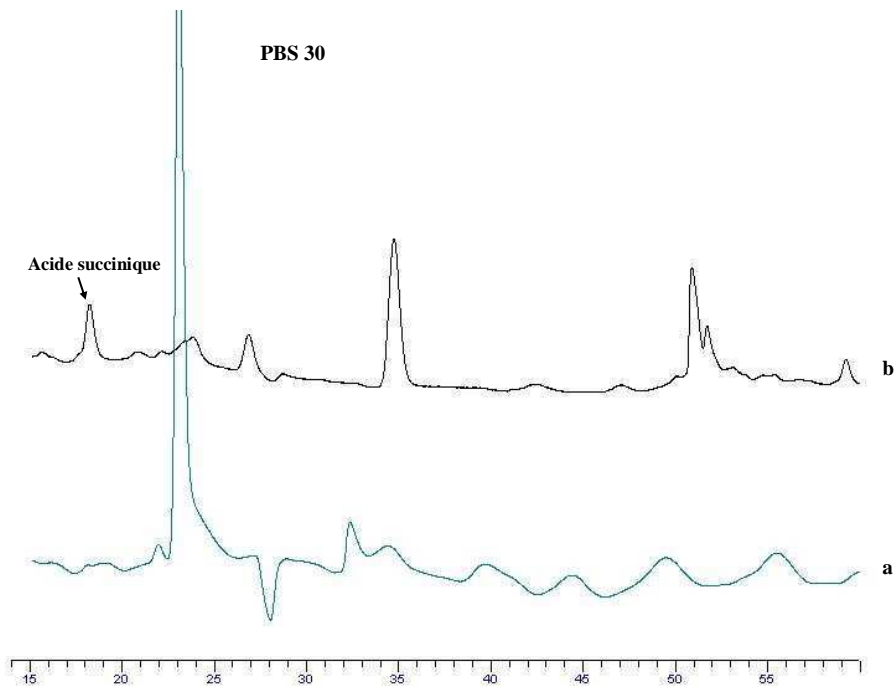
Figure 90 : Evolution des sucres réducteurs libérés pendant 24h au cours de l'hydrolyse enzymatique des matériaux à base de farine de maïs et de PBS (à 50°C, pH 5,5) par un cocktail d'enzymes amylolytiques (α -amylase et amyloglucosidase 50U.mL⁻¹ DSM Food Specialties, Seclin, France) et lipase de *Pseudomonas cepacia* (50U.mL⁻¹). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type (n= 3).

Les résultats présentés dans la [figure 90](#) montrent que l'hydrolyse enzymatique des matériaux à base de farine de maïs et de PBS par une lipase seule augmente la solubilisation des sucres solubles de l'amidon dans le milieu réactionnel et ce d'autant plus que le PBS est présent en forte proportion dans le matériau et donc plus susceptible de faire barrière à l'eau pour la solubilisation des composés hydrosolubles (en particulier des sucres réducteurs) de la farine de maïs. D'autre part, l'utilisation conjointe d'un cocktail d'enzymes amylolytiques et de lipase augmente significativement la libération de sucres réducteurs issus de l'hydrolyse de l'amidon ([figure 90](#)) par rapport à l'utilisation d'enzymes amylolytiques seules et cela de façon d'autant plus importante que le taux de PBS dans le matériau est élevé. Ce résultat est cohérent avec l'existence d'une matrice de PBS entourant l'amidon et limitant l'accès des enzymes amylolytiques à ce dernier. Cette situation est observée lorsque le PBS est présent à plus de 50% dans la formulation. Par exemple, l'analyse des résultats présentés dans le [tableau 17](#) révèle que le pourcentage d'hydrolyse de l'amidon dans la formulation à 70% de PBS reste faible (< 50%) malgré l'utilisation du cocktail lipase et enzymes amylolytiques. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'amidon, dans la formulation à 70% de PBS, est difficilement accessible aux enzymes amylolytiques, à cause du PBS qui forme une phase continue autour de l'amidon ([figure 90](#)).

Tableau 17 : Evolution du pourcentage de solubilisation des sucres réducteurs de l'amidon des matériaux à base de farine de maïs et de PBS au bout de 24h d'hydrolyse à 50°C selon la nature des enzymes utilisées. (moyenne +/- écart type (n=3)).

Matériau Enzymes	PBS 30	PBS 50	PBS 70
Témoin sans enzymes	11,3 ± 0,3%	4,6 ± 0,3%	3,5 ± 0,1%
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	22,8 ± 0,2%	35,8 ± 0,9%	16,9 ± 1,2%
Enzymes amylolytiques	81,5 ± 3,8%	61,0 ± 6,2%	27,6 ± 1,1%
Enzymes amylolytiques + lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	89,1 ± 6,2%	86,7 ± 2,1%	47,9 ± 0,8%

L'analyse des produits d'hydrolyse des différents matériaux (PBS 30, PBS 50 et PBS 70, PBS 100) par HPLC a mis en évidence l'apparition de l'acide succinique après 24h d'hydrolyse par la lipase (figure 91).



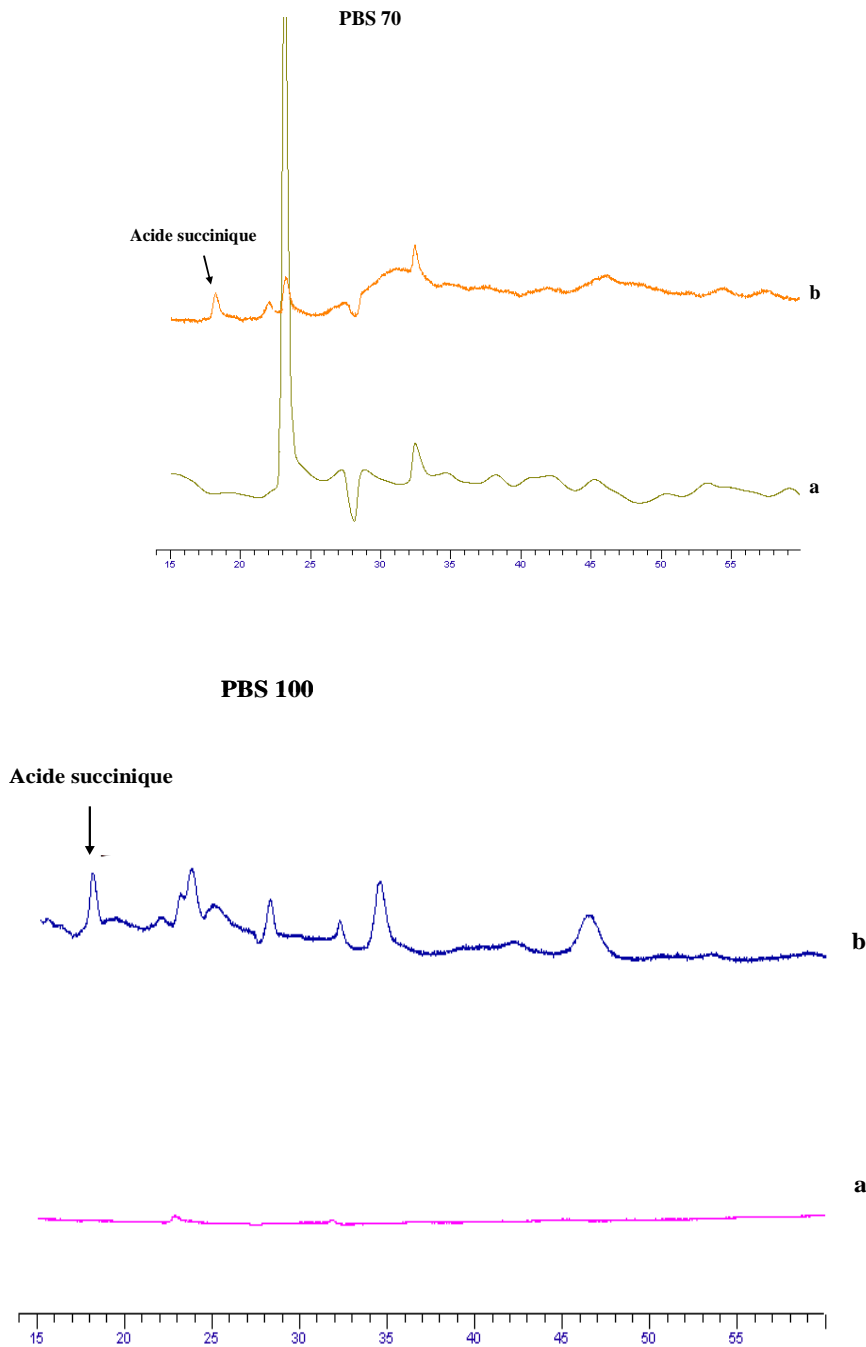


Figure 91 : Profils chromatographiques des produits d’hydrolyse des matériaux par la lipase au temps 0 h (a) et après 24 h (b). Les échantillons sont analysés par HPLC sur colonne Metacarb 87H à 35 °C avec 0,01N acide sulfurique/méthanol (9 :1 v:v) pour un débit de 0,45 mL.min⁻¹.

Ce résultat indique que la lipase hydrolyse bien les liaisons esters du PBS. Cela contribuerait à rendre l’amidon plus accessible aux enzymes amylolytiques. Cependant, la quantité d’acide succinique libéré est très faible pour le PBS100 et le PBS70. Cette faible capacité d’hydrolyse des liaisons esters par la lipase est probablement due au degré de

crystallinité de ces deux matériaux (PBS100 et le PBS70) qui est plus élevée par rapport au PBS 50 et au PBS 30. Il a été montré que le PBS subit une faible hydrolyse enzymatique par des lipases à cause de sa cristallinité et de l'orientation moléculaire de ses chaînes (Taniguchi *et al.*, 2002).

III. Evaluation de la biodégradabilité des matériaux composites à base de farine de maïs et de PBS

III.1. Par minéralisation dans le compost

Les résultats présentés dans la figure 92 montrent l'évolution du pourcentage de biodégradation des matériaux par minéralisation dans le compost après 33 jours d'incubation à 35°C. Pour le matériau à base de 100% PBS et celui à 70% de PBS, le pourcentage de biodégradation atteint $21 \pm 9\%$ et $33 \pm 6\%$ contre $58 \pm 3\%$ et $62 \pm 9\%$ respectivement pour les matériaux à 50 et 30 de PBS.

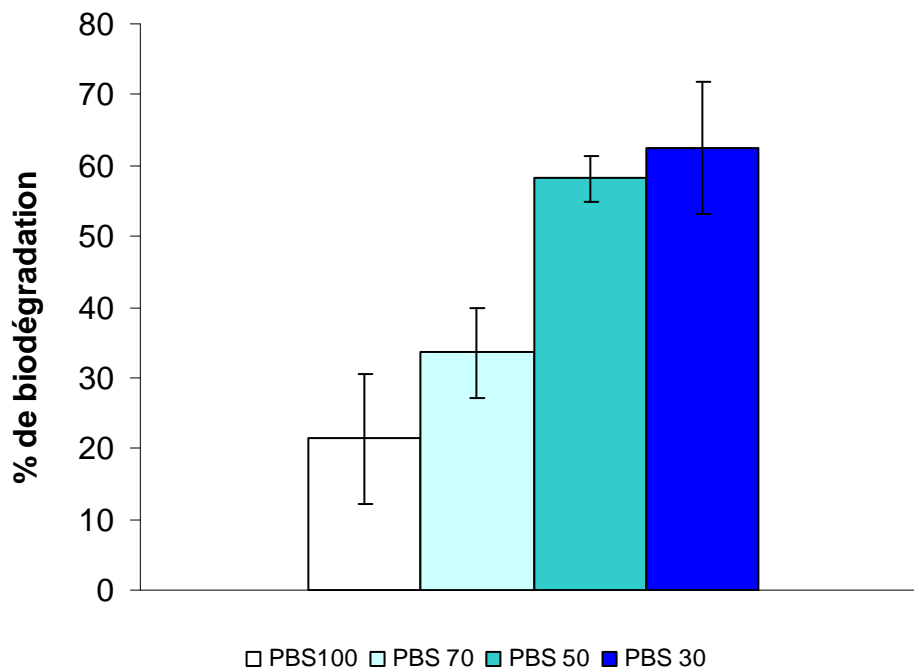


Figure 92 : Evolution du pourcentage de biodégradation des matériaux (broyés puis tamisés à 0,2 mm) à base de farine de maïs et de PBS à différents pourcentages compris entre 30 et 100 après 33 jours d'incubation à 35°C et 50% d'humidité relative dans du compost.

Ces résultats révèlent que les matériaux à faibles teneurs en PBS se dégradent mieux en compost que ceux à fortes teneurs. Il est utile de rappeler que «**Pour qu'un matériau d'emballage soit compostable par minéralisation, il faut atteindre 70% de biodégradation en moins de 45 jours selon la norme ISO 14855/1999**». Dans le cas présent, l'ajout d'un taux élevé (supérieur à 50%) de PBS ralentit et diminue le pourcentage

de la biodégradation dans le compost rendant ainsi le matériau non compostable selon la norme ISO 14855/1999. D'autres travaux ont montré qu'après 45 jours de minéralisation dans le compost à 58°C, le PBS atteint un faible pourcentage de biodégradation (15%) lié à sa cristallinité et son hydrophobicité (Han *et al.*, 2008). Dans la même étude, il a été observé que l'ajout de silice au PBS conduit à une augmentation de l'hydrophilie améliorant ainsi la susceptibilité des polymères à l'attaque microbienne.

III.2. Cinétique de biodégradation par respirométrie en milieu aérobie

La figure 93 présente l'évolution de la demande biologique en oxygène (DBO) pour les différents matériaux en fonction du temps. L'analyse de cette figure montre que le matériau à base de 30% de PBS présente la DBO la plus élevée. Les matériaux à base de 50 et 70% de PBS ne présentent pas de différences significatives en terme de demande biologique en oxygène.

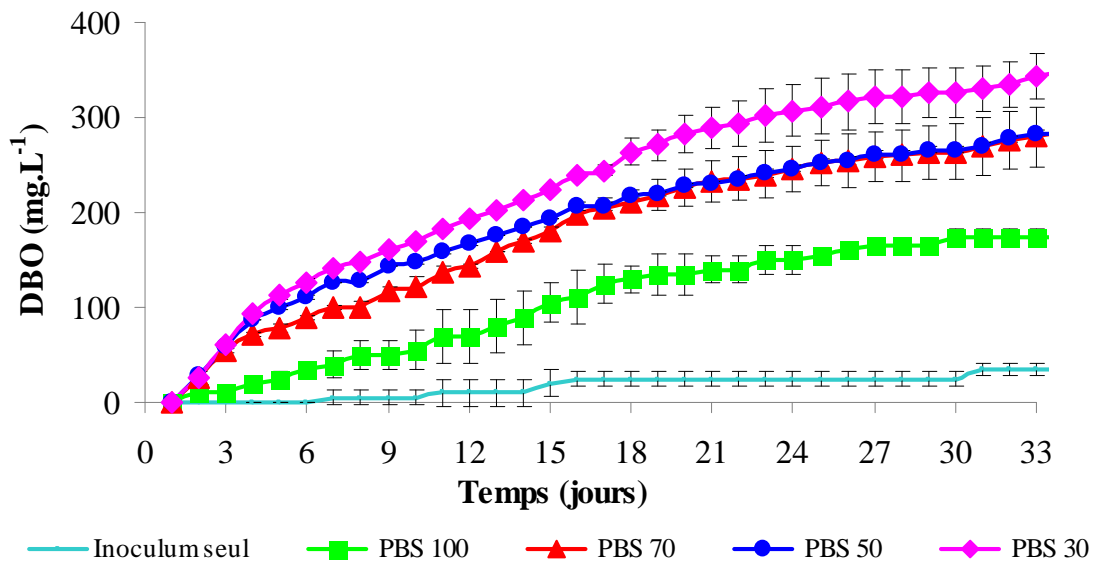


Figure 93 : Evolution de la DBO à 23°C entre 0 et 42 jours d'une suspension à 0,34 g.L⁻¹ des matériaux broyés et tamisés à 0,2 mm. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages de PBS dans les matériaux.

Tableau 18 : Pourcentage de biodégradation des matériaux après 33 jours d'incubation évalué par respirométrie.

Matériaux	Pourcentage de biodégradation après 33 jours d'incubation (%)
*PBS 0 (75% de farine, 10% de glycérol et 15% d'eau)	100 ±11
PBS 30	64 ± 6
PBS 50	47 ± 2
PBS 70	45 ± 5
PBS 100	25 ± 4

- *Essais effectués précédemment sur un matériau à base de 75% de farine de maïs, 15% d'eau et 10% glycérol (en utilisant 3 zones de cisaillement lors de l'extrusion).*

D'après le [tableau 18](#), le pourcentage de biodégradation des matériaux décroît de façon significative quand le taux de PBS augmente dans le matériau. Ces résultats révèlent que le PBS, peu biodégradable seul, entraîne une diminution de la biodégradabilité de la farine de maïs. Il faut signaler à ce niveau que contrairement au PBS, le PBSA présente un pourcentage de biodégradation nul après 30 jours d'incubation en milieu aérobie liquide ([He et al., 2000](#)).

III.3. Cinétique de biodégradation par voie anaérobie

L'évolution des volumes de biogaz produits au cours de biodégradation par voie anaérobie par les différents matériaux à base de farine de maïs et de PBS incubés en milieu liquide anaérobie à 35°C est présentée dans [la figure 94](#). L'analyse de cette [figure 94](#) montre une production finale (après 33 jours) respectivement de 53,5 (± 3,6), 119,1 (± 3,8), 254,6 (± 11,6) et 354,3 (± 0,8) mL.gMVS⁻¹ de biogaz pour le PBS pur, le PBS 70, le PBS 50 et le PBS 30.

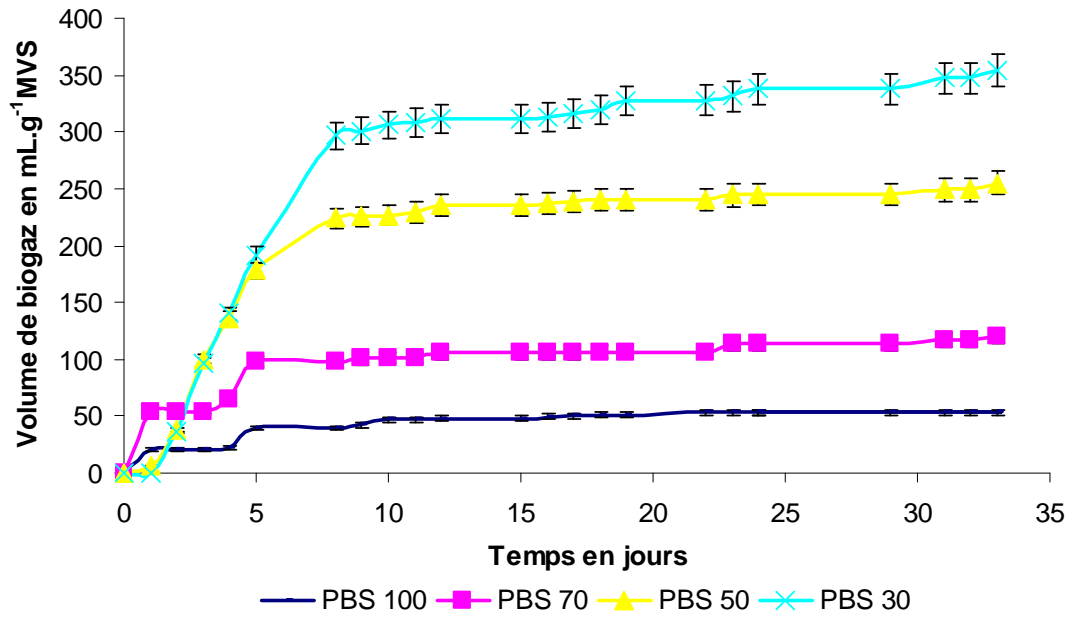


Figure 94 : Evolution du volume de biogaz produit durant l’incubation des matériaux à base de farine de maïs et de PBS à 35 °C en conditions anaérobies. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages de PBS dans les matériaux.

Ces résultats montrent que le taux de PBS influence significativement la quantité de biogaz produite. Pour des taux élevés en PBS, la production de biogaz liée à la dégradation du matériau par des microorganismes anaérobies est faible. L’analyse du biogaz produit par CPG (chromatographie à phase gazeuse) montre aussi une faible production de méthane pour les matériaux PBS 100 et PBS 70 (figure 95).

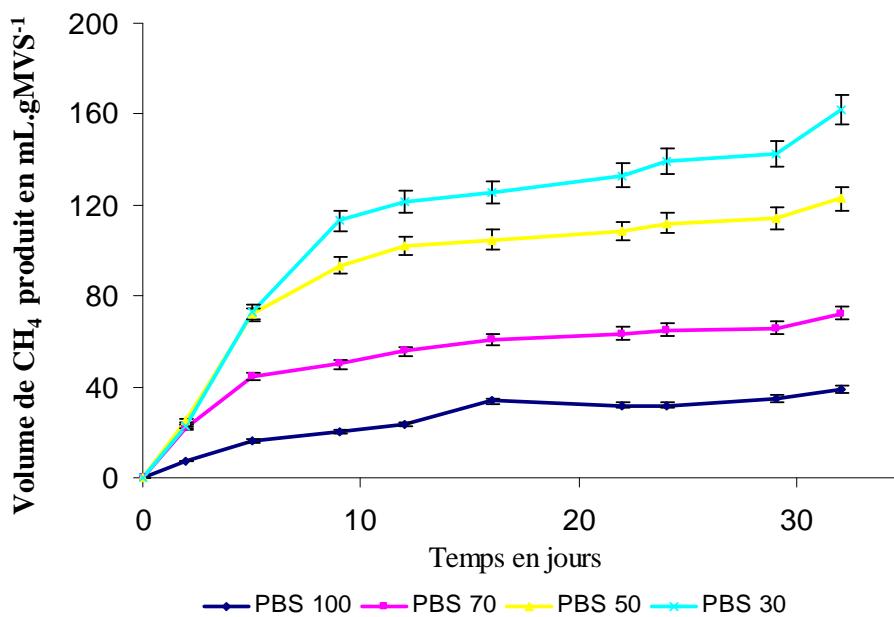


Figure 95 : Evolution du volume de méthane produit durant l’incubation des matériaux à base de farine de maïs et du PBS à 35 °C en conditions anaérobies. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages respectifs de PBS dans les matériaux.

La figure 96 présente les pourcentages de biodégradation des matériaux à base de farine de maïs et de PBS après 33 jours d'incubation à 35°C. Le pourcentage de biodégradation est le rapport entre le volume de CH₄ et la DCO théorique pour chaque matériau.

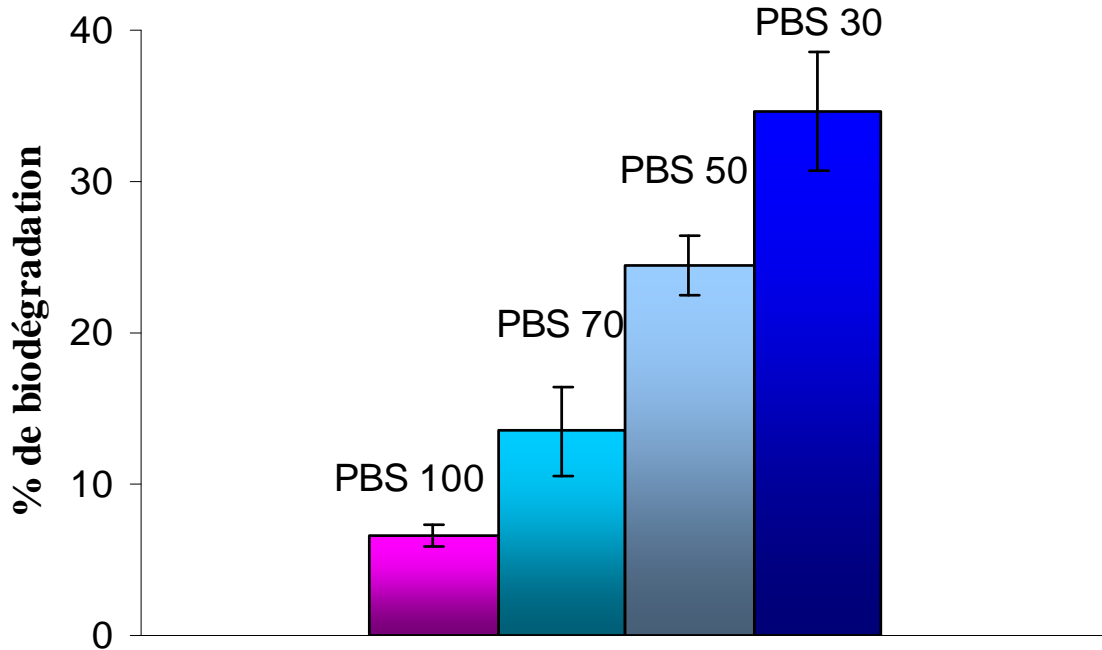


Figure 96 : Pourcentage de biodégradation des matériaux à base de farine de maïs plastifiée à 25% de glycérol mélangée à du PBS en pourcentages variables (de 30 à 100%) après 33 jours d'incubation à 35°C en milieu liquide anaérobie. 100, 70, 50 et 30 correspondent aux pourcentages de PBS dans les matériaux.

Pour le matériau à 100% PBS, le taux de dégradation atteint seulement $6,0 \pm 0,6\%$ au bout de 33 jours contre $34,2 \pm 1,5\%$ pour le matériau à 30% PBS. Pour les autres matériaux la tendance est la même puisque le taux de biodégradation augmente significativement lorsque le pourcentage de PBS dans le matériau diminue.

IV. Conclusions

Cette étude a permis de mettre en évidence que la formulation influence significativement les caractéristiques physico-chimiques et la biodégradation d'un matériau à base de farine de maïs et de PBS. L'augmentation du taux de PBS diminue l'hydrophilie et améliore significativement les propriétés mécaniques des matériaux. Les résultats de DSC ont montré que la farine de maïs empêche la recristallisation du PBS. D'autre part, les observations en MEB ont révélé une incompatibilité entre la farine de maïs et le polymère

PBS. Les interfaces entre les deux peuvent constituer des zones de fragilité ce qui nécessite d'envisager l'utilisation éventuelle d'un compatibilisant comme la carboxyméthylcellulose (CMC).

Les résultats des hydrolyses enzymatiques des différents matériaux farine de maïs-PBS ont montré que le PBS est bien sensible à l'hydrolyse par des lipases. Cependant, probablement en raison de sa cristallinité (37%), l'hydrolyse enzymatique du PBS reste limitée. L'analyse des produits d'hydrolyse par la lipase par HPLC a permis de confirmer que la lipase hydrolyse bien les liaisons ester du PBS en libérant l'acide succinique. Cependant la quantité libérée de ce dernier est variable selon la formulation. De plus, ils ont permis de montrer que selon le pourcentage de PBS utilisé, la sensibilité de l'amidon vis-à-vis de l'hydrolyse par des enzymes amylolytiques est variable. Pour les matériaux à 70% de PBS, l'hydrolyse par des enzymes amylolytiques est très faible par rapport aux matériaux à 30 et 50% PBS. L'utilisation d'un cocktail enzymatique composé d'enzymes amylolytiques et de lipase augmente plus significativement l'hydrolyse de l'amidon pour les matériaux à 30 et 50% de PBS que pour le matériau à 70% de PBS. Ces résultats suggèrent que le PBS forme une barrière contre l'attaque enzymatique de l'amidon du matériau PBS 70. Selon les observations en microscopie électronique à balayage, la morphologie de ce dernier montre que l'amidon se retrouve en phase dispersée dans le PBS ce qui le rend moins accessible aux enzymes. Alors que pour le PBS 30 et le PBS 50 l'amidon est bien accessible aux enzymes du fait que c'est le PBS qui est dispersé dans la matrice amidon (PBS 30) ou forme une phase co-continue avec l'amidon (PBS 50).

Pour le PBS 70 et le PBS 100, la lipase n'hydrolyse que peu de liaisons esters probablement à cause de la cristallinité plus élevée de ces deux matériaux. L'attaque enzymatique de l'amidon de la farine de maïs et des liaisons esters du PBS est influencée par la morphologie et le degré de cristallinité du PBS qui varient selon la formulation utilisée. Les tests d'hydrolyse enzymatique ont permis de comprendre comment le taux de PBS agit sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique. Ces données peuvent apporter des éléments d'explication des résultats de la biodégradation obtenus par les différentes méthodes employées.

Les différents tests de biodégradation utilisés dans cette étude ont montré que le pourcentage de biodégradation est influencé par la formulation. Une meilleure biodégradation est atteinte pour des matériaux à faible teneur en PBS. Les résultats obtenus ont révélé que le milieu de biodégradation affecte aussi le pourcentage de biodégradation. Selon [le tableau 19](#), quelle que soit la formulation, la biodégradation des matériaux est plus faible en milieu anaérobie qu'en milieu aérobie (liquide et compost).

Tableau 19 : Pourcentage de biodégradation atteint après 33 jours d'incubation en fonction de la méthode utilisée.

Formulation Milieu de biodégradation	PBS 100	PBS 70	PBS 50	PBS 30	*PBS 0
Aérobic liquide	30,5±1,2%	54,8±6,5%	58,4±0,8%	76,5±4,0%	100,6±11,3%
Aérobic solide (compost)	21,2±9,4%	33,4±6,0%	58,7±3,0%	62,3±9,0%	100,4 ±4,5%
Anaérobic liquide	6,4±0,6%	13,7±2,8%	24,2±4,8%	34,5±1,0%	99,5±5,2%

* Essais effectués précédemment sur un matériau à base de 75% de farine de maïs, 15% eau et 10% glycérol (en utilisant 3 zones de cisaillement lors de l'extrusion).

En conclusion, la biodégradation de ces matériaux composites dépend essentiellement de trois paramètres :

- La morphologie
- Le degré de cristallinité
- Le milieu de biodégradation

Si l'augmentation du pourcentage de PBS dans les matériaux composites diminue l'hydrophilie et améliore les propriétés mécaniques, cette augmentation limite la biodégradabilité des matériaux. Il est donc nécessaire à ce stade de trouver un bon compromis entre les caractéristiques physico-chimiques et la biodégradabilité de ces matériaux composites.

Discussions et Conclusions générales

L'intensification de l'usage des polymères d'origine pétrochimique pour la fabrication d'emballages plastiques a conduit à des problèmes de gestion de déchets. De plus, l'épuisement des ressources de pétrole engage à trouver d'autres voies alternatives pour remplacer les plastiques d'origine fossile. Une des perspectives est d'utiliser des polymères à base de ressources renouvelables. Dans ce contexte, des matériaux exclusivement à base d'agro-ressources ont été élaborés dans ce travail par extrusion de la farine de maïs en utilisant l'eau et le glycérol comme plastifiants. Dans la littérature, plusieurs travaux se sont intéressés à élaborer des matériaux à base d'amidon, et des matériaux à base d'amidon de maïs comme le Mater-bi® de Novamont, sont commercialisés. En revanche, l'utilisation directe de farines pour élaborer des biomatériaux à moindre coût a fait l'objet d'un nombre plus limité d'études (Kim *et al.*, 2005). Les farines de céréales étant composées très majoritairement d'amidon (à plus de 70% dans le cas de la farine de maïs) mais contenant également des protéines, de la cellulose et des matières grasses, l'impact de la présence de ces autres composants sur la structure et les propriétés d'usage des matériaux élaborés se devait d'être évalué.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse est synthétisé par [la figure 97](#) qui résume les différentes relations entre la nature de la matière première, le couple formulation/procédé et l'aptitude des matériaux élaborés à l'hydrolyse enzymatique et par conséquent à la biodégradation.

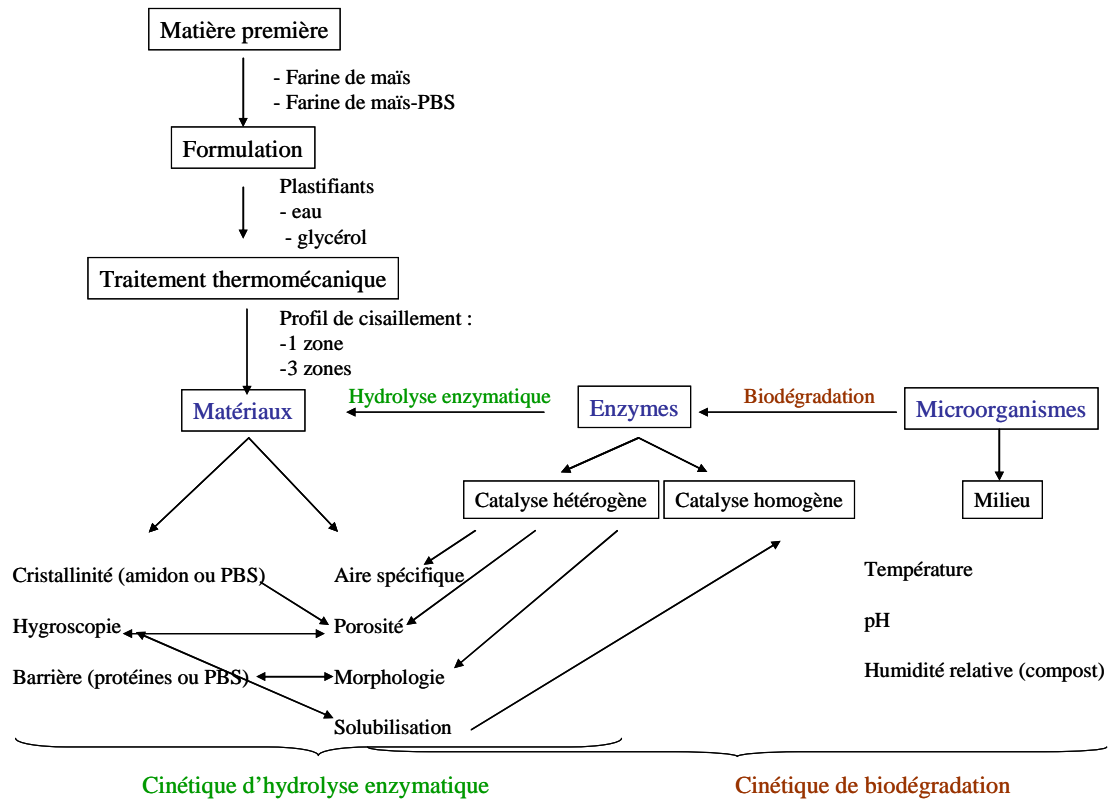


Figure 97 : Schéma explicatif des différents liens entre le matériau, son accessibilité à l'hydrolyse enzymatique et sa biodégradation.

1. Propriétés physico-chimiques des matériaux à base de farine de maïs

L'objectif de ce travail était de comprendre comment le couple formulation (taux de glycérol) /procédé (nombre de zones de cisaillements lors de l'extrusion) influence les caractéristiques physico-chimiques des matériaux à base de farine de maïs, de glycérol et d'eau. Les différents résultats obtenus ont pu montrer que la morphologie, la structure et les propriétés mécaniques sont directement liées à la teneur en glycérol et au profil de cisaillement (1 ou 3 zones de cisaillement) employé pour la déstructuration de la farine de maïs durant l'extrusion. Deux formulations à 5 et 10% de glycérol ont été étudiées.

La mesure de la porosité par adsorption d'azote a révélé que ces matériaux sont méso- et macro-poreux. De plus, les isothermes de sorption ont mis en évidence que l'utilisation de 10% au lieu de 5% de glycérol dans la formulation augmente leur caractère hygroscopique à forte activité de l'eau et accélère leur rétrogradation. La stabilité dans le temps et la durée de vie de ces matériaux est directement influencée par la rétrogradation de l'amidon accélérée par le stockage dans un milieu humide et à une température supérieure à la température de transition vitreuse (T_g) de l'amidon. Ce phénomène de vieillissement accéléré par un taux plus élevé de glycérol provoque une diminution de l'allongement à la rupture, une

augmentation de la contrainte à la rupture et du module de Young (Van Soest *et al.*, 1996). Les mesures des propriétés mécaniques des matériaux ont révélé que l'augmentation de la proportion de glycérol et du nombre de zones de cisaillement augmentent l'élasticité et la contrainte à la rupture. En revanche, l'augmentation des zones de cisaillement provoque une diminution de l'allongement à la rupture des matériaux probablement liée à une plus grande scission des chaînes d'amidon au cours du traitement thermomécanique.

▪ ***Influence du couple procédé/formulation sur l'état de l'amidon et des protéines***

L'étude de l'effet du glycérol et du cisaillement sur la déstructuration de la farine de maïs par analyse calorimétrique différentielle à balayage et diffraction aux rayons X a montré que l'utilisation d'un profil à 3 zones de cisaillement conduit à une déstructuration totale de l'amidon qui devient complètement amorphe. L'augmentation de 5 à 10% du taux de glycérol favorise également la déstructuration de l'amidon. Ces résultats ont été vérifiés par une analyse de la structure des matériaux à base de farine de maïs-glycérol-eau par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier. Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation du nombre de cisaillements provoque un changement très prononcé au niveau de la structure de l'amidon qui se manifeste par une augmentation de l'absorbance à 850 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} et 1155 cm^{-1} . Cette augmentation est probablement liée à la diminution du degré de polymérisation de l'amidon (Bellon-Maurel *et al.*, 1995). D'autres études ont montré qu'augmenter l'intensité de cisaillement appliqué lors de l'extrusion de l'amidon fait diminuer sa masse molaire et augmente son taux de gélatinisation (Willet *et al.*, 1997; Barron *et al.*, 2001).

A l'état natif de la farine de maïs, l'amidon est entouré d'une couche de protéines. Les observations en microscopie confocale à balayage laser ont révélé que l'augmentation de 1 à 3 zones de cisaillement (lors de l'extrusion) conduit à une dispersion et une agrégation très prononcées des protéines. De plus, la comparaison entre les matériaux obtenus en utilisant le même profil de cisaillement (1 zone de cisaillement) a montré qu'une plus importante dispersion et agrégation des protéines est obtenue pour une teneur plus élevée en glycérol (10%). Le résultat de ces observations microscopiques est cohérent avec une analyse de la farine de maïs native et des matériaux à base de farine de maïs-glycérol-eau par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier. L'analyse de la région située entre 1500 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} montre une différence entre le matériau à 10% de glycérol cisailé 3 fois, le matériau à 10% de glycérol cisailé 1 fois et la farine de maïs native au niveau des pics à 1540 cm^{-1} (liaisons N-H) et 1650 cm^{-1} (liaisons C=O) : le spectre de la farine de maïs native présente

une intensité supérieure aux deux autres. Les deux pics observés à 1540 cm^{-1} et 1650 cm^{-1} correspondent respectivement aux régions des amides II et amides I (Cremer *et al.*, 2003). Ces résultats indiquent probablement que suite à l'extrusion, les protéines de la farine de maïs ont subi une dénaturation ou une agrégation. Ce résultat est en adéquation avec les travaux de Fabien *et al.* (2000) qui ont montré que la dénaturation et l'agrégation des protéines peuvent se produire lors de l'extrusion. Une autre étude (Habeych *et al.*, 2008) a montré que l'utilisation d'un cisaillement fort conduit à une bonne dispersion et agrégation des protéines dans la matrice d'amidon ce qui diminue la fragilité du matériau causée par la non miscibilité de la zéine (protéine majoritaire de la farine de maïs).

L'élaboration des matériaux à base de farine de maïs a nécessité la modification de la structure initiale de la farine pour reformer une nouvelle structure. Suite à cette "déstructuration-restructuration" obtenue par des traitements thermomécaniques tels que l'extrusion-injection, les constituants de la farine de maïs que sont par exemple l'amidon et les protéines ont eu des changements dans leur état physique et/ou leurs associations ont été modifiées : (i) amorphisation de l'amidon et (ii) dispersion et agrégation des protéines. Ces changements sont très certainement à l'origine des modifications de la susceptibilité de l'amidon de la farine de maïs à l'hydrolyse par des enzymes amylolytiques. Wu *et al.* (2004) ont montré que l'amidon cristallin est moins sensible à l'action des enzymes amylolytiques que l'amidon amorphe.

2. Relation entre état de l'amidon et des protéines suite aux traitements thermomécaniques et sensibilité à l'hydrolyse enzymatique de l'amidon

▪ Etat de l'amidon et sensibilité aux enzymes amylolytiques

Les résultats de la solubilisation de la farine de maïs dans un tampon acétate (pH 5,5) à 50°C ont montré qu'à l'état natif, la farine de maïs contient peu de sucres réducteurs hydrosolubles. En revanche, dans les mêmes conditions, après extrusion la quantité de sucres réducteurs passe de 5 à 32% après 24h d'incubation. Comme il a été montré précédemment par les analyses des propriétés physico-chimiques, le traitement thermomécanique rend l'amidon amorphe conduisant à son gonflement et facilitant la pénétration de l'eau à l'intérieur et la solubilisation des sucres réducteurs. De plus, le stress mécanique peut provoquer la fragmentation de l'amidon en donnant naissance à des produits de petites tailles et solubles dans le tampon. Le suivi des cinétiques d'hydrolyse par des enzymes amylolytiques de l'amidon de broyats de matériaux à base de farine de maïs a montré que

celle-ci était plus rapide que dans la farine de maïs native de même granulométrie. Après les traitements thermomécaniques d'extrusion, la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon de la farine de maïs est ainsi multipliée par 8. [Timmins *et al.* \(1994\)](#) ont observé que l'hydrolyse enzymatique de l'amidon est 20 fois plus rapide lorsque celui-ci est amorphe que cristallin : ceci suggère que l'amorphisation de l'amidon de la farine de maïs suite aux traitements thermomécaniques d'extrusion est probablement responsable de cette accélération de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon.

- **Rôle barrière à l'hydrolyse enzymatique de l'amidon des protéines de la farine de maïs**

L'utilisation d'un cocktail composé d'enzymes amylolytiques et protéolytiques a conduit à une augmentation significative de la vitesse d'hydrolyse de l'amidon par les enzymes amylolytiques dans le cas de la farine de maïs native et des matériaux à base de 5% et 10% de glycérol obtenus en utilisant un profil avec 1 zone de cisaillement. En revanche, pour les matériaux obtenus en utilisant un profil avec 3 zones de cisaillement, l'ajout d'enzymes protéolytiques aux enzymes amylolytiques n'a eu aucun effet sur la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon. Cela est très probablement lié à la différence de structure de ces matériaux observée en microscopie confocale à balayage laser en présence de fuchsine acide pour marquer les protéines. Dans le cas de la farine de maïs native, la couche protéique intacte constituerait une véritable barrière vis à vis de l'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques. L'utilisation d'un profil à 1 seule zone de cisaillement pour le matériau à 5% de glycérol ne provoque qu'une dispersion et une agrégation partielle des protéines et ce serait donc pour cette raison que l'ajout des enzymes protéolytiques aux enzymes amylolytiques augmente encore alors significativement la vitesse d'hydrolyse de l'amidon de la farine de maïs. Au contraire, pour les matériaux où l'utilisation d'un profil d'extrusion à 3 zones cisaillement a conduit à une meilleure dispersion et agrégation des protéines et par conséquent à une meilleure accessibilité des enzymes amylolytiques à l'amidon, l'ajout des enzymes protéolytiques aux enzymes amylolytiques n'a alors plus aucun effet accélérateur.

En compléments de méthodes de caractérisation physique (analyse enthalpique différentielle et diffraction aux rayons X) et d'observations microscopiques des matériaux (microscopie confocale à balayage laser), les tests d'hydrolyse enzymatique de l'amidon par des enzymes amylolytiques seules ou en présence d'enzymes protéolytiques ont donc permis d'obtenir une vision plus précise de l'état physique de l'amidon (semi-cristallin ou amorphe) et de l'organisation du réseau protéique autour des grains d'amidon en fonction de la

formulation et du procédé d'élaboration des matériaux. En plus d'apporter des informations sur la structure des matériaux, les tests enzymatiques peuvent aussi constituer des tests rapides d'estimation de la biodégradabilité des matériaux à base de farine de maïs.

▪ **Influence de l'aire spécifique sur l'hydrolyse enzymatique de l'amidon**

En plus de l'état physique des constituants de la farine de maïs, la taille des matériaux est un facteur limitant l'accessibilité de l'amidon aux enzymes. Plusieurs études ont montré que le stress mécanique d'extrusion permet de réduire la taille des particules (Wu *et al.*, 2004), ce qui facilite l'érosion mécanique et augmente la disponibilité du substrat aux sites actifs des enzymes amylolytiques. Dans le même contexte, Helbert *et al.* (1996) ont démontré que l'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques se déroule selon un mécanisme d'érosion-diffusion. De plus, Al-Rabadi *et al.* (2009) ont mis en évidence une relation entre la taille des particules de l'orge et du sorgho et la cinétique d'hydrolyse de l'amidon qui est contrôlée par la diffusion de l'enzyme dans le réseau poreux à l'intérieur du grain.

Pour les matériaux à base de farine de maïs, l'augmentation de l'aire spécifique (réduction de la taille des particules) $0,74$ à 2 mm^{-1} multiplie la vitesse initiale d'hydrolyse de l'amidon par des enzymes amylolytiques par 62. Le passage d'une aire spécifique de 2 à 30 mm^{-1} (particules de 3 à 0,2 mm de diamètre) multiplie la vitesse initiale d'hydrolyse par 3. Au delà de 2 mm^{-1} , l'augmentation de l'aire spécifique n'accélère donc que peu la vitesse d'hydrolyse enzymatique. Les hydrolyses par les enzymes amylolytiques du matériau extrudé à différentes aires spécifiques ont révélé l'existence d'une relation exponentielle entre la vitesse initiale de libération de sucres réducteurs à partir de l'amidon et l'aire accessible minimale estimée en faisant l'hypothèse de particules parfaitement sphériques et de même diamètre que les tamis employés pour le tamisage des particules après leur broyage. Le coefficient de diffusion des enzymes amylolytiques dans l'eau est supérieur aux coefficients de diffusion apparent dans le matériau. Ceci reflète probablement le fait que les mouvements des enzymes amylolytiques dans le réseau meso et micro-poreux des particules de matériaux sont limités.

▪ **Biodégradation des matériaux à base de farine de maïs**

L'évaluation de la biodégradabilité par des méthodes microbiennes a révélé que la biodégradation des matériaux à base de farine de maïs suit les mêmes tendances que les résultats obtenus par les hydrolyses enzymatiques. Le traitement thermomécanique d'extrusion accélère la biodégradation de ces matériaux et cela quel que soit le milieu et le

mode (aérobie ou anaérobie) de biodégradation. Les observations en microscopie électronique à balayage environnementale de l'évolution des matériaux au cours du compostage ont révélé que la dégradation des matériaux est d'abord effectuée par des moisissures dont les enzymes dégradent d'abord les régions amorphes.

De plus, l'augmentation de 1 à 3 du nombre de zones de cisaillement lors de l'extrusion conduit à une augmentation significative du pourcentage de biodégradation en milieu liquide aérobie et anaérobie. En revanche, l'estimation de la biodégradation en milieu aérobie semi solide (compost) n'a révélé aucun effet du profil de cisaillement et du taux de glycérol sur le pourcentage de biodégradation. La limitation ne concernerait alors plus l'intérieur du matériau comme suggéré en milieu liquide, mais les limitations de transfert de matière seraient alors externes au matériau à dégrader. La disponibilité de l'amidon du matériau ne constituerait alors probablement plus un facteur limitant. Ceci semble cohérent avec le fait que les limitations de transfert de matière dans un milieu environnant semi-solide sont plus importantes qu'en milieu liquide pour une biodégradation par voie microbienne.

Comme par les tests enzymatiques, les méthodes de biodégradation par voie microbienne aérobie ou anaérobie ont montré que plus l'aire spécifique des matériaux à base de farine de maïs est grande, plus la biodégradation est accélérée. De plus, le temps nécessaire à la biodégradation des matériaux reste aussi conditionné par la méthode de dégradation employée.

Malgré ces essais d'amélioration des propriétés physico-chimiques en jouant sur le taux de glycérol et le profil de cisaillement, l'hygroscopie, l'évolution dans le temps (le vieillissement), les migrations non spécifiques, les faibles propriétés mécaniques et la biodégradation accélérée de ces matériaux à base de farine de maïs restent les principaux facteurs empêchant une éventuelle utilisation pour l'emballage de produits alimentaires.

Matériaux à base de farine de maïs de glycérol et de PBS

Une stratégie d'amélioration des propriétés mécaniques et barrière et de diminution du caractère hygroscopique a impliqué l'utilisation du polybutylène succinate (PBS) en mélange à la farine de maïs-glycérol. Trois pourcentages ont été testés 30, 50 et 70% de PBS. L'ajout du PBS à des taux supérieurs à 50% diminue drastiquement l'hydrophilie. En revanche, plus le taux de la farine de maïs est élevé dans le mélange, plus l'amidon empêche la recristallisation du PBS. A 70% de PBS, seuls 50% du PBS sont capables de recristalliser. Cependant, les pourcentages de recristallisation atteignent seulement 35% et 19% respectivement pour le PBS 50 et le PBS 30. L'ajout de la farine de maïs au PBS conduit à

une fusion et une cristallisation plus précoce se manifestant par une baisse de la température de fusion et l'augmentation de la température de cristallisation.

D'une part, la diminution de la cristallinité du PBS liée à l'ajout de la farine de maïs et du glycérol va favoriser l'augmentation de la sorption d'eau par les mélanges sachant que les régions cristallines sont imperméables à l'eau par rapport aux régions amorphes. D'autre part, cet effet est important car il peut modifier la sensibilité de ces matériaux à l'hydrolyse enzymatique : les domaines cristallins du PBS sont moins accessibles à l'hydrolyse que les domaines amorphes et par conséquent la cinétique de biodégradation peut être influencée par cette morphologie différenciée du PBS au sein des différents mélanges.

L'observation de la morphologie des différents matériaux (30, 50 et 70% de PBS) réalisée par microscopie électronique à balayage a révélé une différence manifeste de structure entre les trois matériaux. Cette morphologie passe d'une phase de PBS dispersée dans une phase amylicée continue pour 30% de PBS à une phase co-continue pour 50% de PBS. L'augmentation du taux de PBS à 70% dans le matériau entraîne une inversion de phase et donc une morphologie pour laquelle la farine de maïs est dispersée dans la matrice de PBS. Ces différentes morphologies obtenues montrent une incompatibilité entre la farine de maïs et le PBS qui nécessiterait probablement l'ajout d'un compatibilisant.

L'augmentation du taux de PBS dans le mélange conduit à une augmentation du module de Young, de la contrainte à la rupture et de l'allongement à la rupture. Néanmoins cette augmentation reste faible par rapport aux propriétés mécaniques obtenues dans le cas du PBS seul. Cela est lié aux interfaces (observées par microscopie électronique à balayage) résultant de l'incompatibilité entre la farine de maïs et le PBS qui fragilisent les propriétés mécaniques de ces mélanges.

L'hydrolyse enzymatique du PBS par une lipase de *Pseudomonas cepacia* a montré une faible sensibilité liée probablement à sa cristallinité qui est de l'ordre de 37%. Pour les mélanges farine de maïs-glycérol-PBS, l'augmentation du taux de PBS dans la formulation conduit à diminuer l'hydrolyse de l'amidon de la farine de maïs par des enzymes amylolytiques. Cependant, l'ajout de lipase aux enzymes amylolytiques augmente significativement le pourcentage d'hydrolyse de l'amidon sauf dans le cas du matériau à 70% de PBS. Cela montre que le PBS présente une barrière contre l'accessibilité des enzymes amylolytiques à l'amidon. Pour le matériau à 70% de PBS, la dispersion de la farine de maïs dans une matrice continue de PBS (observée par MEB) et la faible sensibilité du PBS à l'hydrolyse par la lipase (du fait de sa cristallinité) rend difficile l'accès des enzymes amylolytiques à l'amidon.

L'attaque enzymatique de l'amidon de la farine de maïs et des liaisons esters du PBS par la lipase est influencée par la morphologie et le degré de cristallinité du PBS qui varient selon la formulation utilisée. Les tests d'hydrolyse enzymatique ont permis de comprendre comment le taux de PBS agit sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique. Ces données peuvent également apporter des éléments d'explication des résultats de la biodégradation obtenus par les différentes méthodes employées.

Les différents tests de biodégradation utilisés (aérobies et anaérobies) dans cette étude ont montré que le pourcentage de biodégradation est influencé par le taux de glycérol dans le matériau. Une meilleure biodégradation est atteinte pour des matériaux à faible teneur en PBS. Les résultats obtenus ont révélé que le milieu de biodégradation affecte aussi le pourcentage de biodégradation. En milieu anaérobie, quelle que soit la formulation, la biodégradation des matériaux est plus faible qu'en milieu aérobie (liquide et compost).

Il ressort de ces différents résultats qu'il existe un lien entre les propriétés physico-chimiques et la susceptibilité de l'amidon à l'hydrolyse enzymatique. Deux modes d'hydrolyse enzymatique peuvent être considérés : (i) l'enzyme s'adsorbe ou diffuse dans le substrat insoluble (catalyse hétérogène) et (ii) le substrat (substrat soluble) s'adsorbe sur l'enzyme (catalyse homogène).

Dans le premier cas, la taille des pores du matériau est un facteur déterminant. Pour que l'enzyme puisse diffuser dans le matériau il faut que sa taille soit inférieure à celle des pores de matériau. Dans le cas contraire, l'enzyme doit commencer une érosion de la surface. Plus l'aire spécifique du matériau est grande plus le phénomène d'érosion/diffusion est rapide. D'autres facteurs peuvent constituer un obstacle à l'accès de l'enzyme à l'amidon : la morphologie des matériaux qui dépend essentiellement de leur composition (hétérogène) et du traitement thermomécanique qu'ils ont subi : (i) phase co-continue, l'enzyme accède plus facilement à son substrat, (ii) le substrat est dispersé dans une autre matrice continue et l'accès de l'enzyme à son substrat est difficile. De plus, les enzymes hydrolysent difficilement les substrats cristallins. Ainsi, le traitement thermomécanique facilite l'hydrolyse enzymatique en provoquant une amorphisation du substrat et/ou par fragmentation du substrat en le rendant soluble.

Pour la biodégradation par des microorganismes, d'autres facteurs entrent en jeu : température, pH du milieu et humidité relative (dans le cas d'un milieu solide) qui conditionnent la croissance des microorganismes et par conséquent leurs synthèses d'enzymes à l'origine de l'hydrolyse des biomatériaux.

Plusieurs perspectives peuvent être déduites de ces travaux :

A court terme, plusieurs études pourraient être réalisées afin de compléter ce travail : (i) l'évaluation par filtration sur gel de la fragmentation de l'amidon suite aux différents traitements thermomécaniques appliqués pourrait valider l'hypothèse que la solubilisation de l'amidon après extrusion est due en partie à la fragmentation de l'amidon, (ii) la mise en place d'un plan d'expériences pour étudier de façon plus systématique l'influence de l'aire spécifique des matériaux et employer des tamis plus fins permettant d'obtenir des diamètres de particule inférieurs à 0,2 mm, (iii) la mise en place d'un plan d'expériences pour évaluer les corrélations entre les cinétiques d'hydrolyse enzymatique et de biodégradations microbiennes, (iv) l'identification des facteurs limitant la biodégradation dans le milieu environnant. Pour les matériaux à base de PBS et de farine de maïs, l'ajout d'un compatibilisant pourrait contribuer à l'amélioration des propriétés mécaniques des matériaux à base de farine de maïs et de PBS. Il serait également intéressant d'évaluer s'il existe un compromis acceptable entre la biodégradabilité des matériaux et l'ajout du PBS à la farine de maïs pour en améliorer les propriétés mécaniques et diminuer l'hygroscopicité.

Références bibliographiques

- Aarnio, T., & Hämäläinen, A. (2008). Challenges in packaging waste management in the fast food industry. *Resources, Conservation and Recycling*, 52(4), 612-621.
- Agarwal, M., Koelling, K. W., & Chalmers, J. J. (1998). Characterization of the degradation of polylactic acid polymer in a solid substrate Environment. *Biotechnology Progress*, 14(3), 517-526.
- Ahn, B. D., Kim, S. H., Kim, Y. H., & Yang, J. S. (2001). Synthesis and characterization of the biodegradable copolymers from succinic acid and adipic acid with 1,4-butanediol. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(11), 2808-2826.
- Ahromrit, A., Ledward, D., & Niranjana, K. (2007). Kinetics of high pressure facilitated starch gelatinisation in Thai glutinous rice. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 834-841.
- Alberta Araújo, M., Cunha, A. M., & Mota, M. (2004). Enzymatic degradation of starch-based thermoplastic compounds used in protheses: identification of the degradation products in solution. *Biomaterials*, 25(13), 2687-2693.
- Al-Rabadi, G. J., Gilbert, R. G., & Gidley, M. J. (2009). Effect of particle size on kinetics of starch digestion in milled barley and sorghum grains by porcine alpha-amylase. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 198-204.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113-126.
- Aràmbula, G. V., Yàñez-Limon, M., González-Hernández, J., Martínez, J. L., Figueroa, J. D. C., Alvarado-Gil, J. J., Vargas, H., et al. (1998). Effects of starch gelatinisation on the thermal, dielectric and rheological properties of extruded corn masa. *Journal of Cereal Science*, 27(2), 147-155.
- Argos, A., Argos, A., Argos, M. D., & Larkinsf, B. A. (1982). A structural model for maize zein proteins. *The Journal OF Biological Chemistry*, 257 : 9984-9990.
- Atlas, R. M. (1988). *Principales of microbiology* (1994 éd.).
- Averous, L., Fauconnier, N., Moro, L., & Fringant, C. (2000). Blends of thermoplastic starch and polyesteramide: processing and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 76(7), 1117-1128.
- Avérous, L. (2004). Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review, *Polymer Reviews*, 44(3), 231-274.
- Avérous, L., & Fringant, C. (2001). Association between plasticized starch and polyesters: Processing and performances of injected biodegradable systems. *Polymer Engineering & Science*, 41(5), 727-734.
- Azevedo, H. S., Gama, F. M., & Reis, R. L. (2003). In vitro assessment of the enzymatic degradation of several starch based biomaterials. *Biomacromolecules*, 4(6), 1703-1712.
- Bailey, J., & Ollis, D. (1986). *Biochemical engineering fundamentals* (Mc. graw-hill international editions., Vol. 106). Singapore.
- Barlaz, M. A. (1996). Microbiology of solid waste landfills. chap. 2 In Microbiology of solid waste, Edited by Palmisano & Barlaz, Boca Raton : CRC Press, 223 p.

- Barrett, E. P., Joyner, L. G., & Halenda, P. P. (1951). The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, 73(1), 373-380.
- Barron, C., Bouchet, B., Della Valle, G., Gallant, D. J., & Planchot, V. (2001). Microscopical study of the destructuring of waxy maize and smooth pea starches by shear and heat at low hydration. *Journal of Cereal Science*, 33(3), 289-300.
- Bastioli, C. (1998). Properties and applications of Mater-Bi starch-based materials. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 263-272.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidak, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders WTM, Siegriest, H., Vavilin, V.A. (2002). Anaerobic Digestion Model N°1 (ADM1). International Water Association Scientific and Technical Report n°13, London, UK, IWA Publishing, 68 p.
- Bellon-Maurel, V., Calmon-Decriaud, A., Chandrasekhar, V., Hadjichristidis, N., Mays, J. W., Pispas, S., Pitsikalis, M., et al. (Éd.). (1998). *Blockcopolymers - Polyelectrolytes - Biodegradation* (Vol. 135). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bellon-Maurel, V., Vallat, C., & Goffinet, D. (1995). Quantitative Analysis of individual sugars during starch hydrolysis by FT-IR/ATR Spectrometry. Part I: multivariate calibration study repeatability and reproducibility. *Applied Spectroscopy*, 49(5), 556-562.
- Bello-Pérez, L. A., Colonna, P., Roger, P., & Paredes-López, O. (1998). Structural properties of starches dissolved by microwave heating. *Starch - Stärke*, 50(4), 137-141.
- Bertuzzi, M., Armada, M., & Gottifredi, J. (2007). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*, 82(1), 17-25.
- Blasel, H., Hoffman, P., & Shaver, R. (2006). Degree of starch access: An enzymatic method to determine starch degradation potential of corn grain and corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 128(1-2), 96-107.
- Boldwell, C., & Hopkins, D. (1985). *Nutritional characteristics of oilseed proteins*. (New protein Foods., Vol. 2). Orlando, FL: Academic Press.
- Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B., & Stangl, A. (1972). Automatische sequenzanalyse eines proteins (β -lactoglobulin AB). *physiologische Chemie*, 354 : 1563-1566.
- Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60(2), 309-319.
- Cagiao, M. E., Bayer, R. K., Rueda, D. R., & Baltá Calleja, F. J. (2003). An X-ray scattering study of water-conditioned injection-molded starch during isothermal heating. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(1), 17-21.
- Calmon-Decriaud, A., Bellon-Maurel, V., & Silvestre, F. (1998). Standard Methods for Testing the Aerobic Biodegradation of Polymeric Materials. Review and Perspectives. Dans *Blockcopolymers - Polyelectrolytes - Biodegradation, Advances in Polymer Science* (Vol. 135, p. 207-226).
- Carvalho, A. J. F., Zambon, M. D., Curvelo, A. A. S., & Gandini, A. (2003). Size exclusion chromatography characterization of thermoplastic starch composites 1. Influence of plasticizer and fibre content. *Polymer Degradation and Stability*, 79(1), 133-138.

- Chakroune, M., Bouakka, M., Hakko, A. (2005). Incidence de l'aération sur le traitement par compostage des sous-produits du palmier dattier contaminés par *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* = Incidence of the aeration on the treatment by composting of the by-products of the date palm contaminated by *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 5, p. 69-77.
- Chandra, R., & Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 23(7), 1273-1335.
- Chanvrier, H., Colonna, P., Della Valle, G., & Lourdin, D. (2005). Structure and mechanical behaviour of corn flour and starch-zein based materials in the glassy state. *Carbohydrate Polymers*, 59(1), 109-119.
- Chao-Chi Chuang, G., & Yeh, A. (2004). Effect of screw profile on residence time distribution and starch gelatinization of rice flour during single screw extrusion cooking. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 21-31.
- Chen, L., Zhang, Z., Zhuang, X., Chen, X., & Jing, X. (2010). Compatibilizing effect of starch-grafted-poly(L-lactide) on the poly(ϵ -caprolactone)/starch composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 117(5), 2724-2731.
- Chen, Y., Cao, X., Chang, P. R., & Huneault, M. A. (2008). Comparative study on the films of poly(vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly(vinyl alcohol)/native pea starch. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 8-17.
- Chynoweth & Pullammanappallil. (1996). Anaerobic digestion of municipal solid wastes, chap. 3. In *Microbiology of solid waste*, Edited by Palmisano & Barlaz, Boca Raton : CRC Press, 223p.
- Coma, V. (1992). Proposition d'une méthodologie pour l'estimation de la biodégradabilité de matériaux d'emballage. *Thèse de l'Université Champagne-Ardennes*.
- Coma, V., Couturier, Y., Pascat, B., Bureau, G., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1995). Estimation of the biofragmentability of packaging materials by an enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(6), 524-529.
- Copinet, A., Bliard, C., Onteniente, J. P., & Couturier, Y. (2001). Enzymatic degradation and deacetylation of native and acetylated starch-based extruded blends. *Polymer Degradation and Stability*, 71(2), 203-212.
- Cremer, D. R., & Kaletunç, G. (2003). Fourier transform infrared microspectroscopic study of the chemical microstructure of corn and oat flour-based extrudates. *Carbohydrate Polymers*, 52(1), 53-65.
- Defromt, C. (1985). L'intérêt du coton glandless dans l'industrie agro alimentaire. in "*Le Cotonier sans. Gossypol, une Nouvelle Ressource Alimentaire*" C.R. Colloque C.I.D.T, 112-134. Abidjan.
- Dias, A. B., Müller, C. M., Larotonda, F. D., & Laurindo, J. B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, 51(2), 213-219.
- Diosady, L. L., Paton, D., Rosen, N., Rubin, L. J., & Athanassoulis, C. (1985). Degradation of wheat starch in a single-screw extruder: mechano-kinetic breakdown of cooked starch. *Journal of Food Science*, 50(6), 1697-1699.

- Doi, Y., & Fukuda, K. (1994). Biodegradable plastics and polymers. *Elsevier, Amsterdam*.
- ECN. (2002). Determination of the ultimate aerobic biodegradability of packaging materials in an aqueous medium-Method by analysis of evolved carbon dioxide. *European Committee of Normalization, EN, Directive 94/62/EC*.
- Eldsäter, C., Karlsson, S., & Albertsson, A. (1999). Effect of abiotic factors on the degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in simulated and natural composting environments. *Polymer Degradation and Stability, 64*(2), 177-183.
- EL-Fadel, M., Findikakis, A. N., Leckie, J. O. (1996). Estimating and enhancing methane yield from municipal solid waste. *Hazardous Waste & Hazardous Materials, 13*(3), 309-331.
- Fannon, J. E., Hauber, R. J., & BeMiller, J. N. (1992). Surface Pores of Starch Granules. *Cereal Chemistry, 69*, 269-276.
- Farnum, C., Stanley, D., & Gray, J. (1976). Protein-lipid interactions in soy films. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 9* : 201-206.
- Follain, N., Joly, C., Dole, P., Roge, B., & Mathlouthi, M. (2006). Quaternary starch based blends: Influence of a fourth component addition to the starch/water/glycerol system. *Carbohydrate Polymers, 63*(3), 400-407.
- Fraser, R., McRae, T., & Rogers, G. (1972). *Keratins: Their composition, structure and biosynthesis*. Charles C.Thomas Publisher: Springfield, Il.
- Gàspàr, M., Benko, Z., Dogossy, G., Réczey, K., & Czigány, T. (2005). Reducing water absorption in compostable starch-based plastics. *Polymer Degradation and Stability, 90*(3), 563-569.
- Gattin, R., Poulet, C., Copinet, A., & Couturier, Y. (2000). Comparison of mineralization of starch in liquid, inert solid and compost media according to ASTM and CEN norms for the composting of packaging materials. *Biotechnology Letters, 22*(18), 1471-1475.
- Gaudin, S., Lourdin, D., Forssell, P. M., & Colonna, P. (2000). Antiplasticisation and oxygen permeability of starch-sorbitol films. *Carbohydrate Polymers, 43*(1), 33-37.
- Godbillot, L., Dole, P., Joly, C., Rogè, B., & Mathlouthi, M. (2006). Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chemistry, 96*(3), 380-386.
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science, 58*(1), 206-211.
- Gourdon, R. (2002). Aide à la détermination des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables, compostables. *RE.CO.R.D. Contrat N° 00-0118/1A*, 151.
- Gu, J., Eberiel, D. T., McCarthy, S. P., & Gross, R. A. (1993). Cellulose acetate biodegradability upon exposure to simulated aerobic composting and anaerobic bioreactor environments. *Journal of Polymers and the Environment, 1*(2), 143-153.
- Guilbert, S., & Biquet, B. (1986). Technology and application of edible protective films. In *"Food packaging and preservation"*. Elsevier. Londres.

- Habeych, E., Dekkers, B., van der Goot, A. J., & Boom, R. (2008). Starch-zein blends formed by shear flow. *Chemical Engineering Science*, 63(21), 5229-5238.
- Hakkarainen, M. (2002). Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products. *Advances in Polymer Science*, 157 : 113-138.
- Hall, D. M., & Sayre, J. G. (1971). A scanning electron-microscope study of starches. *Textile Research Journal*, 41(11), 880 -894.
- Han, D., & Yan, L. (2010). Preparation of all-cellulose composite by selective dissolving of cellulose surface in PEG/NaOH aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 614-619.
- Han, S., Lim, J. S., Kim, D. K., Kim, M. N., & Im, S. S. (2008). In situ polymerized poly(butylene succinate)/silica nanocomposites: Physical properties and biodegradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93(5), 889-895.
- Hao, Y., Min Ji, Chen, Y., Wu, W., Hao, Y., Zhang, S., & Liu, H. (2010). The pathway of in-situ ammonium removal from aerated municipal solid waste bioreactor: nitrification/denitrification or air stripping? *Waste Management & Research*, 28(12), 1057 - 1064.
- Hayashi, A., Kinoshita, K., Miyake, Y., & Cho, C. H. (1981). Conformation of amylose in solution. *Polymer Journal*, 13 : 537-541.
- He, Y., Asakawa, N., Masuda, T., Cao, A., Yoshie, N., & Inoue, Y. (2000). The miscibility and biodegradability of poly(3-hydroxybutyrate) blends with poly(butylene succinate-co-butylene adipate) and poly(butylene succinate-co-[var epsilon]-caprolactone). *European Polymer Journal*, 36(10), 2221-2229.
- Helbert, W., Schülein, M., & Henrissat, B. (1996). Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* [alpha]-amylase into corn starch granules. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19(3), 165-169.
- Hizukuri, S., Kozuma, T., Yoshida, H., Abe, J., Takahashi, K., Yamamoto, M., & Nakamura, N. (1996). Properties of *flavobacterium odoratum* KU isoamylase. *Starch - Starke*, 48(7-8), 295-300.
- Hoover, R., Hughes, T., Chung, H., & Liu, Q. (2010). Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review. *Food Research International*, 43(2), 399-413.
- Hoover, R., & Manuel, H. (1995). A comparative study of the physicochemical properties of starches from two lentil cultivars. *Food Chemistry*, 53(3), 275-284.
- Huber, K. C., & BeMiller, J. N. (1997). Visualization of Channels and cavities of corn and sorghum Starch Granules. *Cereal Chemistry*, 74(5), 537-541.
- Ikura, Y., & Kudo, T. (1999). Isolation of a microorganism capable of degrading poly-(L-lactide). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(5), 247-251.
- Iovino, R., Zullo, R., Rao, M., Cassar, L., & Gianfreda, L. (2008). Biodegradation of poly(lactic acid)/starch/coir biocomposites under controlled composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 93(1), 147-157.
- Jakubowicz, I. (2003). Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE). *Polymer Degradation and Stability*, 80(1), 39-43.
- Jarerat, A., & Tokiwa, Y. (2003). Poly(L-lactide) degradation by *Saccharothrix waywayandensis*. *Biotechnology letters*, 25(5), 401-4.

- Jayasekara, R., Sheridan, S., Loubakos, E., Beh, H., Christie, G. B.Y., Jenkins, M., Halley, P.B., McGlashan, S., Lonergan, G.T. (2003). Biodegradation and ecotoxicity of a bionolle and starch blend and its degradation products in compost. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 77-81.
- Jenkins, P. J., & Donald, A. M. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(6), 315-321.
- Johari, G. P. (2003). Calorimetric features of high-enthalpy amorphous solids and glass-softening temperature of water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(34), 9063-9070.
- Juszczak, L., Fortuna, T., & Wodnicka, K. (2002). Characteristics of cereal starch granules surface using nitrogen adsorption. *Journal of Food Engineering*, 54(2), 103-110.
- Kalichevsky, M. T., & Blanshard, J. M. V. (1993). The effect of fructose and water on the glass transition of amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 20(2), 107-113.
- Karim, A. A., Norziah, M. H., & Seow, C. C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chemistry*, 71(1), 9-36.
- Kim, H., Kim, H., Lee, J., & Choi, I. (2006). Biodegradability of bio-flour filled biodegradable poly(butylene succinate) bio-composites in natural and compost soil. *Polymer Degradation and Stability*, 91(5), 1117-1127.
- Kim, H., Yang, H., & Kim, H. (2005). Biodegradability and mechanical properties of agro-flour-filled polybutylene succinate biocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 97(4), 1513-1521.
- Kong, B., Kim, J., Kim, M., & Kim, J. C. (2003). Porcine pancreatic alpha-amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. *Biotechnology Progress*, 19(4), 1162-1166.
- Lai, H. M., & Padua, G. W. (1997). Properties and microstructure of plasticized zein films. *Cereal Chemistry*, 74, 771-775.
- Lending, C. R., & Larkins, B. A. (1989). Changes in the zein composition of protein bodies during extrusion maize endosperm development. *The Plant Cell*, 1, 1011-1023.
- Li, S. M., & , M. (1995). *Biodegradation of aliphatic polyesters* (In Degradable Polymers: Principles and Application. Chapman and Hall.). Scott G and Gilead D.
- Li, W., Corke, H., & Beta, T. (2007). Kinetics of hydrolysis and changes in amylose content during preparation of microcrystalline starch from high-amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers*, 69(2), 398-405.
- Liu, L., Yu, J., Cheng, L., & Yang, X. (2009). Biodegradability of poly(butylene succinate) (PBS) composite reinforced with jute fibre. *Polymer Degradation and Stability*, 94(1), 90-94.
- Lourdin, D., Coignard, L., Bizot, H., & Colonna, P. (1997). Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymer*, 38(21), 5401-5406.
- Lourdin, D., Ring, S. G., & Colonna, P. (1998). Study of plasticizer-oligomer and plasticizer-polymer interactions by dielectric analysis: maltose-glycerol and amylose-glycerol-water systems. *Carbohydrate Research*, 306(4), 551-558.
- Lourdin, D., Valle, G. D., & Colonna, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27(4), 261-270.

- Mani, R., Tang, J., & Bhattacharya, M. (1998). Synthesis and characterization of starch-graft-polycaprolactone as compatibilizer for starch/polycaprolactone blends. *Macromolecular Rapid Communications*, 19(6), 283-286.
- Massardier-Nageotte, V., Pestre, C., Cruard-Pradet, T., & Bayard, R. (2006). Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physico-chemical characterization. *Polymer Degradation and Stability*, 91(3), 620-627.
- Mata-ALVAREZ, J. (2003). Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. London : IWA publishing, 323 p.
- Mercier, C., & Feillet, P. (1975). Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. *Cereal Chemistry*, 52:283 - 297.
- Mezzanotte, V., Bertani, R., Innocenti, F. D., & Tosin, M. (2005). Influence of inocula on the results of biodegradation tests. *Polymer Degradation and Stability*, 87(1), 51-56.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mohee, R., & Unmar, G. (2007). Determining biodegradability of plastic materials under controlled and natural composting environments. *Waste Management*, 27(11), 1486-1493.
- Morgan, K. R., Furneaux, R. H., & Larsen, N. G. (1995). Solid-state NMR studies on the structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, 276(2), 387-399.
- Nakazawa, Y., & Wang, Y. (2003). Acid hydrolysis of native and annealed starches and branch-structure of their Naegeli dextrans. *Carbohydrate Research*, 338(24), 2871-2882.
- Nam, S., Scanlon, M.G., Han, J.H., & Izydorczyk, M.S. (2007). Extrusion of pea starch containing lysozyme and determination of antimicrobial activity. *Journal of Food Science*, 72(9),E477-E484.
- Nigam, P., & Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(9), 770-778.
- Nikolic, M. S., Poleti, D., & Djonlagic, J. (2003). Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene fumarate)s. *European Polymer Journal*, 39(11), 2183-2192.
- Odier, E., & Rouau, X. (1985). Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. *Hydrolases et Dépolymérisation*, Gauthier-Villars, 199-237. Paris.
- Pagga, U., Beimborn, D. B., Boelens, J., & De Wilde, B. (1995). Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in a laboratory controlled composting test. *Chemosphere*, 31(11-12), 4475-4487.
- Pavlostathis, S. G., & Giraldo-Gomez, E. (1991) Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Control*. 21, 411-490.
- Pelmont, J. (1993). Bactéries et environnement-Adaptation physiologiques. *Press Universitaire de Grenoble*, 899 p.
- Poutanen, K., & Forssell, P. M. (1996). Modification of starch properties with plasticizers. *Trends in Polymer Science*, 4, 128-132.

- Ratto, J. A., Stenhouse, P. J., Auerbach, M., Mitchell, J., & Farrell, R. (1999). Processing, performance and biodegradability of a thermoplastic aliphatic polyester/starch system. *Polymer*, 40(24), 6777-6788.
- Reinhart, D. R. (1996). Full-scale experiences with leachate recirculating landfills: case studies. *Waste Management & Research*, 14(4), 347-365.
- Rémond, D., Cabrera-Estrada, J. I., Champion, M., Chauveau, B., Coudure, R., & Poncet, C. (2004). Effect of corn particle size on site and extent of starch digestion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(5), 1389-1399.
- Reuschenbach, P., Pagga, U., & Strotmann, U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Research*, 37(7), 1571-1582.
- Rose, P. (1987). *Gelatin* (Vol. 7). New York: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering.
- Sandhu, K. S., Singh, N., & Kaur, M. (2004). Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal, morphological, and rheological properties of starches. *Journal of Food Engineering*, 64(1), 119-127.
- Sandhu, K. S., Singh, N., & Malhi, N. S. (2007). Some properties of corn grains and their flours I: Physicochemical, functional and chapati-making properties of flours. *Food Chemistry*, 101(3), 938-946.
- Satonojlovic-Davidovic, A. (2006). Matériaux biodéradables à base d'amidon expansé renforcé de fibres naturelles-Application à l'emballage alimentaire. *Thèse de l'Université du Sud Toulon-Var*.
- Schwach, E., & Avérous, L. (2004). Starch-based biodegradable blends: morphology and interface properties. *Polymer International*, 53(12), 2115-2124.
- Sen, A., Bhattacharya, M. (2000). Residual stress and density gradient in injection molded starch/synthetic polymer blends. *Polymer*, 41, 9177-9190.
- Seredych, M., Charmas, B., Jablonska-Pikus, T., & Gierak, A. (2003). Preparation of synthetic carbon adsorbents and investigation on porous structure of obtained adsorbents with [alpha]s method. *Materials Chemistry and Physics*, 82(1), 165-172.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265.
- Shin, B., Lee, S., Shin, Y., Balakrishnan, S., & Narayan, R. (2004). Rheological, mechanical and biodegradation studies on blends of thermoplastic starch and polycaprolactone. *Polymer Engineering & Science*, 44(8), 1429-1438.
- Shogren, R. L., Swanson, C. L., & Thompson, A. R. (1992). Extrudates of cornstarch with urea and glycols: structure/mechanical property relations. *Starch - Stärke*, 44(9), 335-338.
- Simon, I., Móra, S., & Elödi, P. (1974). Studies on the active center of pancreatic amylase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 4(3), 211-216.
- Singh, J., Singh, N., Sharma, T., & Saxena, S. (2003). Physicochemical, rheological and cookie making properties of corn and potato flours. *Food Chemistry*, 83(3), 387-393.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh Sodhi, N., & Singh Gill, B. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81(2), 219-231.

- Smits, A. L. M., Kruiskamp, P. H., van Soest, J. J. G., & Vliegenthart, J. F. G. (2003). The influence of various small plasticisers and malto-oligosaccharides on the retrogradation of (partly) gelatinised starch. *Carbohydrate Polymers*, 51(4), 417-424.
- van Soest, J. J. G., Hulleman, S. H. D., de Wit, D., & Vliegenthart, J. F. G. (1996). Changes in the mechanical properties of thermoplastic potato starch in relation with changes in B-type crystallinity. *Carbohydrate Polymers*, 29(3), 225-232.
- van Soest, J. J. G., Bezemer, R. C., de Wit, D., & Vliegenthart, J. F. G. (1996). Influence of glycerol on the melting of potato starch. *Industrial Crops and Products*, 5(1), 1-9.
- Vandersall AS, Cameron RG, Nairn CJ, Yelenosky G, Wodzinski RJ (1995). Identification, characterization, and partial purification of glucoamylase from *Aspergillus niger* (syn *A-ficcum*) NRRL-3135. *Preparative Biochemistry*, 25, 29-55.
- Varalakshmi KN, Kumudini BS, Nandini BN, Solomon J, Suhas R, Mahesh B, Kavitha AP (2009). Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Polish Journal of Microbiology*, 58, 29-36.
- Sosulski, F. W., & Imafidon, G. I. (1990). Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(6), 1351-1356.
- Spiridon, I., Popescu, M. C., Bodârlau, R., & Vasile, C. (2008). Enzymatic degradation of some nanocomposites of poly(vinyl alcohol) with starch. *Polymer Degradation and Stability*, 93(10), 1884-1890.
- Suortti, T., Gorenstein, M. V., & Roger, P. (1998). Determination of the molecular mass of amylose. *Journal of Chromatography A*, 828(1-2), 515-521.
- Szàraz, L., & Beczner, J. (2003). Optimization processes of a CO₂ measurement set-up for assessing biodegradability of polymers. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), 93-95.
- Taniguchi, I., Nakano, S., Nakamura, T., El-Salmawy, A., Miyamoto, M., & Kimura, Y. (2002). Mechanism of enzymatic hydrolysis of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-L-lactate) with a Lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Macromolecular Bioscience*, 2(9), 447-455.
- Teotia S, Lata R, Khare SH, Gupta MN (2001). One-step purification of glucoamylase by affinity precipitation with alginate. *Journal of Molecular Recognition*, 14, 295-299.
- Thiewes, H. J., & Steeneken, P. A. M. (1997). The glass transition and the sub-T_g endotherm of amorphous and native potato starch at low moisture content. *Carbohydrate Polymers*, 32(2), 123-130.
- Timmins, M. R. (1994). Enzymatic biodegradation of polymers. *Trends in Polymer Science*, 2: 15.
- Tokiwa, Y., & Calabria, B. P. (2004). Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters*, 26(15), 1181-1189.
- Tokiwa, Y., & Calabria, B. P. (2006). Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 244-251.
- Toledo AL., Severo Jr JB., Souza, RR., Campos, ES., Santana, JCC., Tambourgi, EB. (2007). Purification by expanded bed adsorption and characterization of α -amylases FORILASE NTL® from *A. niger*. *Journal of Chromatography B*, 846, 51-56.

- Tomka, I. (1991). Thermoplastic starch. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 302, 627-637.
- Vázquez-Rodríguez, G. A., Calmon, A., Silvestre, F., Goma, G., & Rols, J. (2006). Effect of the inoculation level in aerobic biodegradability tests of polymeric materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58(1), 44-47.
- Veis, A. (1964). *Macromolecular Chemistry of Gelatin*. New York: Academic Press.
- Verrier, P. (2005). Plastifiants. *Techniques de l'ingénieurs A 3231*, 11.
- Wang, H., Sun, D., Zeng, Q., & Lu, Y. (2000). Effect of pH, corn starch and phosphates on the pasting properties of rice flour. *Journal of Food Engineering*, 46(2), 133-138.
- Wang, W. J., Powell, A. D., & Oates, C. G. (1997). Effect of annealing on the hydrolysis of sago starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 33(2-3), 195-202.
- Wang, Y., & Padua, G. W. (2004). Water Sorption Properties of Extruded Zein Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3100-3105.
- Watson, S. A., & Ramstad, P. E. (1991). *Structure and composition* (Corn-chemistry and technology.). USA : AACC: Paul.
- Weng, Y., Wang, Y., Wang, X., & Wang, Y. (2010). Biodegradation behavior of PHBV films in a pilot-scale composting condition. *Polymer Testing*, 29(5), 579-587.
- Willemsse, R. C., Speijer, A., Langeraar, A. E., & Posthuma de Boer, A. (1999). Tensile moduli of co-continuous polymer blends. *Polymer*, 40(24), 6645-6650.
- Willett, J. L., Millard, M. M., & Jasberg, B. K. (1997). Extrusion of waxy maize starch: melt rheology and molecular weight degradation of amylopectin. *Polymer*, 38(24), 5983-5989.
- Włodarczyk-Stasiak, M., & Jamroz, J. (2009). Specific surface area and porosity of starch extrudates determined from nitrogen adsorption data. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 379-385.
- Wu, Y., Chen, Z., Li, X., & Li, M. (2009). Effect of tea polyphenols on the retrogradation of rice starch. *Food Research International*, 42(2), 221-225.
- Yagi, H., Ninomiya, F., Funabashi, M., & Kunioka, M. (2009). Anaerobic biodegradation tests of poly(lactic acid) under mesophilic and thermophilic conditions using a new evaluation system for methane fermentation in anaerobic sludge. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3824-3835.
- Yang, J., Yu, J., & Ma, X. (2006). Study on the properties of ethylenebisformamide and sorbitol plasticized corn starch (ESPTPS). *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 110-116.
- Yao, C., Li, X., Song, T., Li, Y., & Pu, Y. (2009). Biodegradable nanofibrous membrane of zein/silk fibroin by electrospinning. *Polymer International*, 58(4), 396-402.
- Yu, L., & Christie, G. (2005). Microstructure and mechanical properties of orientated thermoplastic starches. *Journal of Materials Science*, 40(1), 111-116.
- Yue, Y., & Angell, C. A. (2004). Clarifying the glass-transition behaviour of water by comparison with hyperquenched inorganic glasses. *Nature*, 427(6976), 717-720.
- Zhao, P., Liu, W., Wu, Q., & Ren, J. (2010). Preparation, Mechanical, and Thermal Properties of Biodegradable Polyesters/Poly(Lactic Acid) Blends. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 1-9.