



HAL
open science

Influence de traitements de réticulation sans solvant sur les propriétés de films à base de gélatine et chitosan encapsulant ou non des antioxydants naturels : caractérisations physico-chimiques et application

Nasreddine Benbettaieb

► To cite this version:

Nasreddine Benbettaieb. Influence de traitements de réticulation sans solvant sur les propriétés de films à base de gélatine et chitosan encapsulant ou non des antioxydants naturels : caractérisations physico-chimiques et application. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS045 . tel-01281733

HAL Id: tel-01281733

<https://theses.hal.science/tel-01281733>

Submitted on 2 Mar 2016

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.

UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE COMTE

UMR A 102-02 Procédés Alimentaires et Microbiologiques
Université de Bourgogne-AgroSup-Dijon



THÈSE en co-tutelle

Pour obtenir le grade de Docteur
de l'**université de Bourgogne**
et de la **Faculté des Sciences de Bizerte de**
l'université de Carthage
Discipline : Sciences de l'alimentation

BENBETTAIEB Nasreddine

le 11 juin 2015

**Influence de traitements de réticulation sans solvant
sur les propriétés de films à base de gélatine et chitosan
encapsulant ou non des antioxydants naturels :
caractérisations physico-chimiques et application**

Directeur de thèse

Mr. Frédéric Debeaufort

Co-directeur de thèse

Mme Salwa Bornaz

Jury

Pr Nathalie GONTARD	INRA-Montpellier	Rapporteur
Pr Moncef NASRI	Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax	Rapporteur
Pr Ahmed Hichem HAMZAOUI	Institut National de Recherche Scientifique et Technique-Tunisie	Examineur
Pr Pascal DEGRAEVE	Université de Lyon I	Président
Dr. Salwa BORNAZ	Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis	Co-Directrice de thèse
Dr Thomas KARBOWIAK	AgroSup-Dijon	Co-encadrant de thèse
Pr Frédéric DEBEAUFORT	Université de Bourgogne	Directeur de thèse

Résumé

Ce travail de thèse a pour objectif de formuler un emballage comestible à base d'un mélange de chitosan et de gélatine (bœuf ou poisson), de mieux comprendre l'influence d'irradiations par faisceaux d'électrons et de l'incorporation d'antioxydants naturels sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des films. Une étude de l'effet de l'irradiation sur la cinétique de libération des antioxydants dans un milieu liquide simple a été étudiée pour validation.

Une **étude préliminaire** a montré d'abord que la densification de la solution filmogène puis du gel pendant le séchage ne dépend ni de l'épaisseur, ni de la concentration, ni du temps et laisse supposer une diffusion Fickienne de l'eau dans la matrice. La perméabilité à la vapeur d'eau augmente linéairement avec l'épaisseur de films et d'autant plus lorsque l'étendue du différentiel d'humidités relatives est élevé. Ce phénomène est attribué à un mécanisme de gonflement et de plastification du réseau de gélatine-chitosan par l'eau. **L'effet du taux de mélange** de deux biopolymères a montré une amélioration des propriétés mécaniques et barrières à l'eau et à l'oxygène des films de chitosan. Ces gains de performances sont dus à la bonne miscibilité des deux macromolécules et aux interactions moléculaires établies suite à la formation d'un complexe polyélectrolytique, confirmé par analyse FTIR. **L'irradiation** des films après séchage accroît la polarité de surface et l'hydrophilie des films et ainsi induit une augmentation des propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène, mais aussi des propriétés mécaniques et thermiques des films. Toutefois, l'irradiation ne modifie pas la cristallinité des films. **L'incorporation des antioxydants** (acide férulique, coumarine, quercétine et tyrosol) avec ou sans irradiation agit différemment, selon leur nature, sur l'organisation du réseau macromoléculaire et donc sur les propriétés des films. Ainsi, l'acide férulique et le tyrosol réduisent la perméabilité à la vapeur d'eau mesurée à un gradient de 0-30% d'humidité relative, alors qu'ils l'augmentent jusqu'à 90 fois avec un gradient 30-84% et un traitement d'irradiation. La perméabilité à l'oxygène diminue d'une façon significative après ajout de quercétine ou de tyrosol et après irradiation. L'acide férulique et la coumarine augmentent la force à la rupture des films alors que ce sont la quercétine et l'acide férulique qui permettent d'accroître la résistance thermique des films. Ces résultats mettent ainsi en évidence la complexité des interactions mises en jeu entre les antioxydants et les chaînes de chitosan et/ou de gélatine, leur dépendance au niveau d'hydratation du système et à l'impact du traitement de réticulation par irradiation. Il faut noter que l'irradiation a permis de protéger les molécules actives contre l'oxydation durant une longue période de stockage des films. **La libération** en milieu aqueux de l'acide férulique est la plus ralentie avec une rétention dans les films la plus élevée à l'équilibre (27%). Les coefficients de diffusion des antioxydants, déterminés à partir des cinétiques de libération ont pu être modulés (50%) grâce à l'irradiation.

Mots clés: mélange polysaccharides-protéines, film comestible, irradiation, antioxydants, libération contrôlée

ملخص

تهدف هذه الأطروحة إلى تطوير أفلام اللف الغذائي الصالحة للأكل والمتكونة من خليط الكيتوزان والجيلاتين (لحوم البقر أو السمك)، كما تهدف أيضا إلى فهم مدى تأثير حزمة الإلكترونات المعجلة وإدماج مضادات الأكسدة الطبيعية على الخصائص الفيزيوكيميائية لهذه الأفلام، كما تمت دراسة مدى تأثير الإشعاع على حركية انتشار هذه الجزيئات الفعالة من الفيلم إلى وسط سائل.

أظهرت دراسة أولية أن تكثف خليط الأفلام أو الهلام أثناء التجفيف ليس له علاقة بسمك هذا الخليط أو بدرجة تركيزه أو بمدة التجفيف، وبناء عليه يمكن أن نعتبر أن عملية انتشار الماء داخل الأفلام كانت مثالية و خاضعة لقانون Fick للنشر. كما بينا أن نفاذية بخار الماء ترتفع مع ارتفاع سمك الأفلام وخاصة عندما تكون نسبة الرطوبة عالية. وتنتج هذه الظاهرة عن تضخم الأفلام وانتفاخها بواسطة الماء. أظهرت عملية الخلط بين البيبوليمير (كيتوزان و جيلاتين) تحسنا في الخصائص الميكانيكية و حاجزا لتسرب الماء و الاكسجين إلى فيلم الكيتوزان، و ذلك نتيجة الامتزاج الكلي بين هذه المركبات إثر تكوين المتضاعف الإلكتروني، وهو ما أكدته تحليل FTIR. إن تشعيع الأفلام بعد عملية تجفيفها يزيد في درجة قطبية السطح و تأثيره بالرطوبة، كما يرفع من حاجز تسرب بخار الماء و الأكسجين، إضافة إلى تحسين الخصائص الميكانيكية و الحرارية. كما تجدر الإشارة إلى أن عملية التشعيع ليس لها أي تأثير على درجة تبلور الأفلام.

إن إدماج المواد المضادة للأكسدة (Acide Féruilique-Coumarine-Quercetine-Tyrosol) مع عملية التشعيع أو بدونها يؤثر على الخاصيات الوظيفية للأفلام مختلفة حسب اختلاف خصائصها الفيزيوكيميائية. لهذا نرى ان Acide Féruilique et Tyrosol يقومان بتخفيض نسبة نفاذ بخار الماء في مجال رطوبي (0-30) % كما سجلنا ارتفاعا في نسبة بخار الماء (90مرة) عبر الأفلام و ذلك في مجال رطوبي عال (30-84) % و تحت عملية التشعيع.

إن دمج Tyrosol et Quercetine يمكن من تخفيض نفاذية الاكسجين عبر الفيلم، بينما يمكن دمج Acide Féruilique et Coumarine لتحسين الخاصيات الميكانيكية للفيلم. كما أن دمج Acide Féruilique et Quercetine يحسن الخاصيات الحرارية للفيلم.

وبالتالي تشير هذه النتائج إلى مدى تعقد التفاعلات المشتركة بين مضادات الأكسدة وجزيئات الكيتوزان والجيلاتين، بالإضافة إلى عامل الرطوبة و مدى تأثيرها بعملية التصالب الناتجة عن التشعيع. كما لاحظنا كذلك ان التشعيع ساهم في حفظ الجزيئات الفاعلة ضد التأكسد طيلة فترة التخزين. إن عملية انتشار Acide Féruilique داخل وسط مائي كانت بطيئة مقارنة مع الجزيئات الأخرى و نتج عن ذلك ارتفاع نسبة بقائه (27%) داخل شبكة البيبوليمير في آخر عملية الانتشار.

و أخيرا بينا أن عملية التشعيع مكنت من تخفيض نسبة 50% من معاملات نشر الجزيئات الفعالة.

المفاتيح: خليط بيبوليمير: فيلم لاف صالح للأكل، التشعيع، مضادات الأكسدة، مراقبة عملية الانتشار.

Abstract

This thesis aims to develop an edible packaging made of a mixture of chitosan and gelatin (beef or fish), to better understand the influence of the electron beam irradiation and of the incorporation of natural antioxidants on the physico-chemical and functional properties of the films. A study of the effect of irradiation on antioxidants release kinetics in a simple liquid medium was studied for validation.

A preliminary study first showed that the densification of the film-forming solution and the gel during drying does not depend on the thickness or concentration or time and suggests a Fickian diffusion of water in the matrix. The permeability to water vapor increases linearly with film thickness and especially when the extent of the relative humidity differential is high. This phenomenon is attributed to a swelling mechanism and plasticization of the gelatin-chitosan network by the water. The **effect of the chitosan-gelatin ratio** showed an improvement of the mechanical properties and barrier to water and oxygen of the films compared to chitosan films. These performance gains are due to the good miscibility of the two macromolecules and to the molecular interactions established after the formation of a polyelectrolyte complex, as confirmed by FTIR analysis. **Irradiation** of films after drying increases the polarity of the surface and the film hydrophilicity, and thus induces an increase in barrier properties to water vapor and oxygen, and also of the mechanical and thermal films. However, irradiation does not change the crystallinity of the films. The **incorporation of antioxidants** (ferulic acid, coumarin, quercetin and tyrosol) with or without irradiation acts differently on the organization of the macromolecular network and thus on the film properties. Thus, ferulic acid and tyrosol reduce the permeability of water vapor measured in a gradient of 0-30% relative humidity, while it increases up to 90 times with a gradient 30-84 % and an irradiation treatment. The oxygen permeability decreases significantly after addition of quercetin or tyrosol and after irradiation. Ferulic acid and coumarin increases the tensile strength of the films while they are quercetin and ferulic acid which allow to increase the thermal resistance of the films. These results thus demonstrate the complexity of the interactions involved between antioxidants and the chains of chitosan and/or gelatin, their dependence on the moisture level of the system and on the impact of cross-linking treatment by irradiation. It is noticed that the irradiation has protected the active molecules against oxidation for a long period of storage of the films. **Release** in aqueous medium of ferulic acid is the more delayed with the highest retention in the film at equilibrium (27%). The antioxidants diffusion coefficients, determined from the release kinetics, could be modulated (about 50%) by the irradiation treatments.

Keywords: polysaccharide-protein mixture, edible film, irradiation, antioxidants, controlled-release

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'université de Bourgogne (UMR A102.02 PAM Procédés Alimentaires et Microbiologies, AgroSup-Dijon/université de Bourgogne) et l'université de Carthage (Faculté des Sciences de Bizerte et Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis)

Tout d'abord je tiens à remercier Monsieur Patrick GERVAIS, directeur de l'UMR PAM, et Monsieur Rémi SAUREL, directeur de l'équipe PAPC, de m'avoir accueilli au laboratoire.

J'adresse mes sincères et profonds remerciements à Monsieur Frédéric DEBEAUFORT, Professeur à l'IUT de Dijon-Auxerre, qui a encadré cette thèse, pour sa patience, sa bonne humeur, son sens de la responsabilité et son soutien permanent qui ont fait de ce doctorat une expérience très enrichissante et qui a rendu possible la fin heureuse de mes études en France, et qui j'en suis sûr, me seront bénéfiques dans les années futures. Merci Monsieur DEBEAUFORT pour votre qualité scientifique indéniable et surtout votre profonde gentillesse.

De même, j'adresse mes remerciements et profonds respects à Monsieur Thomas KARBOWIAK, Maître de conférences à AgroSup-Dijon, qui a encadré cette thèse, pour son soutien permanent, ses conseils et compétences qui m'ont été très utiles, tant sur le plan pratique que sur le plan théorique, sans oublier sa gentillesse et son caractère humaine très noble.

Je remercie Madame Salwa BORNAZ, Maître de conférences à l'Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis et à Madame Sihem BELLAGHA, Professeur à l'Institut National Agronomique de Tunisie pour la co-direction de ma thèse.

Je remercie Madame Nathalie GONTARD et Monsieur Moncef NASRI pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je suis également très reconnaissant aux professeurs Pascal DEGRAEVE et Ahmed Hichem HAMZAOUÏ d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Puis, je souhaite également témoigner toute ma gratitude à Mesdames Odile CHAMBIN et Claire-Hélène BRACHAIS pour s'être intéressées à cette étude, pour m'avoir accueilli et permis de réaliser une partie de mes travaux au sein de la Faculté de Pharmacie et à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'université de Bourgogne. Je remercie aussi Madame Aline BONNOTTE, du Centre de Microscopie Appliquée DYMACELL de Dijon, pour la réalisation des analyses microstructurales par ESEM.

Remerciements

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Monsieur Jean-Pierre GAY de l'IUT de Dijon-Auxerre pour ses efforts, et surtout sa patience pour la correction en anglais des publications.

Toute ma reconnaissance va aussi au Ministère de l'Enseignement Supérieur de Tunisie, à la direction du Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires (CNSTN) et aussi à l'université de Bourgogne et à l'UMR PAM-PAPC pour le financement d'une partie de mes travaux de thèse.

J'adresse mes profonds remerciements à la direction de la formation et des ressources humaines à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA, Vienna) pour l'octroi d'une bourse de stage de perfectionnement durant ma thèse.

Mes remerciements vont aussi aux personnels de la sous-direction des rayonnements ionisants au CNSTN pour leur soutien et aux personnels du laboratoire PAPC, en particulier Bernadette, avec qui j'ai travaillé durant ma thèse. J'aimerais bien aussi remercier tous mes collègues étudiant(e)s en thèse et les stagiaires que j'ai croisé au laboratoire.

Enfin, je remercie le département Génie Biologique de l'IUT de Dijon-Auxerre, qui m'ont offert la possibilité de donner quelques travaux pratiques aux étudiants de DUT, et plus particulièrement Mme Isabelle Vialet qui m'a tutoré durant ces enseignements.

*Je dédie ce travail surtout à mes parents,
ils m'ont toujours encouragés tout au long de mon parcours et soutenus dans mes choix.*

Liste des travaux relatifs à la thèse

PUBLICATIONS dans des revues internationales à comité de lecture

Publications parues

Benbettaïeb, N., Kurek, M., Bornaz, S. & Debeaufort, F.(2014).Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin- chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2409–2419.

Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Bornaz, S. & Debeaufort, F.(2015). A Spectroscopic analyses for understanding the effect of electron beam irradiation doses on mechanical and transport properties and microstructure of chitosan-fish gelatin blend films. *Journal of food hydrocolloids*, 46, 37-51.

Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.H. & Debeaufort, F.(2015). Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Journal of Food Chemistry*. DOI information: 10.1016/j.foodchem.2015.03.034

Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Assifaoui, A. Debeaufort, F. & Chambin, O.(2015). Controlled release of tyrosol and ferulic acid encapsulated in chitosan-gelatin films after electron beam irradiation. *Journal of Radiation Physics and Chemistry*. doi:10.1016/j.radphyschem.2015.01.035.

Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.H. & Debeaufort, F.(2015). Coupling tyrosol, quercetin or ferulic acid and electron beam irradiation to cross-link chitosan-gelatin films: a structure-function approach. *European Polymer Journal*, Accepted the 26th march.

Publication soumise

Benbettaïeb, N., Assifaoui, A., Chambin, O., Karbowiak, T. & Debeaufort, F. (2015). Release of coumarin encapsulated in chitosan-gelatin irradiated films. *Journal of food hydrocolloids*.

Liste de publications et communications

Publications en préparation

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Chambin, O., & Debeaufort, F. (2015). Release of quercetin encapsulated in chitosan-gelatin films affected by the nature of aqueous medium and irradiation treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry (short communication)*

Benbettaïeb, N., Karbowski, & Debeaufort, F. (2015). Modification of functional properties of edible and bio-based films by chemical or physical treatments: a survey. *Food Technology*.

Benbettaïeb, N., Karbowski, & Debeaufort, F. (2015). Performances et applications des films comestibles à base de protéines et polysaccharides en mélange: relations structure-propriétés fonctionnelles. *Industries Alimentaires et Agricoles*

COMMUNICATIONS à des congrès internationaux

Communications orales

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Bornaz, S., Voilley, A. & Debeaufort, F. Relation between moisture transfer, water wettability and structure of gelatin based films treated or not by electron beam. *8th International Conference on water in Food*, May 25-27, 2014, Timisoara, Romania

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Bornaz, S. & Debeaufort, F. Influence of electron beam irradiation on the release of natural antioxidants encapsulated in biopolymer-blend films: application as active packaging. *Ionizing Radiation and Polymers international conference*. IRAP 2014, 5-9 Octobre 2014. Jeju Island, Corée du Sud.

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Bornaz, S. & Debeaufort, F. Enhancement of thermal, mechanical, barrier and structural properties of blend polysaccharide and protein edible film by electron beam irradiation. *Ionizing Radiation and Polymers international conference*. IRAP 2014, 5-9 Octobre 2014. Jeju Island, Corée du Sud.

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Assifaoui, A., Chambin, O., & Debeaufort, F. Release of natural antioxidants from hydrocolloid edible films affected by irradiation. *18th Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference*. Glyndwr University, Wrexham, UK. June 23rd - 26th 2015.

Benbettaïeb, N., Karbowski, T. & Debeaufort, F. Analysis of interactions induced by electron beam irradiation of hydrocolloid edible films. *18th Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference*. Glyndwr University, Wrexham, UK. June 23rd - 26th 2015

Liste de publications et communications

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Assifaoui, A., Chambin, O., & Debeaufort, F. Influence of film irradiation on the release of quercetin encapsulated in chitosan-gelatin edible films. *6th International Symposium on Delivery of Functionality in Complex Food Systems*. Physically-Inspired Approaches from the Nanoscale to the Microscale. Paris, France. July 14-17, 2015

Communications par affiches

Benbettaïeb, N., Kurek, M., Bornaz, S. & Debeaufort, F. Barrier, structural and mechanical properties of chitosan and bovine-gelatin blends film for food applications. *17th Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference*, June 25th-28th, 2013, Wrexham, UK

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Bornaz, S. & Debeaufort, F. Effect of electron beam irradiation on mechanical, barrier and structural properties of chitosan-fish gelatin blend films. *Neutron and Food*, Paris 9-11 Juillet 2014

Benbettaïeb, N., Karbowski, T. & Debeaufort, F. Radiation crosslinking of polysaccharide-protein blend film: Effect on functional properties. Réseau Mixte Technologique (RMT) PROPACK FOOD. *L'emballage source d'innovation*. 30 septembre 2014. Technopole Alimentec. Bourg-en-Bresse.

Benbettaïeb, N., Karbowski, T. & Debeaufort, F. Effects of irradiation and of coumarin and ferulic acid incorporation on properties of active packaging films based on gelatin and chitosan. Réseau Mixte Technologique (RMT) PROPACK FOOD. *L'emballage source d'innovation*. 30 septembre 2014. Technopole Alimentec. Bourg-en-Bresse.

Benbettaïeb, N., Karbowski, T. & Debeaufort, F. Cumulative effects of both active compounds (Ferulic acid and Tyrosol) and electron beam irradiation on the properties of edible protein-polysaccharide films. *Ionizing Radiation and Polymers international conference*. IRAP 2014, 5-9 Octobre 2014. Jeju Island, Corée du Sud.

Benbettaïeb, N., Karbowski, T. & Debeaufort, F. How to favor crosslinking in hydrocolloid-based edible films. *18th Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference*. Glyndwr University, Wrexham, UK. June 23rd - 26th 2015.

Benbettaïeb, N., Karbowski, T., Assifaoui, A., Debeaufort, F. & Chambin, O. Controlled release of quercetin encapsulated in biopolymer films modulated by electron beam irradiation. *1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery*. Reims, France, 13-14 April 2015.

Liste de publications et communications

Benbettaïeb, N., Karbowskiak, T. & Debeaufort, F. Chitosan-gelatin blend film: effect of films thickness, relative humidity conditions and polymer ratio on functional properties of edible films. The 3rd International Symposium International Meeting on Packaging Material / Bioproduct Interactions. MATBIM2015. University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, 17-19 June 2015.

Benbettaïeb, N., Karbowskiak, T., Assifaoui, A., Chambin, O., & Debeaufort, F. Release of tyrosol and ferulic acid from biomaterial-based edible films modulated by irradiation. The 3rd International Symposium International Meeting on Packaging Material / Bioproduct Interactions. MATBIM2015. University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, 17-19 June 2015.

Benbettaïeb, N., Karbowskiak, T. & Debeaufort, F. Influence of natural antioxidants addition on chitosan-fish gelatin films properties after irradiation treatment. The 3rd International Symposium International Meeting on Packaging Material / Bioproduct Interactions. MATBIM2015. University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, 17-19 June 2015.

Benbettaïeb, N., Karbowskiak, T., Assifaoui, A., Chambin, O., & Debeaufort, F. The impact of irradiation on chitosan-gelatin film properties for controlled release. The 5th International Conference on Biobased and Biodegradable Polymers to be held in San Sebastian, Spain, 6-9 October 2015.

Liste des abréviations et symboles

A = surface (m^2)

ATR = réflexion totale atténuée

A_w = activité de l'eau

C = concentration ($g.L^{-1}$)

C_0 = concentration initiale ($g.L^{-1}$)

CS = chitosan

DA = degré d'acétylation

D = coefficient de diffusion apparent ($m^2.s^{-1}$)

DD = degré de déacétylation

DSC = calorimétrie différentielle à balayage

E = allongement à la rupture (Elongation at break)

e = épaisseur (m)

ESEM = microscopie électronique à balayage environnementale

ESR = résonance paramagnétique électronique

FTIR = infra rouge à transformée de fourier

G = gélatine

GLY = glycérol

n = indice de réfraction

m_i = masse initiale de film avant séchage

m_f = masse finale de film après séchage

m'_i = masse sèche de film initiale

m'_f = masse sèche de film non solubilisée dans l'eau

p = pression partielle (Pa)

p_0 = pression de vapeur saturante (Pa)

PO₂ = perméabilité à l'oxygène ($g.m^{-1}.s^{-1}.Pa^{-1}$)

RH = humidité relative (%)

T_d = température de début de dégradation thermique (°C)

Liste des abréviations

T_f = température de fin de dégradation thermique (°C)

T_g = Température de transition vitreuse (°C)

T_{max} = température maximale de dégradation thermique

TS = force à la rupture (MPa)

v = volume

w = masse

WVP = Perméabilité à la vapeur d'eau ($\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$)

WVTR = vitesse de transmission de la vapeur d'eau ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

X = teneur en eau (g eau / g matière sèche)

XRD = diffraction des rayons X

YM = module de Young (MPa)

Δp = différence de pression partielle (Pa)

Δw = perte de masse (%)

θ = angle de contact (°)

θ_x = angle du faisceau incident (°)

λ = longueur d'onde (nm)

γ_{LV} = tension superficielle à l'interface liquide-vapeur ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

γ_{SL} = tension superficielle à l'interface solide-liquide ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

γ_{SV} = tension superficielle à l'interface solide-vapeur ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

γ_S = tension de surface des films ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

γ_S^d = composante dispersive de la tension de surface des films ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

γ_S^p = composante polaire de la tension de surface des films ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)

Sommaire

Résumé en français

Résumé en arabe

Résumé en anglais

Remerciements

Liste des travaux relatifs à la thèse

Liste des abréviations

Introduction	1
Chapitre I. Etude bibliographique	5
I.1. Les emballages comestibles et biodégradables	5
I.1.1. Généralités	5
I.1.2. Classification des biopolymères d'origine naturelle pour des applications en emballage	6
I.1.3. Qualités requises et fonctions des films et enrobages comestibles	8
I.1.4. Application des films et enrobages comestibles	9
I.1.5. Performances des biopolymères en emballage	13
I.1.5.1. Propriétés mécaniques	13
I.1.5.2. Propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène	14
I.1.5.3. Propriétés de surface des films comestibles	15
I.1.5.4. Propriétés thermiques des films comestibles	16
I.1.6. Fabrication des films d'emballage comestibles et biodégradables	17
I.1.6.1. Voie humide	17
I.1.6.2. Voie sèche	17
I.1.7. Paramètres influençant les propriétés fonctionnelles des films comestibles	18
I.1.7.1. Influence du plastifiant	18
I.1.7.2. Influence de la concentration en eau et du gradient d'humidité relative	19
I.1.7.3. Influence de l'épaisseur des films	19
I.2. Valorisation des polysaccharides issus des industries des produits de la mer (cas du chitosan) pour des applications en emballage	20
I.2.1. La chitine	20
I.2.2. Le chitosan	21
I.2.3. Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosan	23
I.2.4. Applications de la chitine et du chitosan	24
I.2.5. Application du chitosan en tant que film d'emballage comestible et enrobage	25
I.2.6. Application du chitosan en tant qu'agent d'encapsulation des molécules actives	26
I.2.6.1. Domaines pharmaceutique et médical	26
I.2.6.2. Domaine alimentaire	26

I.2.7. Paramètres influençant les propriétés des films de chitosan	27
I.2.7.1. Degrès d'acétylation et masse molaire	27
I.2.7.2. Nature de solvant	28
I.2.7.3. Effet du plastifiant	28
I.2.7.4. Effet des conditions de séchage	28
I.2.8. Limites des applications du chitosan en tant que film d'emballage	29
I.3. Valorisation des protéines issues des industries des produits de la mer (cas de la gélatine) pour des applications en emballage	30
I.3.1. Le collagène	30
I.3.2. Du collagène à la gélatine	30
I.3.3. La gélatine	33
I.3.3.1. Structure et composition	33
I.3.3.1.1. Structure primaire	33
I.3.3.1.2. Structure secondaire	34
I.3.3.2. La gélatine en solution	34
I.3.3.3. Propriétés technologiques et caractéristiques de la gélatine	34
I.3.4. Applications de la gélatine	35
I.3.4.1. Industrie pharmaceutique	35
I.3.4.2. Industrie alimentaire	35
I.3.4.3. Industrie de la photographie	36
I.3.5. Emballages biodégradables et comestibles à base de gélatine	36
I.3.6. Application de la gélatine en tant qu'agent d'encapsulation de molécules actives	37
I.3.6.1. Domaine pharmaceutique et médicale	37
I.3.6.2. Domaine alimentaire	38
I.3.7. Paramètres influençant sur les propriétés des films de gélatine	39
I.3.7.1. Nature de la gélatine	39
I.3.7.2. Condition de séchage	40
I.3.7.3. Plastifiant	40
I.3.8. Limites des applications de la gélatine en tant que film d'emballage et d'enrobage	41
I.4. Films obtenus à partir de mélange de protéines et polysaccharides	42
I.4.1. Nature des interactions entre protéines-polysaccharides	42
I.4.1.1. Interactions électrostatique	43
I.4.1.2. Interactions non-électrostatique	44
I.4.2. Paramètres influençant la formation des complexes protéines-polysaccharides	45
I.4.2.1. Influence du pH et de la force ionique	45
I.4.2.2. Influence du poids moléculaire	46
I.4.2.3. Influence de la température et de la pression	46
I.4.3. Mélanges protéines et polysaccharides: performances et applications en emballage	46
I.4.3.1. Propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène	46
I.4.3.2. Performances mécaniques	48
I.4.3.3. Propriétés thermiques	49
I.4.3.4. Microstructure	50
I.4.3.5. Propriétés de surface	51
I.4.3.6. Opacité	51
I.4.4. Mélange chitosan-gélatine: performances et limites d'application en emballage	54
1.5 Modification of functional properties of polysaccharides proteins films	56
I.5.1. Chemical crosslinking	56
I.5.2. Enzymatic crosslinking	58

I.5.3. Physical crosslinking	59
I.5.3.1. Physical crosslinking by heating	59
I.5.3.2. Physical crosslinking by irradiation	60
I.5.3.2.1. Authorized radioisotopes installation and requirements irradiation doses in food and packaging	60
I.5.3.2.2. UV, gamma and electron beam irradiation for crosslinking of biopolymers films	62
I.6. Encapsulation of active compound in edible and bio-based films	66
I.6.1. Enhancement of edible films functionalities by active compounds: food applications	66
I.6.1.1. Antioxidants agents	66
I.6.1.2. Antimicrobial agents	68
I.6.1.3. Others actives agents	69
I.6.2. Effects of active compounds on physicochemical and structural properties of edible films	72
I.6.3. Controlled release of active compounds from edible films after crosslinking	77
Conclusions	79

Chapitre II. Matériel et méthodes **81**

II.1. Matériel **81**

II.1.1. Les hydrocolloïdes	81
II.1.1.1. Chitosan	81
II.1.1.2. Gélatine	81
II.1.2. Le Plastifiant	81
II.1.3. Les antioxydants	81
II.1.4. Autres composés	82
II.1.4.1. L'acide acétique	82
II.1.4.2. L'éthanol	82
II.1.4.3. Les solutions salines saturées	82
II.1.4.4. Les liquides utilisés pour la détermination de la tension de surface des films	83

II.2.Méthodes **83**

II.2.1. Formulation et préparation des films	83
II.2.1.1. Fabrication des films de chitosan	83
II.2.1.2. Fabrication des films de gélatine	84
II.2.1.3. Fabrication des films issus du mélange de chitosan-gélatine	84
II.2.1.4. Fabrication des films mélange de chitosan-gélatine incorporant des antioxydants naturels	84
II.2.2. Irradiation des films par faisceaux d'électrons	85
II.2.3. Caractérisations physicochimique et structurale des films	86
II.2.3.1. Epaisseur des films	86
II.2.3.2. Couleur des films	86
II.2.3.3. Observations microscopiques des films	87
II.2.3.4. Teneur en d'eau des films	87
II.2.3.5. Solubilité dans l'eau	87
II.2.3.6. Propriétés barrières des films	88
II.2.3.6.1. Perméabilité à la vapeur d'eau	88
II.2.3.6.2. Perméabilité à l'oxygène	89
II.2.3.7. Propriétés mécaniques des films	89
II.2.3.8. Propriétés thermiques des films	91

II.2.3.8.1. Calorimétrie différentielle à balayage	91
II.2.3.8.2. Analyse thermogravimétrique	93
II.2.3.9. Analyses spectroscopiques et de surface	93
II.2.3.9.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	93
II.2.3.9.2. Spectroscopie UV-vis	95
II.2.3.9.3. Résonance paramagnétique électronique (ESR)	95
II.2.3.9.4. Analyse par diffraction des rayons X (DRX)	97
II.2.3.9.5. Analyses de surface par goniométrie	98
II.2.3.9.5.1. Détermination de l'angle de contact	98
II.2.3.9.5.2. Détermination de la tension de surface et la tension de surface critique	100
II.2.3.9.5.3. Détermination de la vitesse et de l'indice de gonflement de films	101
II.2.4. Etude de la libération (release) des antioxydants après immersion des films en milieu liquide aqueux.	102
II.2.5. Analyses statistiques	104

Résultats et discussion

Chapitre III. Propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des films à base de mélanges de chitosan et gélatine (publication n°1) 105

Abstract	105
III.1. Introduction	106
III.2. Materials and methods	107
III.3. Results and discussion	108
III.3.1. Colour measurements	108
III.3.2. Film thickness related to formulation/process	109
III.3.3. Water vapour permeability	110
III.3.3.1. Effect of film thickness	110
III.3.3.2. Effect of relative humidity gradient	112
III.3.3.3. Effect of composition of film on WVP and WVTR	113
III.3.4. Oxygen permeability	115
III.3.5. Mechanical properties	115
III.3.6. Film solubility	118
III.3.7. FTIR spectroscopy of chitosan–gelatin blend films	118
III.3.8. Supplementary data: Film microstructure	121
Conclusions	122

Chapitre IV. Influence des traitements d'irradiation sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des films 123

IV.1. Effet des irradiations sur les propriétés des films de gélatine (publication n°2) 123

Abstract	123
IV.1.1. Introduction	124
IV.1.2. Materials and methods	126
IV.1.3. Results and discussion	127
IV.1.3.1. Free radical generation induced by irradiation of gelatin films	127
IV.1.3.2. Effect on the film structural properties	128
IV.1.3.3. Effect on thermal properties	130
IV.1.3.4. Effect on water vapour permeability	133

IV.1.3.5. Effect on mechanical properties	133
IV.1.3.6. Effect on the wettability and surface properties	134
Conclusions	136

IV.2. Effet des irradiations sur les propriétés des films mélange chitosan-gélatine (publication n°3)

Erreur ! Signet non défini.

Abstract	137
IV.2.1. Introduction	138
IV.2.2. Materials and methods	140
IV.2.3. Results and discussion	141
IV.2.3.1. Effect of electron beam irradiation doses on appearance and microstructure properties	141
IV.2.3.2. Effect of electron beam irradiation doses on mechanical properties	144
IV.2.3.3. Effect of electron beam irradiation doses on transfer properties	147
IV.2.3.4. Effect of irradiation on the surface properties of films	150
IV.2.3.5. Effect of electron beam irradiation doses on molecular properties: a spectroscopic investigation	152
IV.2.3.5.1. FTIR spectroscopy	152
IV.2.3.5.2. UV-vis spectroscopy	156
IV.2.3.5.3. Electron Spin Resonance analysis	158
Conclusions	163
IV.2.3.6. Supplementary data: Effect of irradiation doses on structural and thermal properties of chitosan and blend chitosan-gelatin film	164
IV.2.3.6.1. Effect on the film structural properties	164
IV.2.3.6.2. Effect on the film thermal properties	165

Chapitre V. Influence des antioxydants (acide férulique, tyrosol et quercétine) sur les propriétés des films de chitosan et de gélatine avec ou sans traitement d'irradiation

169

V.1. Effet de l'incorporation de l'acide férulique, de tyrosol et de la quercétine sur les propriétés physico-chimiques et structurales des films (publication n°4)

169

Abstract	169
V.1.1. Introduction	171
V.1.2. Materials and methods	172
V.1.3. Results and discussion	173
V.1.3.1. Free radical generation	173
V.1.3.2. Mechanical properties	175
V.1.3.3. Water vapour permeability	177
V.1.3.4. Oxygen permeability	178
V.1.3.5. Surface properties and wettability	180
V.1.3.6. Thermo-gravimetric analysis (TGA)	182
V.1.3.7. FTIR spectroscopy	186
V.1.3.8. ACP and overall discussion and conclusions	189
V.1.3.9. Supplementary data: Surface properties and wettability	192

V.2. Effets d'irradiation sur les mécanismes de libération des antioxydants dans des milieux liquides modèles (publications n°5 et 6) 193

V.2.1. Comportements de l'acide férulique et du tyrosol	193
Abstract	193
V.2.1.1. Introduction	194
V.2.1.2. Materials and methods	195
V.2.1.3. Results and discussion	196
V.2.1.3.1. Water barrier and mechanical properties	196
V.2.1.3.2. Release of ferulic acid or tyrosol from films into the water medium	197
V.2.2. Comportement de la quercétine	201
Conclusions	204

Chapitre VI. Influence de l'incorporation de la coumarine sur les propriétés des films et sur sa libération après irradiation (publication n°7) 205

Abstract	205
VI.1. Introduction	206
VI.2. Materials and methods	207
VI.3. Results and discussion	208
VI.3.1. How irradiation and coumarin addition influence chemical and structural organisation of biopolymer-blend network	208
VI.3.1.1. Free radical generation	208
VI.3.1.2. FTIR spectroscopy	209
VI.3.1.3. Thermo-gravimetric analysis (TGA)	211
VI.3.2. Impact of both irradiation and coumarin addition on functional film properties	213
VI.3.2.1. Surface properties and wettability	213
VI.3.2.2. Water vapour permeability	215
VI.3.2.3. Mechanical properties	217
VI.3.3. Influence of irradiation and coumarin on its release in aqueous media	217
Conclusions	220

Conclusions et perspectives 221

Références bibliographiques 229

Introduction

Introduction générale

La conservation des aliments comprend un ensemble de procédés de traitement dont le but est de préserver les propriétés gustatives et nutritives et les caractéristiques de texture et de couleur des denrées alimentaires, ainsi que leur comestibilité, et d'éviter d'éventuelles intoxications alimentaires. La conservation des denrées alimentaires concerne tous les facteurs biotiques (micro-organismes, animaux, germination végétale...etc.) et abiotiques (lumière, oxygène, chaleur, irradiation, UV, etc.) qui peuvent détériorer la qualité de la denrée alimentaire stockée. De nombreuses technologies de conservation ont été développées au cours des deux derniers siècles. Le développement industriel s'est accompagné du développement du transport et de la commercialisation qui ont impliqué un conditionnement adéquat, et par conséquent le développement de matériaux d'emballage à base de bois, de papiers, de métaux, de verre et plus récemment à base de polymères synthétiques issus du pétrole ou du charbon (plastiques). De par leurs bonnes propriétés mécaniques, leur faible coût, leurs grandes cadences de fabrication et leur grande souplesse d'emploi, l'utilisation des plastiques synthétiques a augmenté intensivement ces dernières décennies. Ainsi, au moins 50% des produits agro-alimentaires en Europe sont emballés dans un matériau plastique. Néanmoins, la grande stabilité physico-chimique des plastiques synthétiques pose un réel problème d'élimination en fin de vie. Aujourd'hui ces matières représentent environ 38% du volume des déchets ménagers, en raison de leur faible densité par rapport aux métaux ou au verre.

De nouveaux types d'emballages plus respectueux de l'environnement ont été développés à base de biopolymères naturels issus de ressources renouvelables. Parmi ces biomatériaux, la valorisation de coproduits marins est envisagée comme une alternative prometteuse des emballages. Le chitosan est un polymère naturel dérivé de la chitine. Commercialement, la chitine et le chitosan sont issus des déchets de l'industrie de transformation des produits de la pêche, obtenus à partir des carapaces de crevettes, de crabes ou de homards. Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas recyclés et étaient simplement rejetés à la mer après décorticage ou mis en décharge, créant de sérieux problèmes de pollution au voisinage des sites de production. La valorisation de ces déchets étant économiquement viable, le chitosan a donc suscité de l'intérêt pour sa biodégradabilité en environnement, pour sa biocompatibilité, pour ses activités bactériostatiques et fongistatiques et plus particulièrement pour ses propriétés filmogènes. On peut ainsi fabriquer des films sans utiliser d'additifs. Les films de chitosan possèdent de bonnes propriétés barrières aux gaz (CO₂) et mécaniques. Grâce à ces qualités, de nombreuses études ont été effectuées sur les applications du chitosan comme films d'emballage pour conserver ou pour prolonger la durée de vie de certains produits agro-alimentaires, parmi lesquels nous pouvons citer les fruits et légumes, la viande, et les fruits de mer. Ces études montrent qu'il est envisageable d'utiliser le chitosan comme matériau d'emballage comestible et actif. La gélatine, produit de dégradation de collagène, protéine essentiellement extraite des peaux, des os et des cartilages de mammifères et de poissons, est

largement utilisée en pharmaceutique (gélules) mais est aussi intéressante en enrobage ou emballage alimentaire pour la conservation de certains produits alimentaires. Aujourd'hui, la gélatine et le collagène ont des applications commerciales réussies comme des films comestibles utilisés dans l'industrie de la viande (boyaux collagéniques) grâce à ses propriétés filmogènes et surtout barrières aux gaz. Dans les années 2000, les films à base de gélatine de poisson ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs en substitution de la gélatine de bœuf et de porc pour des raisons techniques (performances), éthiques ou sanitaires (maladie de la « vache folle ») et religieuses.

Les films de chitosan, comme la plupart de films polysaccharidiques, mais aussi les films de gélatine ont des propriétés barrières à la vapeur d'eau modestes, voire faibles, dues à leur affinité pour l'eau ou l'humidité, des propriétés mécaniques très dépendantes de l'humidité ou de la présence de plastifiants, une solubilité dans les phases aqueuses limitant leur contact avec des aliments humides.... Ces limites liées aux propriétés intrinsèques de chaque biopolymère, peuvent être levées par divers moyens : associations avec des lipides, mélange de biopolymères, réticulation ou polymérisation enzymatique ou chimique.... Cependant ces voies d'amélioration induisent soit des techniques ou procédés ou formulations coûteuses, longues, ou impliquent l'usage de composés toxiques (agent réticulant comme le glutaraldéhyde). Par conséquent, dans l'objectif d'applications comme emballages comestibles actifs, des voies plus douces sont recherchées afin de préserver la « comestibilité ».

Ainsi des films comestibles à base de plusieurs composants filmogènes ont été mis au point afin de tirer parti des propriétés complémentaires de plusieurs biopolymères et limiter les inconvénients propres à chacun d'entre eux. Les performances des films à base d'hydrocolloïdes peuvent ainsi être améliorées après mélange protéine-polysaccharide grâce à la mise en jeu d'interactions physico-chimiques nombreuses qui contribuent à la formation d'un réseau continu et cohésif.

A un pH adapté, le chitosan et la gélatine ont la particularité de pouvoir former un complexe polyélectrolytique stable, qui contribue à accroître les propriétés fonctionnelles des films ainsi obtenus. D'autres techniques de réticulation physique, considérées comme propres car n'utilisant pas de solvant, ont également été envisagées. C'est, par exemple, l'irradiation par rayonnements UV, photon, gamma ou par faisceaux des électrons, qui s'est avérée comme une alternative efficace pour créer des nouvelles liaisons intra- ou intermoléculaires entre les chaînes de biopolymères. Cela a particulièrement été démontré pour des systèmes protéiques, améliorant très significativement les propriétés barrières et mécaniques de films protéiques. Les traitements ionisants n'engendrent pas d'élévation de température, ni de résidus toxiques dans le produit fini ou dans le film comestible, et le procédé de traitement est très simple et facile à contrôler.

Par ailleurs, la modification de la structure des réseaux de biopolymères par réticulation des chaînes par des traitements physiques, enzymatiques ou chimiques, permet aussi l'immobilisation des molécules bio-actives et le contrôle de leur libération. En effet, la formation d'un réseau de macromolécules réticulées permet de retarder/contrôler la libération des composés actifs encapsulés dans un emballage comestible (film ou enrobage) vers l'aliment. Cette approche permet d'ouvrir vers d'autres applications des films comestibles comme emballage actif. L'incorporation d'antioxydants et/ou d'antimicrobiens, par exemple, dans les films d'emballage et dans des enrobages à base des biopolymères a trouvé plusieurs applications dans le domaine alimentaire afin

d'augmenter la durée de conservation des produits ainsi emballés. Très peu d'études se sont intéressées à la modification des propriétés physiques et structurales des films suite à l'incorporation de ces composants actifs, et encore moins après des traitements de réticulation par irradiation.

Ainsi l'objectif principal de cette étude s'articule sur l'effet synergique de l'irradiation et de l'ajout d'antioxydants naturels sur les propriétés fonctionnelles des films à base d'un mélange protéine-polysaccharide. Visant une application comme emballage ou enrobage comestible actif, l'effet de l'irradiation sur la libération de ces antioxydants, dans un milieu aqueux modèle, a été aussi étudié.

Le premier chapitre de notre étude présente une synthèse bibliographique axée

- sur la valorisation des sous-produits issus de l'industrie de la mer pour des applications en emballage et/ou pour l'encapsulation,
- sur l'étude des mélanges protéines-polysaccharides pour la fabrication de films d'emballage alimentaire et sur leurs performances,
- sur les méthodes d'amélioration des propriétés physiques et structurales des films à base d'hydrocolloïdes par ajout de molécules actives ou par procédés d'irradiation,

et enfin, l'effet de la réticulation sur la libération des molécules actives encapsulées dans des biopolymères.

Le deuxième chapitre est consacré à la description des matériels et des méthodes utilisés pour la préparation des films et leurs caractérisations.

Les résultats et leur discussion sont présentés du chapitre III au chapitre VI et concernent :

- les propriétés physicochimiques et structurales des films obtenus à partir du mélange des deux hydrocolloïdes : le chitosan et la gélatine,
- l'effet de l'irradiation et de l'incorporation des antioxydants naturels (acide férulique, quercétine, tyrosol et coumarine) sur les propriétés fonctionnelles des films
- et le contrôle de la libération de ces antioxydants, dans un milieu aqueux, modulé par l'irradiation. Ces résultats sont intégralement extraits des publications acceptées et soumises.

Le chapitre III discute de l'impact du mélange de chitosan et gélatine-bovine à différents ratios sur les propriétés barrières, mécaniques et structurales des films, ainsi que de l'influence de l'épaisseur des films et du gradient d'humidité relative (Publication n°1 : *Journal of Sciences and Food Agriculture*, 94 (2014), 2409–2419). Ces résultats nous ont permis de définir le système d'étude utilisé dans les chapitres suivants.

Le chapitre IV présente les résultats de l'effet de l'irradiation par faisceaux des électrons sur les propriétés barrières, mécaniques, structurales et thermiques des films de chitosan et gélatine de poisson, seuls ou en mélange (Publication n°2 : *Food Chemistry* (2015), 10.1016/j.foodchem.2015.03.034, et Publication n°3: *Food Hydrocolloids*, 46, (2015) 37-51).

Dans le chapitre V sont étudiés les effets de l'irradiation et de l'ajout des antioxydants naturels (acide férulique, tyrosol et quercétine) sur les propriétés barrières, mécaniques, thermiques et structurales des films de gélatine et de chitosan en mélange 1:1 ainsi que l'influence du traitement d'irradiation

sur la libération de ces antioxydants en milieux aqueux (Publication n°4 : *European Polymer Journal*, acceptée, et Publication n°5 : *Journal of Radiation Physics and Chemistry*, (2015), 10.1016/j.radphyschem.2015.01.035, et publication n°6 : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, en préparation).

Le chapitre VI expose l'effet de l'irradiation et de l'incorporation de la coumarine sur les propriétés des films et sur les propriétés de libération de cet antioxydant en milieux aqueux (Publication n°7 : *Food hydrocolloids*, soumise).

Le chapitre VII correspond à une conclusion-discussion générale de l'ensemble de résultats, mettant en relation les propriétés fonctionnelles (mécaniques et barrières) et l'application (libération des antioxydants) avec les propriétés physicochimiques et de structure en fonction des variables étudiées (dose d'irradiation et ajout des molécules actives). Celles-ci nous amènent à conclure et à dégager des perspectives à ce travail de thèse.

Chapitre I. Etude bibliographique

Chapitre I. Etude bibliographique

I.1. Les emballages comestibles et biodégradables

I.1.1. Généralités

Depuis les années 1920, les matières plastiques synthétiques, dérivées de la chimie du pétrole occupent une place de plus en plus importante dans l'industrie et dans notre vie quotidienne. On les retrouve dans de nombreux produits de consommation courante tels que les emballages, les bâtiments et les travaux publics, l'ameublement, le transport, le médical,... Le secteur de l'emballage est premier marché des matières plastiques (4,6 millions de tonnes en 2011) en France. Comme illustré dans la **Figure I.1** il concentre 44 % de la demande en matériaux plastiques (en hausse de 2,3% par an entre 2010 et 2011) loin devant le BTP (20,6 %) et l'automobile (9,1 %).

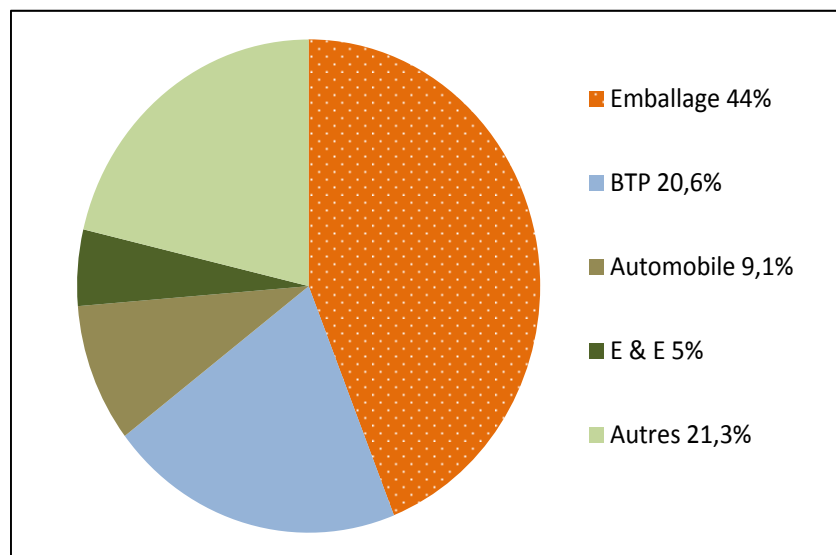


Figure I.1. Répartition de la consommation des plastiques en France par grands domaines d'utilisation d'après (Plastics Europe, 2011)

Le plastique aide à améliorer le quotidien mais leur grande stabilité physicochimique pose des problèmes lors de l'élimination de leurs déchets et par conséquent induit une pollution. Dans l'optique du développement écologique, différents modes d'élimination des déchets plastiques, en France, ont été proposés (**Figure I.2**). Plusieurs problèmes sont liés aux modes d'élimination comme le coût élevé ou les procédés sophistiqués du recyclage et de valorisation énergétique. En outre, les méthodes d'incinération impactant l'environnement par les émissions importantes de gaz à effet de serre. Dans ce contexte, l'élaboration de nouveaux emballages biodégradables ou comestibles

constitue une alternative très intéressante. La caractéristique la plus intéressante des emballages à base de biopolymères est leur biodégradabilité et leur origine renouvelable.

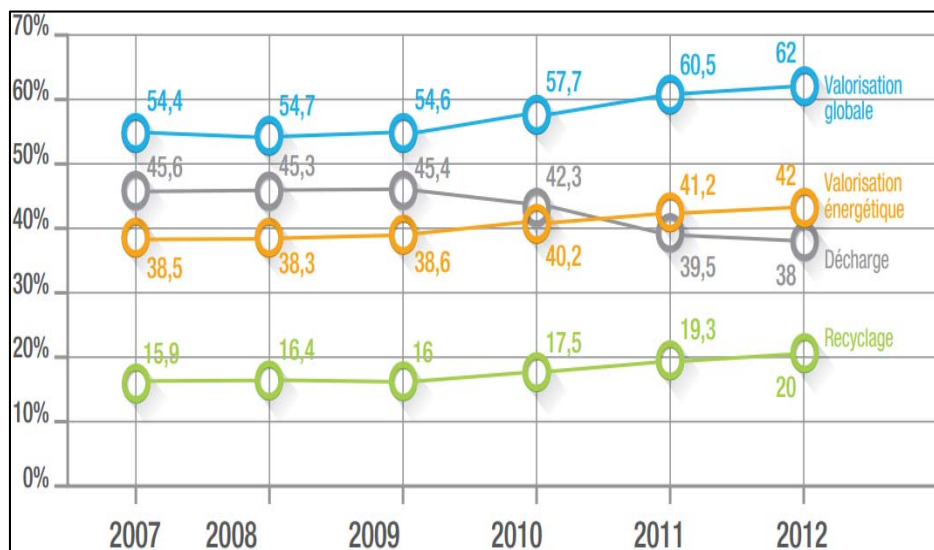


Figure I.2. Modes d'élimination des déchets plastiques en Europe (Plastics Europe, 2013).

Le remplacement total des plastiques synthétiques par des emballages biodégradables reste utopique bien que cela semble évident et nécessaire. Une alternative serait de minimiser les quantités de matières plastiques non dégradables par des substituts biosourcés biodégradables et éco-compatibles, voire comestibles

I.1.2. Classification des biopolymères d'origine naturelle pour des applications en emballage

Les emballages comestibles biosourcés ou biodégradables sont constitués de macromolécules d'origine naturelle et renouvelables, appelées biopolymères, tels les polysaccharides (celluloses et dérivés, amidons et dérivés, chitine et chitosan, etc.), les protéines (caséine, lactosérum, collagène, gélatine, gluten, protéine de soja, etc), les composés lipidiques (cires, acides gras et dérivés, etc.) ou les polyesters (poly-(3-hydroxybutyrate) (PHB) ou (poly-(3-hydroxyvalérate) (PHV), poly(acide lactique) (PLA). Ces biopolymères d'origine naturelle potentiellement utilisés pour l'emballage peuvent être classés selon la **Figure I.3**.

Ces biopolymères, aussi appelés agro-matériaux, sont des macromolécules naturelles renouvelables et compostables. Ils sont issus de plusieurs types d'agro-composés tels que les hydrocolloïdes (protéines et polysaccharides) et les lipides/acides gras. La plupart d'entre eux peuvent être mis en œuvre à l'état natif ou plastifié ou en association avec d'autres polymères. Ils sont utilisés en tant que film ou enrobage. Dans notre étude, nous nous sommes intéressées à la valorisation des hydrocolloïdes (chitosan et gélatine) issus de sous-produits marins.

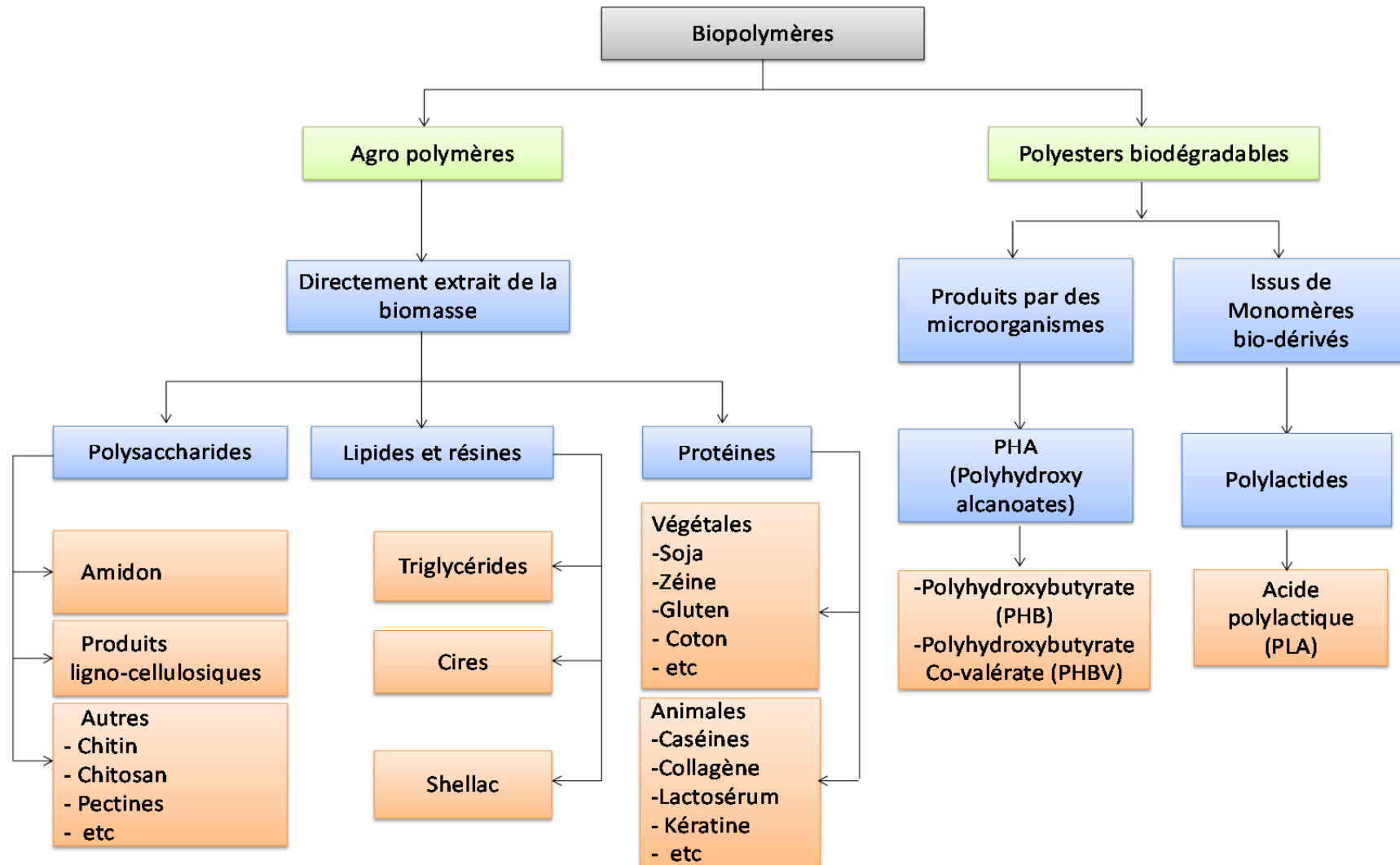


Figure I.3. Classification de polymères biodégradables (D'après Averous, 2004)

I.1.3. Qualités requises et fonctions des films et enrobages comestibles

D'une façon générale, un film comestible est défini comme une fine couche de matériau comestible déposée sur un aliment comme un enrobage ou sous la forme d'un film disposé autour ou entre différents constituants alimentaires. Les principales fonctions du film ou de l'enrobage comestible sont de limiter les migrations de la vapeur d'eau, du dioxygène, du dioxyde de carbone, d'arômes, *etc.*, d'améliorer l'intégrité mécanique de l'aliment et d'être éventuellement le vecteur d'ingrédients ou d'additifs alimentaires comme des antioxydants, des antimicrobiens et des arômes (Quezada-Gallo et al., 1999). Dans le cas où l'emballage ne fait pas partie intégrante de l'aliment et ne peut pas être consommé en même temps que l'aliment, mais élaboré à partir de biomolécules, il sera alors qualifié de film biosourcé et/ou biodégradable dans la mesure où sa bio-assimilation a été évaluée et confirmée.

Plusieurs qualités sont requises pour l'utilisation des emballages comestibles. À part leurs qualifications, ces emballages sont comestibles et peuvent être ingérés. De ce fait, ils ne doivent présenter aucune toxicité, ils nécessitent de présenter une stabilité biochimique, microbiologique et physico-chimique supérieures à celle du produit destiné à être protégé. De plus, ils doivent avoir des propriétés sensorielles favorables ou neutres vis-à-vis de l'aliment concerné. Une résistance mécanique et une efficacité barrière élevée sont également recherchées. Enfin, étant constitué de polymères naturels, d'ingrédients et d'additifs alimentaires, ils sont donc peu ou pas polluants et sont facilement dégradés. Par ailleurs, des technologies d'application ou de fabrication simples à mettre en œuvre ainsi que des matières premières de faible coût sont souhaitables (Debeaufort et al., 2002). Enfin, d'autres propriétés fonctionnelles sont également demandées (barrière aux transferts de matières, thermosoudables, pliables, imprimables, actifs, *etc.*). Les fonctions des emballages comestibles sont variées et présentées sur la **Figure I.4**. Ils peuvent être utilisés pour leurs propriétés barrières, c'est à dire leur sélectivité ou capacité à ralentir les transferts et migrations de diverses substances (eau, gaz, lipides, arômes, pigments, *etc.*), entre l'aliment et son environnement ou entre divers constituants d'un aliment hétérogène, ou au contraire faciliter la libération de molécules actives dans l'aliment, dans le but de prolonger la durée de conservation des produits alimentaires.

Ces emballages peuvent également présenter un rôle actif dans le sens où ils peuvent améliorer les qualités organoleptiques, biochimiques, hygiéniques, microbiologiques et/ou physico-chimiques des aliments ainsi emballés. Ce rôle consiste à servir de support pour des substances actives (médicaments, vitamines, antioxydants, antimicrobiens, *etc.*), des agents de surface (colorants, agents brillants, *etc.*), des arômes, ou encore à renforcer la structure de produits fragiles (Debeaufort et al., 2002).

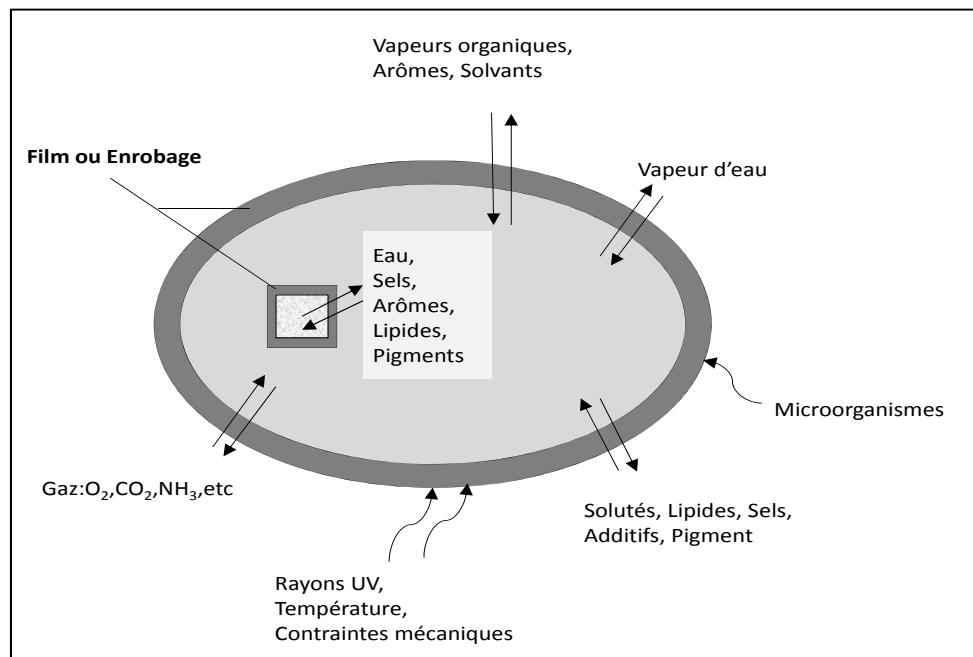


Figure I.4. Fonctions sélectives des films et enrobages comestibles (d'après Debeaufort et al., 1998).

I.1.4. Application des films et enrobages comestibles

Des nombreuses applications des films et enrobages comestibles mettent à profit leurs propriétés barrières spécifiques (Krochta, 1992). Par exemple, des films ou des enrobages avec des bonnes propriétés barrières à la vapeur d'eau peuvent être utilisés pour limiter la dessiccation superficielle d'aliments humides ou congelés, pour limiter la reprise en eau d'aliments secs ou pour limiter les transferts d'eau entre deux compartiments à différentes activités en eau dans un aliment composite (Kamper et Fennema, 1985 ; Fennema et al., 1993 ; Baker et al., 1994). Les propriétés barrières aux gaz des films et enrobages comestibles peuvent être mises à profit pour protéger des aliments sensibles à l'oxydation ou pour ralentir la respiration de fruits et légumes frais (Guilbert et Cuq, 1998 ; Barron et al., 2000). Les propriétés barrières aux composés de nature apolaire des films et enrobages à base d'hydrocolloïdes (protéines et polysaccharides) peuvent être exploitées pour limiter les transferts d'arôme ou de matières grasses au cours des opérations de transformation ou pour limiter leur diffusion à l'intérieur d'un aliment ou entre l'aliment et son environnement (Guilbert, 1986 ; Debeaufort et al., 1995). La solubilité dans l'eau ou dans les matières grasses des films et enrobages comestibles est un caractère important. Pour certaines applications, il peut être intéressant de disposer de films solubles dans l'eau ou dans l'huile pour la préparation de l'aliment. Des sachets et des capsules comestibles peuvent être utilisés pour le conditionnement de portions prédosées d'ingrédients ou d'additifs destinés à être dispersés dans des mélanges alimentaires (e.g. des agents émulsifiants pour la préparation de pâtes pâtisseries ou boulangères) ou encore de préparations déshydratées à dissolution instantanée (e.g. des sachets individuels de boissons ou de potages). Des agents de saveur, des composés antimicrobiens, des antioxydants ou des substances colorantes peuvent être incorporés dans des films appliqués à la surface des aliments afin d'obtenir

un effet fonctionnel localisé. Certaines de ces applications des films et enrobages comestibles relèvent du concept de « couches superficielles actives » introduit par Cuq et al. (1995a).

Les films et enrobages comestibles peuvent être considérés comme un des facteurs de conservation. Les couches superficielles actives contribuent directement à la préservation des aliments, par exemple en contrôlant les échanges gazeux (oxygène, dioxyde de carbone, éthylène, etc.) ou en modifiant et contrôlant les conditions à la surface des aliments (pH, rétention d'agents fonctionnels, libération contrôlée d'additifs, etc.). Les films et enrobages comestibles peuvent être considérés également comme un paramètre complémentaire et parfois irremplaçable dans la maîtrise de la qualité et de la stabilité de nombreux aliments frais, transformés ou congelés. Bien que de nombreuses fonctions des films et enrobages comestibles soient identiques à celles des emballages synthétiques conventionnels, leur utilisation implique généralement la présence d'un suremballage non comestible, notamment pour des raisons d'hygiène. La présence de films et d'enrobages comestibles peut être mise à profit pour mettre en œuvre un suremballage avec des matériaux conventionnels moins performants, moins coûteux et plus facilement recyclable (mono matériaux). Dans le **Tableau I.1** sont présentées les propriétés fonctionnelles, les qualités requises et les applications potentielles des films et enrobages comestibles.

Tableau I.1. Exemples d'applications des films et enrobages comestibles (d'après Guilbert et Cuq, 1998).

Propriétés fonctionnelles	Qualités requises	Applications
Fournir une protection contre l'humidité et/ou l'oxygène	Bonne aptitude à l'enrobage. Faibles perméabilités à l'oxygène et/ou à l'eau	Aliments frais (poisson, fromage, viande, fruits), à humidité intermédiaire, secs (noix, snacks, fruit secs) ou congelés
Limiter la dessiccation superficielle	Film humide (se déshydrate avant l'aliment)	Aliments frais ou congelés
Retarder la détérioration microbienne de surface	Incorporation d'un agent antimicrobien	Aliments humides ou à humidité intermédiaire
Maintenir les différences d' a_w , contrôler les transferts (solutés pigments, arômes) dans un aliment hétérogène	Bonnes propriétés barrières à l'eau, aux solutés et/ou aux matières grasses	Aliments hétérogènes (pizzas, pâtisseries, biscuits, confiseries), mélanges de produits secs pour apéritif, petit déjeuner, potages, aliments surgelés hétérogènes
Empêcher l'absorption de solutés ou d'huile par l'aliment	Bonnes propriétés barrières aux solutés, aux huiles	Aliments congelés saumurés (crevettes, crabes), déshydratés par osmose ou frits.
Améliorer les propriétés mécaniques et renforcer la structure de l'aliment	Bonne adhésion et cohésion.	Cacahouètes, crevettes, produits texturés, pâtisseries, aliments secs, lyophilisés, aliments en croûte et décorés
Protéger individuellement des petits morceaux d'aliments	Surface non collante. Bonnes propriétés barrières et mécaniques	Cubes de fromage, fruits secs et à humidité intermédiaire, cubes de glace
Empêcher l'agglomération de petites pièces	Surface sèche et non collante.	Cubes de fromages, fruits secs, produits frits, produits congelés

Propriétés fonctionnelles	Qualités requises	Applications
Améliorer l'aspect de surface	Lisse, brillant, homogène	Produits de boulangerie, de confiserie, fruits frais et secs, snacks
Modifier la couleur, l'arôme ou le goût de l'aliment	Support colorants, arômes. Bonnes propriétés barrières.	Applications multiples.
« Piéger » les arômes durant la fabrication et l'entreposage	Bonnes propriétés barrières	Fruits à humidité intermédiaire, aliments secs
Portions pré dosées d'ingrédients destinés à être dispersés dans des produits alimentaires	Aptitude à former une capsule soluble ou dispersible à chaud ou à froid	Additifs à finalité nutritionnelle, additifs alimentaires, concentrés de levure ou d'enzymes, sauces arômes, épices. Potages déshydratés, boissons instantanées, édulcorants, assaisonnements, préparations aromatiques

I.1.5. Performances des biopolymères en emballage

I.1.5.1. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques (TS, E, YM) des films d'emballage à base des biopolymères ont été largement étudiés (Sperling, 2006 ; Kristo et al., 2007). Toutefois, en raison des modes de fabrication de films, de la nature et concentration du plastifiant, de conditions de séchage, etc, il est difficile de comparer les résultats. Une synthèse des valeurs de TS et E des films à base de biopolymères est donnée dans le **Tableau I.2**. Pour les films à base polysaccharidiques, les valeurs TS varient entre 10 et 100 MPa, alors que les valeurs de E sont comprises entre 1 et 80 %. Les films protéiques ont des valeurs de TS plus faibles mais des valeurs de E plus élevées (Krochta, 2002) sauf pour les cas de films de gélatine et de collagène. En comparaison avec les polymères synthétiques couramment utilisés pour la préparation des films d'emballage, les valeurs de TS se rapprochent de celles des films à base de polysaccharides : 9 à 20 MPa pour le polyéthylène à faible densité (LDPE) et de 10 à 60 MPa pour le polyéthylène à haute densité (HDPE). Cependant, ces polymères synthétiques (LDPE et HDPE) ont des E plus élevées (jusqu'à 1000%), qui sont bien supérieures à celles des films protéiques et polysaccharidiques. Ainsi, il est nécessaire d'ajouter des plastifiants (glycérol) aux préparations filmogènes à base des hydrocolloïdes afin d'augmenter la déformabilité. Cependant, l'augmentation de la concentration en plastifiant peut entraîner une diminution de la résistance à la rupture (TS). Par exemple, les films de chitosan à 3 % (w/v), plastifié par le glycérol à 25% (ml/g de polymère), ont des valeurs de TS et de E respectivement de 35MPa et de 17%. Le doublement de la quantité de plastifiant engendre une augmentation de E à 76% mais une diminution de TS d'un facteur de 3 (Butler et al., 1996)

Tableau I.2. Propriétés mécaniques (conditions de mesure: ~25°C, 50% HR) de films d'emballages biodégradables et/ou comestibles (Krochta et De Mulder-Johnston, 1997 ; Embuscado et Huber, 2009).

Polymère	(TS, MPa)	(E, %)	Référence
Cellulose	44-65	10-50	Saremnezhad et al. (2011) ; Skurtys et al. (2010)
Collagène	1-70	10-70	Mark. (1999) ; Saremnezhad et al. (2011) ; Skurtys et al. (2010)
Chitosan	10-100	20-80	Lazaridou et Biliaderis. (2002) ; Saremnezhad et al. (2011) ; Skurtys et al. (2010)
Gélatine type A	25-85	7-22	Mark. (1999)
Gélatine type B	28-140	7-12	Mark. (1999)
Amidon	35-46	1,7-3,4	Mark. (1999) ; Saremnezhad et al. (2011) ; Skurtys et al.(2010)
protéine de soja	3,7-4,5	152-160	Saremnezhad et al. (2011) ; Skurtys et al. (2010)
protéine de lactosérum	2,5-3	15-18	Saremnezhad et al. (2011) ; Skurtys et al.(2010)
LDPE	9-20	100-1200	Mark. (1999)
HDPE	10-60	400-1800	Mark. (1999)
Zéine	3-4	50-120	Wang et Padua. (2003)

I.1.5.2. Propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène

Quand un film comestible est appliqué sur l'aliment, la concentration du gaz à la surface peut varier pendant le stockage. La composition chimique de l'aliment, au contact de l'emballage et dans l'espace de tête, évolue principalement à cause du métabolisme des aliments, de la respiration microbienne, de la solubilité et la perméabilité aux gaz du film comestible. L'aliment et le métabolisme microbien sont responsables de la consommation d'oxygène et la production de CO₂. L'activité microbienne peut affecter teneur en l'oxygène et en CO₂, mais cela sera significatif qu'à la fin de la date limite de consommation où la détérioration de l'aliment sera évidente (Embuscado et Huber, 2009). Par conséquent, l'efficacité d'un film ou enrobage comestible dépend fortement de ses propriétés barrières aux gaz, à la vapeur d'eau et aux arômes, et ces mesures sont dépendantes à leurs tours de la composition chimique et de la structure des biopolymères. Les valeurs de la perméabilité à la vapeur d'eau et à l'oxygène films à base de biopolymères sont présentées dans le

Tableau I.3.

Tableau I.3. Propriétés barrières des emballages biodégradables et comestibles (Krochta et De Mulder-Johnston, 1997 ; Embuscado et Huber, 2009) et de quelques films synthétiques plastiques (Hashmi, 2014)

Matériaux	WVP (10^{-11} g/m.s.Pa) ~38°C,90/0%HR	PO ₂ (10^{-17} g/m.s.Pa) ~25°C, 0-50%HR
Films biodégradables		
Cellophane	8,4	1,5-15
PLA	0,01-0,1	160-1600
Films comestibles		
Méthylcellulose	8,7	15-150
Hhydroxy-propyl-méthyl cellulose	19	15-150
Amidon	17,5-25,7	15-150
Collagène	10-110	0,01-0,1
Gélatine	16	1,5-15
Chitosan (2%)	3,6-4,9	15-150
Zéine	53-89	15-150
Gluten	0,1-10	1.5-15
protéine de lactosérum	71	1,5-15
Films synthétiques		
Polyéthylène haute densité PEHD	0,02	4
Polyéthylène basse densité PEBD	0,09	14,3
Ethylène vinyl alcool EVOH	0,034	0,2
Polyéthylène téréphtalate PET	0,28	0,08

Etude bibliographique. Chapitre I

Les films plastiques (HDPE, LDPE, EVOH, PET,...) ont des propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène beaucoup plus performantes que les films à base de biopolymères naturels. Les films à base des protéines (gluten, gélatine, collagène, protéine de lactosérum) ont de meilleures propriétés barrières aux gaz que les films à base de polysaccharides (MC, HPMC, amidon) (Gontard et al., 1996 ; Park, 1999). Ceci est dû à la structure compacte de protéines qui couvre une large gamme de propriétés fonctionnelles potentielles, essentiellement liées au nombre de liaisons intermoléculaires mise en jeu. Pour les propriétés barrières à la vapeur d'eau, les films à base de hydrocolloïdes sont connues pour leur sensibilité à l'humidité par rapport aux films synthétiques ou issus de polyester biodégradable (tel que le PLA). Les films à base de protéines sont souvent les plus perméables à la vapeur d'eau (Cuq et al., 1995b).

I.1.5.3. Propriétés de surface des films comestibles

Les propriétés de surface (angle de contact et flux d'absorption de l'eau, et tension de surface) de quelques films biosourcés sont représentées dans le **Tableau I.4**.

Tableau I.4. Propriétés de surface des films d'emballages biodégradables et comestibles.

Films	Angle de contact (θ° , 0s)	$F_{\text{absorption}}$ ($10^{-6} \text{ kg/m}^2 \cdot \text{s}$)	Tension de surface (mN/m)	References
Polyéthylène basse densité	105			Phan et al. (2005)
Hydroxy-propyl-méthyl cellulose	65			Phan et al. (2005)
Alginate	85			Hambleton et al. (2009)
Agar	92			Phan et al. (2005)
Iota carraghénanes	96	12		Fabra et al. (2012)
Chitosan	90			Ma et al. (2013)
Gélatine	66			Chen et al. (2008)
Protéines de soja	28	5,9		Kokoszka et al. (2010b)
Protéines de lactosérum	32 et 58	1,34	55	Kokoszka et al. (2010a) et Osés et al. (2009)
Gluten	57			Marcuzzo et al. (2010)
Caséine	51			Phan et al. (2008)
Isolats protéique de haricots secs	52			Ma et al. (2013)
Gomme mesquite			60	Osés et al. (2009)

Les films à base de polyéthylènes ont des angles de contact très élevés suivis par celles à base de polysaccharides qui ont un caractère plus hydrophile. Les films à base des protéines sont les plus hygroscopiques, donc fortement « mouillables ». Ceci est corrélé aussi aux faibles propriétés barrière à la vapeur d'eau observées pour ces films. Fan et al. (2014) ont montré une augmentation de l'angle de contact des films à base de protéines d'haricot après enrichissement avec du chitosan. D'autres auteurs ont montré aussi le caractère très hygroscopiques des films à base des protéines (soja et lactosérum), et ont rapporté que l'ajout d'un polysaccharide comme le chitosan peut remédier à ce problème (Ferreira et al., 2009 ; Silva et al., 2007). L'ajout de chitosan augmente l'angle de contact des films de gélatine comme l'ont montré Chen et al.(2008). Cependant, très peu de données sont disponibles dans la littérature sur les films à base de biopolymères, en particulier sur les flux d'absorption et la tension de surface.

I.1.5.4. Propriétés thermiques des films comestibles

La température de transition vitreuse (T_g) est très dépendante de la composition et de la teneur en eau de films, elle donne une idée sur la stabilité thermique des films. La calorimétrie différentielle à balayage est l'une des techniques les plus efficaces pour la détermination de la T_g . La température de transition vitreuse dépend aussi de la teneur en plastifiant et surtout de l'eau. Ce dernier diminue les forces intermoléculaires entre les chaînes des biopolymères, et par conséquent, diminue la T_g . Les valeurs de T_g des films sans plastifiant sont plus élevées que celles dans des films plastifiés. Des observations similaires ont été rapportées dans le cas des films polysaccharidiques (Debeaufort et Voilley, 1997) ou protéiques (Sobral et al., 2001). La structure compacte des films à base des protéines, induit une augmentation de la température de transition vitreuse des films protéiques (gluten, gélatine) par rapport à celle des films polysaccharidiques (amidon, pectine,...). Les températures de transition vitreuse de quelques films comestibles sont regroupées dans le tableau suivant (**Tableau I.5**).

Tableau I.5. Températures de transition vitreuse de quelques films comestibles

Films	T_g (°C)	Références
Amidon	48	Mali et al.(2002)
Gluten plastifié par le glycérol	68	Pommet et al. (2005)
Gélatine plastifié par le sorbitol	56,5	Sobral et al.(2001)
protéine de lactosérum plastifié par le glycérol	60	Su et al.(2010)
Chitosan (selon la teneur en eau et le degré d'acétylation)	-23 au 67	Neto et al.(2005)
Pectine	35	Iijimaa et al.(2000)
Méthylcellulose	102	Yoo et al.(2011)
Hydroxy-propyl-méthyl cellulose	99	Yoo et al.(2011)
Alginate de sodium	71	Yoo et al.(2011)

I.1.6. Fabrication des films d'emballage comestibles et biodégradables

Plusieurs procédés peuvent être mis en œuvre pour la fabrication des films et enrobages comestibles: l'extrusion pour les matériaux thermoplastiques (voie sèche), la fusion pour les lipides et l'étalement-séchage en couche mince (méthode « casting » ou voie humide) pour les hydrocolloïdes (Guilbert et Cuq, 1998).

I.1.6.1. Voie humide

Pour les films et enrobages comestibles à base d'hydrocolloïdes, les procédés de fabrication utilisés, souvent regroupés sous le terme de voie humide, incluent:

- La coacervation simple, où un hydrocolloïde en dispersion aqueuse est précipité ou subit un changement de phase par évaporation du solvant, par une modification du pH, par un changement de la température ou encore par modification de la force ionique.
- La coacervation complexe, où deux solutions d'hydrocolloïdes de charge opposée sont combinées en provoquant l'interaction et la précipitation du complexe de polymères (e.g. l'association des protéines avec du chitosan).
- La gélification ou la coagulation thermique, pour lesquelles le chauffage de la macromolécule entraîne sa dénaturation suivie d'une gélification (e.g. l'ovalbumine) ou d'une précipitation, ou encore le refroidissement d'une dispersion chaude d'hydrocolloïde provoque une transition sol-gel (la gélatine).

Les propriétés fonctionnelles des films et enrobages formés par « voie solvant » sont dépendantes des conditions de fabrication: concentration en molécules, pH de la solution, choix des additifs, polarité du solvant, vitesse, température et HR du séchage de la solution filmogène (Gontard et al., 1992; Gennadios et al.,1993).

La fabrication des films et enrobages par « voie solvant » implique l'étalement en couche mince de la solution ou dispersion filmogène sur un support, suivi d'une étape d'élimination du solvant et de décollement. C'est pourquoi, cette voie est également dénommée «casting» ou «coulée continue» (Guilbet et Cuq, 1998). Cette technique est le principal procédé appliqué pour la fabrication des films et enrobages à base de polysaccharides et de protéines. Cette technologie, parfaitement maîtrisée à l'échelle du laboratoire, a été très largement utilisée pour étudier les propriétés filmogènes de nombreuses matières premières protéiques et polysaccharidiques, mais aussi lipidiques.

I.1.6.2. Voie sèche

Le caractère thermoplastique des matériaux filmogènes amorphes ou le caractère fusible des composés cristallins ou semi cristallins a été mis à profit pour la fabrication de films ou d'enrobages par « fusion thermoplastique ». La mise en forme de ces matériaux par des procédés thermiques ou thermomécaniques dans des conditions de faible hydratation est basée sur des transitions de structure des matériaux filmogènes: la fusion des lipides et des sucres, des zones cristallines des polysaccharides, la transition vitreuse des zones amorphes des protéines et des polysaccharides. Au cours de la transformation par «fusion thermoplastique» le matériau devient malléable et peut être mis en forme dans des conditions de faible hydratation.

I.1.7. Paramètres influençant les propriétés fonctionnelles des films comestibles

I.1.7.1. Influence du plastifiant

Afin de préserver les propriétés barrières des films et enrobages comestibles, leur résistance mécanique et leur déformabilité sont nécessaires et recherchées. En effet, les enrobages doivent supporter des contraintes mécaniques d'origines diverses: manipulation, transport, gonflement du produit sur lequel ils sont déposés, etc. C'est pourquoi il est généralement préférable d'avoir un emballage déformable plutôt que très rigide qui est donc cassant. Pour cela, il est généralement nécessaire d'ajouter des plastifiants dans leur formulation, en particulier dans les films à base de protéines, et de façon moindre pour les films polysaccharidiques. Un plastifiant est une petite molécule peu volatile dont l'addition entraîne une diminution des forces intermoléculaires et une augmentation de volume libre et de la mobilité des chaînes. Ils modifient les propriétés fonctionnelles des films avec en général une diminution de la résistance, de la rigidité et des propriétés barrière, et une augmentation de la flexibilité et de l'élongation maximale. Différentes études ont montré que les films protéiques sont beaucoup plus sensibles aux plastifiants que les films polysaccharidiques (Gennadios et al., 1994 ; Cuq et al., 1996 ; Debeaufort et al., 1994). Les plastifiants sont des additifs utilisés pour améliorer la flexibilité ou la plasticité des polymères et, occasionnellement, ils sont utilisés pour faciliter le processus de la mise en forme d'un polymère (Daniel, 1989).

Certaines théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes de l'action des plastifiants (Verrier, 2005):

1. La théorie de la lubrification: postule que le plastifiant, par insertion entre deux chaînes de polymères, réduit les interactions intermoléculaires.
2. La théorie de gels: postule que le plastifiant, dans un réseau provenant d'une structure tridimensionnelle rigide, brise un certain nombre d'interactions intermoléculaires en masquant les centres de forces attractives et en solvatant partiellement les chaînes de polymères en ces points (**Figure I.5**).

Cao et al.(2009) ont montré que l'ajout de polyéthylène glycol, utilisé comme plastifiant, aux films de gélatine diminue d'une façon significative TS, YM et WVP, et inversement augmente la déformation de films (E). L'effet de ce plastifiant est plus prononcé avec l'augmentation de son poids moléculaire. En effet les groupements polaires (-OH) le long des chaînes de plastifiants établissent des liaisons de type hydrogène avec le polymère, diminuant ainsi les interactions polymère-polymère, donnant un film moins rigide mais plus déformable et perméable. Par ailleurs, Kołodziejska et Piotrowska.(2007) ont rapporté une augmentation de 20% et de 35% de la perméabilité à la vapeur d'eau des films chitosan-gélatine, respectivement après ajout de glycérol à 20 et à 30% (w/w). Dans la même étude TS diminue de 35,3 à 13,4 MPa, contrairement à E qui augmente de 2,4 à 20%, après incorporation de glycérol à un taux de 20% (w/w).

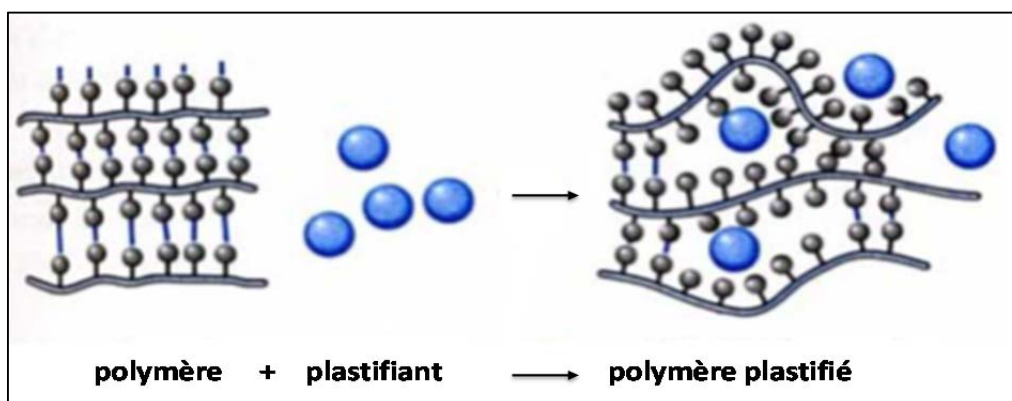


Figure I.5. Schématisation du mécanisme de plastification à l'échelle moléculaire (d'après Trotignon et al., 1996)

I.1.7.2. Influence de la concentration en eau et du gradient d'humidité relative

L'augmentation du différentiel d'humidité relative engendre une augmentation de la perméabilité à la vapeur d'eau. De plus, pour un différentiel d'humidité relative constant, l'augmentation de la valeur moyenne de l' A_w induit une augmentation de la perméabilité à la vapeur d'eau (Koelsch et Labuza, 1992; Gontard et al., 1993; Fennema et al., 1994).

Pour les films hydrophiles tel que les films à base d'hydrocolloïdes, la perméabilité à la vapeur d'eau dépend de la différence d'humidité relative et de l'humidité absolue (Han, 2005). Benbettaieb et al. (2014) ont étudié l'effet de la variation de gradient d'humidité relative (30-75, 30-84 et 30-100%) sur la perméabilité à la vapeur d'eau de film mélange chitosan-gélatine. Ils ont montré que pour une même épaisseur de film, la perméabilité augmente linéairement avec le gradient d'humidité. Elle augmente de 14 % lorsque le gradient varie de 30-75 à 30-84, et de 58% lorsqu'il passe à 30-100%. À une valeur importante d'humidité relative, la teneur en eau dans le film augmente et le film sera plus plastifié par l'eau. Donc les mobilités des chaînes augmentent, et par conséquent la diffusivité de l'eau augmente. Kokoszka et al. (2010a et 2010b) ont montré aussi que la plastification du réseau protéique avec l'eau influe sur le transport de la vapeur d'eau à travers les films et ce transfert est plus prononcé quand le gradient d'humidité relative est important. Des résultats similaires ont été démontrés par Talija et al. (2008) et Phan et al. (2009b) sur des films à base de polysaccharides. Ces auteurs ont montré que les propriétés barrière à l'eau sont largement influencées par le gradient d'humidité relative environnant.

I.1.7.3. Influence de l'épaisseur des films

De nombreux auteurs ont observé une diminution exponentielle du coefficient de transfert d'eau lorsque l'épaisseur augmente, ce qui se traduit par une perméabilité apparente d'autant plus élevée que l'épaisseur est faible (Debeaufort et al., 1993; Cuq et al., 1996; Quezada-gallo, 1999). Ce phénomène est beaucoup plus marqué pour les enrobages hydrophiles. Il existe cependant une valeur critique de l'épaisseur au-delà de laquelle le flux de vapeur d'eau diminue linéairement lorsque l'épaisseur augmente. Cette valeur est de l'ordre 30 à 60 μm pour les films à base de polysaccharides (dérivés de cellulose) ou de protéines (caséines, protéines myofibrillaires de poisson).

Benbettaieb et al.(2014) ont montré que la perméabilité à la vapeur d'eau d'un film mélange chitosan-gélatine (25%-75%) (w/w) augmente linéairement avec l'épaisseur (52 à 152 μ m). Le chitosan et la gélatine étant des polymères hygroscopiques, ils absorbent de l'eau et gonflent. Ce gonflement augmente avec l'épaisseur. Morillon et al. (2002) et Bertuzzi et al.(2007) ont attribué l'augmentation de la perméabilité avec l'épaisseur à une plastification des films et un gonflement proportionnel ou non avec l'épaisseur. McHugh et al.(1993) ont montré que la valeur de la WVP d'un film de caséinate de sodium a été doublée après une augmentation de l'épaisseur de 71 à 81 μ m. Cuq et al. (1996) ont établi une relation linéaire entre l'épaisseur des films à base des protéines myofibrillaires et la WVP, cette relation est $WVP = (3,08 \times \text{épaisseur}) \cdot 10^{-8} + 7,94$.

Park et Chinnan.(1990) ont établi une relation linéaire entre la perméabilité aux gaz et l'épaisseur de films à base de protéines (farine du gluten, zéine). Ils ont montré que la perméabilité à l'oxygène et au CO₂ diminue et la perméabilité à la vapeur d'eau augmente avec l'épaisseur. Concernant les propriétés mécaniques, Cuq et al. (1996) ont signalé que la force à la rupture des films protéiques augmente avec l'épaisseur du film, ces auteurs ont trouvé une relation linéaire entre la force à la rupture et l'épaisseur du film ($TS=7,69 \times \text{épaisseur} \cdot 10^{-4} + 1,07$), avec un coefficient de régression R^2 de 0,93. Pour un réseau macromoléculaire donné, cette augmentation de la force à la rupture peut être interprétée comme une augmentation du nombre de chaînes de protéines par unité de surface, conduisant donc à une augmentation potentiels du nombre d'interactions intermoléculaires. De leurs parts, Mahmoud et Savello. (1992) ont montré que la force à la rupture des films à base de protéines de lactosérum a été liée à la fois à l'épaisseur du film et à la teneur en plastifiant. Contrairement à la force à la rupture, l'augmentation de l'épaisseur n'entraîne pas des modifications importantes sur l'allongement à la rupture et sur le module d'élasticité.

I.2. Valorisation des polysaccharides issus des industries des produits de la mer (cas du chitosan) pour des applications en emballage

I.2.1. La chitine

La chitine est le deuxième biopolymère naturel le plus répandu dans la nature, après la cellulose. Dans le règne animal, la chitine est un élément structurel important des téguments de certains invertébrés; elle n'existe que sous la forme de complexes avec des protéines et des minéraux. Elle est présentée principalement dans les coquilles de mollusques, dans les cuticules des insectes et dans la carapace des crustacés (Bourtoom, 2008). La chitine associée à des protéines contribue à la cohésion des différentes couches qui constituent la coquille des mollusques ou la carapace des arthropodes. Dans le règne végétal, la chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues vertes. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique. La chitine est présente aussi dans certaines levures et bactéries.

De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (déméralisation), les protéines (déprotéinisation) et la couleur (blanchiment) (**Figure I.6**).

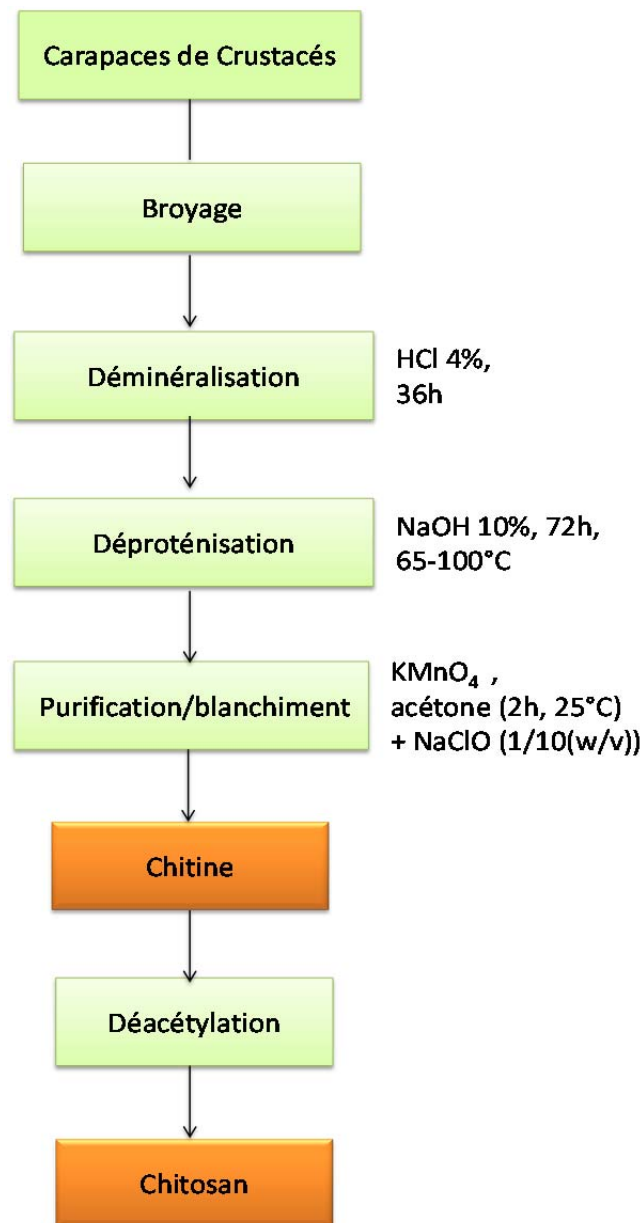


Figure I.6. Procédé de la fabrication de chitine et chitosan (D'après Suyatma, 2006, Islam et al, 2011, Al Sagheer et al, 2009, Mirzadeh et al, 2002)

I.2.2. Le chitosan

Contrairement à la chitine, le chitosan est peu répandu dans la nature. Il se trouve dans certains champignons, les zygomycètes, et dans la paroi abdominale des reines de termites. Le chitosan est donc obtenu par N-désacétylation partielle de la molécule de chitine (Vásconez et al., 2009). Leur structure chimique, représentée sur la **Figure I.7**, résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine liées en $\beta,(1\rightarrow4)$. Les structures de la chitine et du chitosan diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C-2 : acétamide pour la chitine et amine pour le chitosan. La chitine est caractérisée par la fraction de groupements N-acétamide

Etude bibliographique. Chapitre I

résiduels appelée degré d'acétylation (DA). Le terme « chitosan » est donc habituellement limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée pour être soluble en milieu acide dilué. D'ordre général, nous appellerons chitosan tout échantillon avec des degrés d'acétylation résiduels (DA) $\leq 30\%$ (Seng, 1988).

Le chitosan a trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6 respectivement. Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosan, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Rinaudo, 2006).

Le degré de désacétylation (DD) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques. Dans le cas du chitosan, le DD est supérieur à 70% pour les produits commerciaux. Cette valeur détermine également la limite de solubilité de ce polymère dans les solutions acides diluées ($2 < \text{pH} < 6$). Le DD est un paramètre structural qui influence les propriétés physico-chimiques telles que la solubilité, la charge globale et la réactivité ; les propriétés biologiques comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'activité biostimulante et anticholestérolémiante (Chatelet et al., 2001). Le DD a une influence aussi sur les propriétés filmogènes du chitosan, donc sur les propriétés mécaniques et barrière des films.

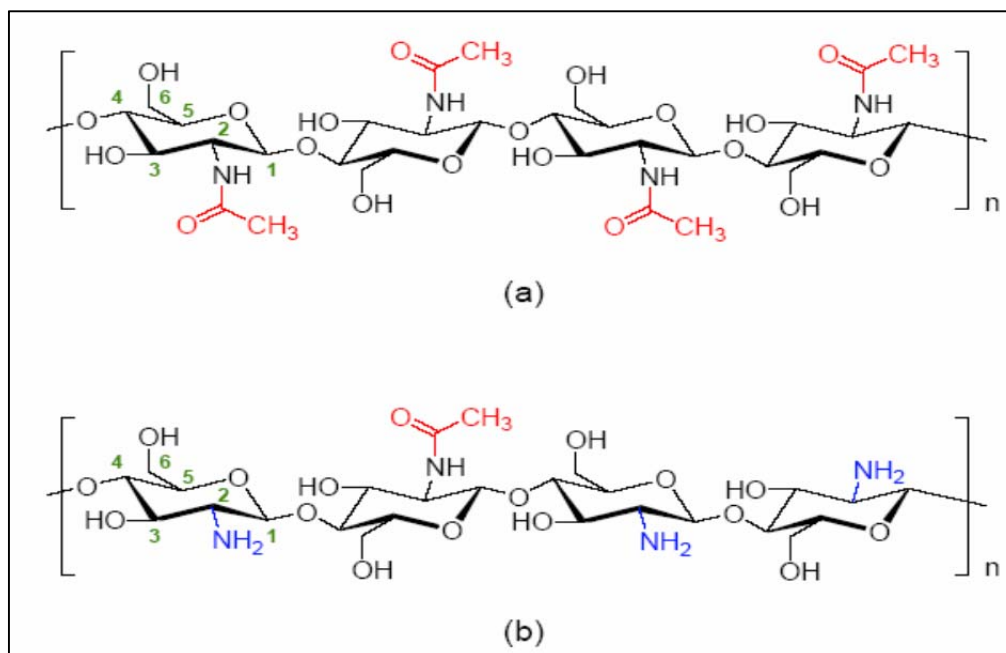


Figure 1.7. Comparaison des structures de la chitine (a) et du chitosan (b)

Si l'extraction de la chitine est aujourd'hui facilement réalisable, l'étape la plus délicate reste la désacétylation qui nécessite de substituer suffisamment de groupements acétyle pour aboutir au chitosan, ce qui peut entraîner une réduction excessive de longueur des chaînes du polymère. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur l'élévation de température, il est donc possible d'obtenir différents chitosans à partir d'une même chitine. Un DA inférieur à 10 % est rarement

atteint par un procédé simple, la désacétylation totale nécessite plusieurs étapes. L'échantillon étant soit lavé, soit dissous et re-précipité entre deux cycles.

La désacétylation est généralement effectuée par traitement avec de l'hydroxyde de sodium ou de potassium concentré (40-50 %) à une température ≥ 100 °C, pendant au moins 30 minutes pour enlever certains ou tous les groupements acétyle de la chitine (Rinaudo, 2006).

Le chitosan est aussi présent dans la nature au niveau des parois cellulaires de certaines souches fongiques, surtout les zygomycètes (Rhazi et al., 2000).

I.2.3. Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosan

Le paramètre **degré de désacétylation** (DD) est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution (Rinaudo, 2006) à savoir: la solubilité du chitosan, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère, et donc la viscosité des solutions.

La seconde caractéristique importante est la **masse moléculaire** (MM), en masse ou en nombre, ou mieux encore la distribution des masses moléculaires (Crini et al., 2009). La valeur de la masse moléculaire d'un chitosan dépend fortement du procédé de fabrication car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production. Les chaînes de chitosan ont des masses très variées, entre 100 et 1000 kDa selon les applications visées. (Jacquot, 2006). La MM affecte la solubilité du chitosan et ses propriétés rhéologiques notamment sa viscosité. Ainsi, en augmentant la masse moléculaire du chitosan, on augmente sa viscosité et on diminue sa solubilité. Elle peut aussi influencer significativement sur les propriétés du polymère en solution, comme le paramètre DD. La MM influe largement sur les propriétés physicochimiques des films surtout les propriétés mécaniques (Chen et Zhao, 2012).

Les chitines rencontrées dans le milieu naturel diffèrent non seulement par leur MM et leur DD, mais également par leur **état cristallin**. La cristallinité est un paramètre qui contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés de transfert. Le chitosan est une substance (semi)-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus: le chitosan I (faible DD, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosan II (fort DD, forme amine libre). Rinaudo. (2006) a montré que la cristallinité du chitosan augmente avec le degré de désacétylation.

La chitine est une substance inerte comme la cellulose, **insoluble dans l'eau**, et également dans la plupart des solvants. Les acides concentrés la dégradent. Par chauffage, la chitine se décompose vers 250°C sans fondre. Elle est soluble dans un mélange diméthylacétamide/chlorure de lithium. En revanche, sa désacétylation (DD) partielle en milieu basique permet d'obtenir le chitosan qui, lui, est **soluble en milieux aqueux acide** grâce à la protonation de ses fonctions amines.

L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosan est l'acide acétique dilué. En général, le chitosan est parfaitement soluble à pH 3-4. Il est également soluble dans des solutions diluées (0,1-1%) d'acides nitrique et chlorhydrique. En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosan se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Ses

propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosan est solubilisé et il devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosan soit 6,3 (Hosseini et al., 2013). A un pH supérieur (>6,5), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosan se précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère.

Le chitosan est un matériau **non poreux** ayant des **surfaces spécifiques** de l'ordre de quelques m²/g à quelques centaines de m²/g sous des formes physiquement modifiées (Guilbal et Vincent, 2007). C'est un matériau très stable en phase solide (sèche) et il a une conservation quasi infinie. En solution, il est relativement fragile et dégradable. Il possède un degré de réactivité chimique élevé dû à sa fonction amine primaire libre qui lui confère une forte densité de charges positives (transformation de NH₂ en NH₃⁺ en milieu acide). De plus, la présence de la fonction amine, le long de la chaîne macromoléculaire, permet comparativement à la cellulose, de réaliser des réactions chimiques spécifiques de cette fonction telle que la N-acylation ou N-carboxylation. Une autre propriété intéressante du chitosan (et également de la chitine), concerne son aptitude à interagir avec d'autres substances chimiques (ions, molécules, macromolécules) grâce à une structure chimique particulière qui permet d'entrevoir des capacités à interagir, complexer ou absorber (Rinaudo, 2006). Ce comportement est essentiellement attribué:

- aux propriétés hydrophiles des chaînes macromoléculaires dues à la présence de nombreux groupements hydroxyles au niveau des unités glucose (possibilité de ponts hydrogène et de liaisons intra et/ou inter-macromoléculaires),
- à la présence de plusieurs groupes fonctionnels (hydroxyle, acétamide et amine) et à leur grande réactivité,
- et à la structure flexible des chaînes de polymères qui pourra être modulée en fonction du pH et de la température.

Le chitosan montre de plus des propriétés d'adhésion à des surfaces chargées négativement (Racuh et al., 2006). Son caractère cationique en milieu acide permet la fixation de cations comme les colorants anionique ou les anions métalliques (Gaibal et al., 2007). En plus de ces interactions, la nature des liaisons glycosidiques confère également à la chitine et au chitosan d'excellentes propriétés filmogènes.

I.2.4. Applications de la chitine et du chitosan

Les propriétés particulières du chitosan sont liées essentiellement à la présence de la fonction amine portée par le carbone 2. Elles sont de deux types:

- à pH acide, où il est soluble, le chitosan porte de nombreuses charges positives. Il est donc un bon agent de floculation et un bon agent de coagulation. Il peut interagir avec des molécules chargées négativement (par exemple acides gras, protéines ...) et former ainsi des complexes polyanion-polycation (Ma et al., 2013).
- à pH plus élevé (> 6,5), le chitosan perd ses charges positives, le doublet électronique de l'azote est libre. Ces doublets libres et la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosan lui permettent de se comporter comme un excellent complexant, par exemple des métaux lourds.

La chitine est hydrolysée par le lysozyme ce qui n'est pas le cas du chitosan, celui-ci peut alors transiter sans être absorbé dans tout l'appareil digestif et conserver son activité hypocholestérolémiante (Muzzarelli, 1996). Le chitosan et la chitine ont montré une résistance à certains parasites, bactéries, virus ou mycoses. Ils entraînent une activation des polynucléaires et des macrophages, qui jouent un rôle important dans le mécanisme de défense de l'organisme. Dans le domaine des cosmétiques, les propriétés filmogènes et cationiques du chitosan sont exploitées dans de nombreuses crèmes ou lotions de soin pour les cheveux ou la peau (Lang et Clausen, 1989).

I.2.5. Application du chitosan en tant que film d'emballage comestible et enrobage

L'application du chitosan, comme emballage alimentaire, est très prometteuse à cause de sa non-toxicité, biocompatibilité et biodégradabilité. Le chitosan, possède aussi une activité antimicrobienne intrinsèque, inhibant la croissance d'une grande variété de bactéries (Shahidi et al., 1999), des activités bactériostatiques (Möller et al., 2004), et des activités fongostatiques (Roller et Covill, 1999). En outre, le chitosan est un excellent candidat pour la fabrication de film comestible. Le chitosan forme des films transparents et permet d'augmenter la durée de conservation de certains produits alimentaires (Aider, 2010). Agullo et al. (2003) ont étudié l'effet antimicrobien d'un film comestible de chitosan pour la conservation de pizza prêt à consommer. Ils ont démontré que le chitosan retardait la croissance de microorganismes (*Alternaria sp*, *Penicillium sp* et *Cladosporium sp*) responsables d'altérations de ce type de produit. Ainsi, Savage et al. (1994) ont rapporté que l'enrobage du chitosan peut réduire la putréfaction des pommes au-delà de 12 semaines. Une étude sur l'enrobage de chitosan pour inhiber le *Sclerotinia* dans les carottes (Cheah, 1997) a montré que la putréfaction est clairement réduite de 88% à 28% par l'enrobage de chitosan de concentration 2-4 % (w/v). Il a été démontré que le chitosan pouvait réduire le taux d'incorporation des additifs chimiques dans les produits alimentaires de manière très significative. Roller et al. (2002) ont montré qu'une combinaison entre le chitosan et des faibles doses de sulfites (170ppm) a permis de retarder significativement la croissance microbienne (3-4 log cfu/g) dans des saucisses comparativement à une concentration élevée (340ppm) de sulfites en absence du chitosan. La perméabilité sélective au CO₂ et à l'oxygène a été exploitée par plusieurs chercheurs pour des applications post récoltes. En effet, Bai et coll.(1988) ont ainsi créés une atmosphère modifiée l'intérieur du produit enrobé pour prolonger la durée de conservation en favorisant la rétention du CO₂ plutôt que l'O₂. Par exemple, des morceaux de pommes enrobés par du chitosan ont un taux de brunissement enzymatique et une perte d'eau abaissés (Pennisi, 1992). La même observation a été faite avec des concombres, des fraises, des poivrons (El Ghaouth, 1992), de plus, la croissance fongique a été réduite de même. Jiang et Li. (2001) ont montré que l'enrobage semi-perméable permet de retarder le vieillissement, le taux de respiration et la perte du poids.

I.2.6. Application du chitosan en tant qu'agent d'encapsulation des molécules actives

I.2.6.1. Domaines pharmaceutique et médical

Récemment, l'utilisation de vecteurs colloïdaux fabriqués à partir de polysaccharides hydrophiles comme le chitosan s'est imposée comme une alternative prometteuse pour améliorer le transport de molécules à travers les membranes biologiques. En étudiant les systèmes de relargage contrôlé à base de chitosan, des chercheurs ont prouvé qu'en plus de sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa faible toxicité, le chitosan excellait à améliorer le transport de produits actifs à travers les membranes cellulaires. Dans ce contexte, le chitosan a été utilisé pour la préparation de microcapsules et de microsphères encapsulées avec des protéines, des enzymes, l'ADN et des cellules, en tant que système de libération nasale de l'insuline (Aspeden et al., 1997), en tant que système pour la vaccination orale (Carreno-Gomez et Duncan, 1997) et en tant que constituant de stabilisation de liposomes (Takeuchi et al., 1996). Sezer and Akbuga.(1999) ont démontré que l'application de chitosan pour la libération contrôlée des maléate de timolol (MW=432.49) encapsulé dans des microsphères formés par gélification ionotropique est bien supérieure à celle de l'alginate. La cinétique de libération de ce médicament est par conséquent beaucoup plus contrôlée en présence de chitosan. La rapide absorption d'eau et le fort degré de gonflement en milieu aqueux constituent deux inconvénients majeurs pour la préparation de systèmes de relargage contrôlé à base de chitosan. Ce gonflement se traduit par un relargage rapide des médicaments, incompatible avec les objectifs thérapeutiques envisagés. Ces problèmes disparaissent lorsqu'on utilise du chitosan greffé. Kumbar et al. (2003) ont préparé des microsphères réticulées de chitosan avec du glutaraldéhyde greffé de poly (acrylamide) et utilisé pour encapsuler l'indométacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé dans le traitement de l'arthrite. Jayakumar et al.(2007) ont synthétisé des billes de chitosan thiolé pour être utilisées comme vecteur de médicaments sensibles au pH pour un relargage ciblé et afin d'éviter la forte acidité que l'on peut rencontrer dans l'estomac. Yenilmez et al.(2011) ont quant à eux étudié la libération *in vivo* et *in vitro* de la vitamine E incorporée dans des microsphères de chitosan pour une application topique. En utilisant la technique du séchage par atomisation-pulvérisation (spray-drying) des microparticules stables de chitosan encapsulant de la vitamine E et possédant un pouvoir antioxydant et pouvant être incorporés dans des formulations cosmétiques anti-âges ont été mises au point.

I.2.6.2. Domaine alimentaire

L'encapsulation permet la protection, le transport et la libération des composants actifs, tels que: les arômes, les vitamines, les peptides, les minéraux, les acides gras, les antioxydants, les enzymes et les cellules vivantes. Dima et al. (2013) ont montré que parmi les nombreux biopolymères utilisés en tant que matériau d'encapsulation sont le chitosan et l'alginate de sodium. En milieu acide les groupes amino du chitosan sont protonés et leurs charges positives peuvent interagir avec des poly-anions tels que l'alginate, le carraghénane, etc... pour former des complexes polyélectrolytes très utilisés en encapsulation de divers composants bioactifs. Dans une étude portant sur l'encapsulation de l'huile de coriandre dans des microsphères d'alginate /chitosan afin d'être incorporé dans la

préparation de certains produits à base de viande, Dima et al.(2013) ont montré que l'efficacité d'encapsulation de l'alginate a été nettement améliorée par ajout de chitosan. De plus, la libération de l'huile de coriandre, dans un aliment simulé à pH acide, a été d'autant retardée que la teneur en chitosan augmente. Ouattara et al. (2000) ont montré que des films antimicrobiens à base de chitosan comme matrice d'incorporation d'acides organiques et d'huiles essentielles sont efficaces pour inhiber les bactéries d'altération des viandes. L'effet antimicrobien du chitosan peut différer si ce biopolymère est utilisé seul ou en combinaison avec d'autres substances antimicrobiennes, et son effet est lié à son mode d'utilisation : ingrédient, enrobage ou film. Ye et al.(2008) ont fabriqué des films antimicrobiens enduits de chitosan et nisine pour le contrôle de bactéries pathogènes dans le saumon fumé à froid. Benabbou et al. (2008) ont montré que l'incorporation de la divergicine dans les films de chitosan augmentait significativement l'activité antimicrobienne de ce dernier contre *Listeria monocytogenes* sur du saumon fumé. Pranoto et al.(2005) ont revendiqués les films à base de chitosan en tant que supports efficaces de nombreux ingrédients fonctionnels tels que des agents antimicrobiens et des antioxydants afin d'améliorer la qualité et la stabilité de certains produits alimentaires.

Peng et Li.(2014) ont montré l'efficacité antimicrobienne des films à base de chitosan incorporant des huiles essentielles de citron, de thym ou de cannelle. Dans le même contexte, Ojagh et al. (2010) ont rapporté l'efficacité de film de chitosan en combinaison avec le Tween 80 pour encapsuler le cinnamaldehyde (cannelle) utilisé comme agent antimicrobien naturel pour limiter la croissance des bactéries Gram+ et Gram-. Dutta et al. (2009) ont prouvé l'efficacité du chitosan comme film ou enrobage pour l'encapsulation et la libération contrôlé des antioxydants et des arômes. Zhao et al.(2011) ont amélioré la stabilité des huiles du poisson riches en Oméga-3, durant le stockage et ceci en utilisant des films à base de chitosan et WPI comme système d'encapsulation et de barrière à l'oxygène.

I.2.7. Paramètres influençant les propriétés des films de chitosan

I.2.7.1.Dégrès d'acétylation et masse molaire

Chen et Hwa.(1996) ont étudié l'effet des masses molaires du chitosan (240 à 410 kg/mol) sur les propriétés mécaniques et barrières des films. Plus la masse molaire du chitosan augmente, plus la contrainte à la rupture augmente et inversement la perméabilité à la vapeur d'eau diminue. Ces résultats sont comparables à ceux de Sarasam et Madihally. (2005) qui ont comparé trois différentes gammes de masses molaires du chitosan (50-190 kg/mol ; 190-310 kg/mol ; > 310 kg/mol).

Quant au degré de désacétylation (DD) du chitosan, Wiles et al. (2000) ont étudié l'effet de trois degrés de désacétylation du chitosan (92 ; 84 ; 73 % DD) sur la perméabilité à la vapeur d'eau. Ils ont conclu qu'il n'y a pas d'effet significatif. Cependant, le DD du chitosan affecte beaucoup plus les propriétés antimicrobiennes des films de chitosan (l'activité antimicrobienne augmente avec le DD) que les propriétés mécaniques et barrière (Suyatma, 2006).

I.2.7.2. Nature de solvant

Le chitosan est soluble dans les milieux acides dilués par protonation des groupements amine. Les acides les plus fréquemment utilisés sont les acides acétique, formique, lactique, propionique et malique. Caner et al. (1998) ont étudié l'effet de plusieurs acides sur les propriétés mécaniques et barrière du chitosan. D'après le **Tableau I.6**, l'acide acétique est le meilleur solvant pour obtenir des films de chitosan ayant de bonnes propriétés mécaniques et barrière.

Tableau I.6. Effet des acides dilués (1%, v/v) sur les propriétés des films de chitosan (Caner et al., 1998)

Type d'acide	WVP (10^{-11} g/m.s.Pa)	PO2 (10^{-16} g/m.s.Pa)	E (%)	TS (MPa)
Acide Acétique	9,55	11,7	32,2	22,7
Acide Formique	12,15	12,15	27,9	22,1
Acide Lactique	10,83	7,2	28,4	18,9
Acide Propionique	9,57	18,76	24,6	8,6

Des résultats similaires ont été obtenus par Park et al. (2001) pour l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique et l'acide malique. Par contre, ils ont rapporté que l'élongation du film de chitosan obtenu avec l'acide acétique est beaucoup plus faible, 4,1 % au lieu des 32,2% obtenus par Caner et al. (1998). Néanmoins, les films obtenus avec l'acide acétique possèdent les propriétés barrières à la vapeur d'eau et la contrainte à la rupture les plus performantes. Ainsi, l'acide acétique est utilisé comme le solvant du chitosan dans la majorité des études (Butler et al., 1996; Wiles et al., 2000; Despond et al., 2001; Kam et al., 1999).

I.2.7.3. Effet du plastifiant

La plastification du chitosan n'est que peu étudiée contrairement aux films à base d'amidon ou de protéines. Néanmoins, certains auteurs ont démontré l'efficacité de quelques plastifiants pour les films de chitosan. Butler et al. (1996) ont rapporté que l'élasticité des films de chitosan plastifiés avec le glycérol diminue après 12 semaines de stockage, alors que Caner et al. (1998) ont trouvé que ceux plastifiés avec le PEG (polyéthylène glycol) sont stables jusqu'à 9 semaines.

I.2.7.4. Effet des conditions de séchage

Srinivasa et al. (2004) ont comparé différentes méthodes de séchage pour la préparation des films de chitosan: l'étuve conventionnelle (oven drying), par infrarouge à 80, 90 et 100 °C, et à l'ambiance (27°C). Les propriétés mécaniques (la contrainte à la rupture et l'élongation) des films de chitosan préparés à température ambiante sont plus performantes que celles des films préparés en étuves. Cependant, leurs propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène sont plus faibles lorsque les films sont séchés à température ambiante.

I.2.8. Limites des applications du chitosan en tant que film d'emballage

L'application du chitosan, comme emballage alimentaire, est très prometteuse grâce à de ses caractéristiques intrinsèques. Les films obtenus ont de très bonnes propriétés barrières aux gaz, mais présentent une faible barrière à la vapeur d'eau en raison de leur caractère hydrophile (Guilbert, 1986), ce qui limite leurs applications pour la conservation de certains aliments. Dans ce contexte, divers solutions ont été proposées, tel que l'ajout d'une fine couche lipidique ou d'acide gras à la surface de film afin de limiter le transfert de vapeur d'eau. Wu et al.(2002) ont montré que l'incorporation des acides gras, de l'huile de palme et d'autres composants lipidiques diminue d'une façon significative la perméabilité à la vapeur d'eau des films à base de polysaccharides (cellulose). D'autres auteurs ont travaillé sur la conception de films multicouches afin d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles. Makino et Hirata. (1997) ont rapporté qu'un film laminé à base de chitosan, cellulose et polycaprolactone pourrait être utilisé comme emballage sous atmosphère protectrice pour la conservation des produits surgelés.

L'utilisation de film composite à base de plusieurs composants filmogènes ont été mis au point afin de tirer parti des propriétés complémentaires à chacun d'entre eux et limiter leurs inconvénients propres.

Dans le mélange chitosan/polymère hydrophobe, on peut améliorer la résistance à la vapeur d'eau mais pas l'élasticité du chitosan. En mélange avec les polymères hydrophiles comme l'alcool polyvinylique (PVA) et les polyéthylènes glycols (PEG) (Park et al., 2001), l'élasticité du chitosan augmente car ils jouent le rôle de plastifiant pour le chitosan. De plus, ils diminuent la performance barrière à la vapeur d'eau. Dans le mélange avec d'autres polysaccharides, le chitosan est employé généralement pour augmenter la performance des polymères associés ou pour leur conférer des propriétés antimicrobiennes. Park et al. (2001), ont signalé l'amélioration des propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau en ajoutant des k- carragénanes à la solution filmogène de chitosan. Tang et al. (2003) et Garcia et al. (2006), ont prouvé que l'ajout d'amidon au chitosan forme un film plus résistant à la vapeur d'eau. Les mêmes résultats ont été démontrés par Möller et al. (2004) après ajout d'hydroxy-propyl-méthylcellulose (HPMC) pour un emballage antimicrobien plus résistant à l'humidité.

Suyatma et al. (2004) ont travaillé sur l'amélioration des propriétés fonctionnelles des films de chitosan en ajoutant des polymères hydrophobes (acide polylactique). Des mélanges de chitosan avec des protéines ont été également proposés (Arvanitoyannis et al., 1998 ; Jridi et al., 2014) comme moyen efficace pour augmenter la résistance mécanique et les propriétés barrières des films de chitosan (cette voie sera détaillée dans la Partie I.4).

I.3. Valorisation des protéines issues des industries des produits de la mer (cas de la gélatine) pour des applications en emballage

La gélatine est obtenue par dégradation du collagène qui est la protéine la plus répandue chez les mammifères. Le collagène est le constituant majeur des tissus conjonctifs et des matrices des os. On la retrouve également chez les poissons, les oiseaux, etc. Nous développons, dans ce qui suit, quelques notions sur les propriétés structurales du collagène avant d'exposer les caractéristiques de la gélatine.

I.3.1. Le collagène

Représentant un tiers des protéines totales chez les mammifères, le collagène est une protéine fibrillaire, son rôle est primordial dans le développement des tissus, il se présente sous la forme de fibres caractérisées par une forte résistance mécanique, protégeant ainsi les muscles contre de trop fortes tensions. La composition chimique du collagène varie avec son origine. Cependant, on retrouve chez toutes les espèces des similitudes qui expliquent sa fonction de tissu conjonctif et le maintien de sa structure tridimensionnelle. L'unité de base du collagène est le tropocollagène, triple hélice droite de 300 nm de longueur (**Figure I.8**). Le tropocollagène comprend 3 chaînes polypeptidiques α de 100 000 g.mol⁻¹, organisées en hélice avec environ 3 acides aminés par tour. Il existe plusieurs types de chaînes α différant par leur composition en acides aminés dont les combinaisons sont à l'origine des différents types de collagènes.

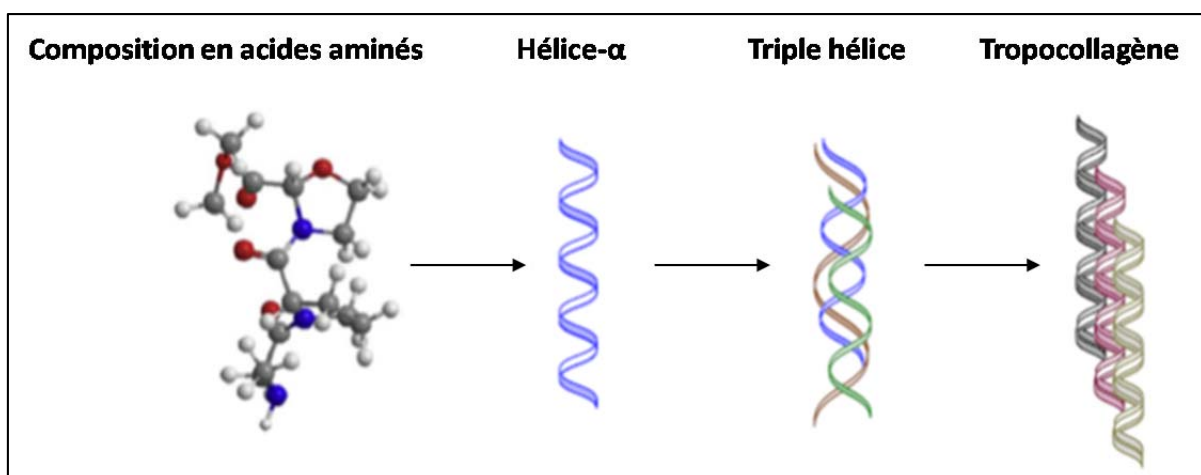


Figure I.8. La triple hélice de collagène (d'après Farris et al., 2009)

I.3.2. Du collagène à la gélatine

La conversion du collagène en gélatine se réalise en deux étapes: la solubilisation du collagène (soit en milieu acide, soit en milieu basique) et sa conversion en gélatine. Cette dernière est le résultat de la dénaturation de la structure tertiaire de la triple hélice de tropocollagène. Les chaînes se dissocient et adoptent alors une configuration pelote statistique (Jones, 1987).

La fabrication industrielle de la gélatine consiste principalement à contrôler l'hydrolyse du collagène et à convertir le produit en un matériel soluble avec des propriétés physicochimiques souhaitées, telles que la force en gel, la viscosité, le point isoélectrique, etc. Le procédé de fabrication de la gélatine est présenté dans la **Figure I.9** et comprend les étapes suivantes:

- Prétraitement

Les matières premières sont d'abord dégraissées et déminéralisées. Cette étape intervient surtout dans le cas de l'utilisation des os comme matière première. Elle concerne surtout la gélatine d'origine bovine, et parfois du porc. Les os dégraissés sont trempés dans un bain de HCl à 5% pendant plusieurs semaines afin de débarrasser de leur support minéral et de former l'osséine. Ensuite une étape de gonflement et de ramollissement des peaux et d'osséine, dans un bain d'eau chaude, est nécessaire pour toutes les origines de gélatine comme étape préparatrice pour les procédés d'extraction.

- Traitement

Il existe deux variantes majeures du prétraitement: le procédé alcalin (chaulage) et le procédé acide.

Procédé alcalin

Le tissu conjonctif des bovins étant fortement réticulé, les peaux ou os macèrent dans un lait de chaux pendant plusieurs semaines. Ce traitement permet de transformer délicatement la structure du collagène pour le rendre soluble dans l'eau chaude et pouvoir ainsi l'extraire du reste de la matière première. Les gélatines issues d'un traitement alcalin sont couramment désignées sous l'appellation « gélatine type B ». Ce procédé permet de fabriquer de la gélatine principalement utilisées dans l'industrie pharmaceutique (capsules), photographique (films) et alimentaire.

Procédé acide

Le tissu conjonctif des poissons et de la couenne de porc n'étant pas autant réticulé, un traitement d'une journée dans un bain acide est suffisant. Un lavage intensif permet ensuite de neutraliser la matière première avant d'en extraire le collagène. Les gélatines issues d'un traitement acide sont appelées « gélatine type A ».

En règle générale, la nature de la matière première du collagène (espèce animale) ainsi que les procédés de prétraitement et d'extraction, ont un effet majeur sur les propriétés physiques des films de gélatine (Gomez-Guillen et al., 2009).

- Extraction

Le produit est alors mélangé à de l'eau chaude et extrait en plusieurs étapes. La température de l'eau est un paramètre qui détermine le pouvoir gélifiant de la gélatine. Plus la température de l'eau est basse, plus la force en gel de la gélatine est élevée.

L'étape d'extraction est suivie d'une étape de filtration afin de débarrasser de toutes traces des graisses et de fibrilles. Enfin une étape de concentration et de séchage sont appliquées pour permettre la conservation de la gélatine.

Etude bibliographique. Chapitre I

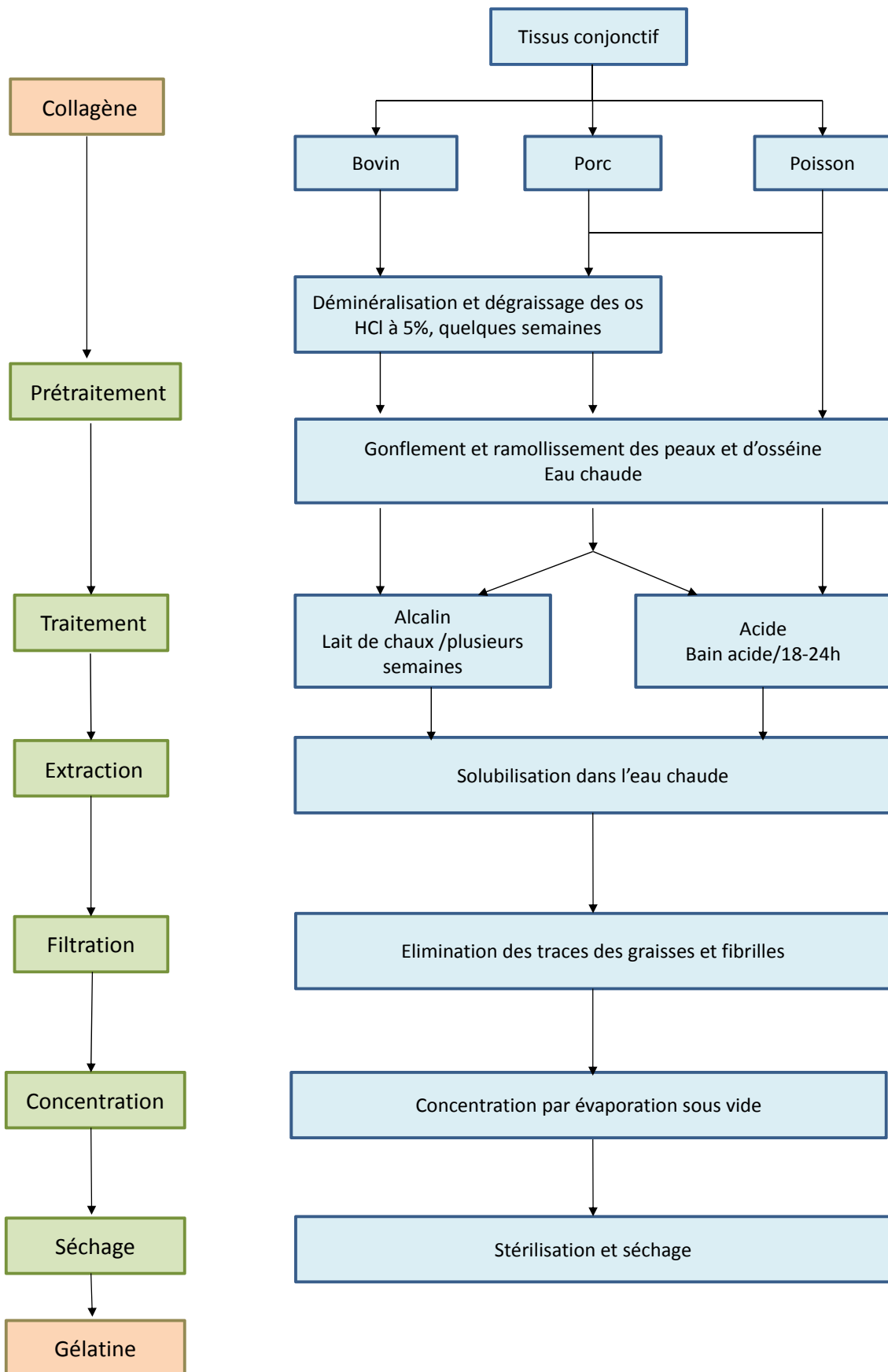


Figure I.9. Procédé de fabrication de la gélatine.

I.3.3. La gélatine

I.3.3.1. Structure et composition

I.3.3.1.1. Structure primaire

La structure primaire est semblable à celle du collagène. L'analyse de la composition en acides aminés des gélatines en fonction du prétraitement (**Tableau I.7**), montre, que le prétraitement acide modifie peu la composition en acides aminés de la gélatine alors que le prétraitement alcalin transforme les résidus asparagine et glutamine en acides aspartique et glutamique. La gélatine est composée d'acides aminés hydrophobes (proline, leucine) et hydrophiles (sérine, arginine, etc), qui lui confèrent un caractère amphiphile. La composition de la gélatine en acides aminés influe largement sur les propriétés mécaniques (TS et E) des films issus à partir ce biopolymère.

Tableau I.7. Comparaison des compositions types en acides aminés des gélatines de type A, de type B et du collagène; exprimées en résidus pour 1000 résidus d'acides aminés (Rose, 1987)

Classe d'acides aminés	Acides aminés	Gélatine type A (acide)	Gélatine type B (alcalin)	Collagène (type I)
R hydrophobe	Alanine	112	117	114
	Hydroxyproline	91	93	104
	Isoleucine	10	11	11
	Leucine	24	2,3	24
	Méthionine	3,6	3,9	5,7
	Phénylalanine	14	14	13
	proline	133	124	115
	tryptophane	-	-	-
R polaire non chargé	glycine	330	335	332
	asparagine	16	0	16
	Glutamine	25	0	25
	sérine	35	33	35
	Thréonine	18	18	17
	Cystéine	-	-	-
	Tyrosine	2,6	1,2	4,4
R chargé positivement	Arginine	49	48	51
	Histidine	4	4,2	4,4
	Hydroxylysine	6,4	4,3	5,4
	lysine	27	28	28
R chargé négativement	Acide aspartique	29	46	29
	Acide glutamique	48	72	48

I.3.3.1.2. Structure secondaire

Selon l'origine de la matière première et le type de traitement qui lui est appliqué, la dénaturation du tropocollagène en gélatine peut fournir trois types de molécules. Les chaînes α_1 et α_2 , les chaînes β qui sont issues de l'association entre une chaîne α_1 et une chaîne α_2 ; et des chaînes γ , oligomères de 3 chaînes α . Les chaînes α , β et γ se différencient par leurs masses moléculaires moyennes respectives de 100 000, 200 000 et 300 000 g.mol⁻¹. Ceci donne lieu à un mélange de fragments de différents poids moléculaires.

Dans le cas des gélatines de type B, issues d'une hydrolyse alcaline, la majeure partie des fractions est située dans la zone de 100 000 g.mol⁻¹, correspondant ainsi à une majorité de chaînes α . Dans le cas des gélatines de type A, issues de l'hydrolyse acide, la distribution en masses moléculaires est plus hétérogène. Ces différences sont plus imputables au prétraitement et à la source de collagène (Rose, 1987).

Comme la gélatine est un produit de dégradation du collagène, elle est par essence hétérogène et se compose donc d'une large gamme d'espèces moléculaires. D'une manière générale, les gélatines ont une masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) comprise entre 50 et 100 000 g.mol⁻¹, et une masse moléculaire moyenne en masse (M_w) comprise entre 100 et 1 000 000 g.mol⁻¹, avec un indice de polydispersité I_p (M_w/M_n) souvent supérieur à 2, dû à l'hétérogénéité même de la gélatine (Wiley, Gelatin Handbook).

I.3.3.2. La gélatine en solution

La gélatine se présente sous forme de grains, qui une fois mis dans l'eau se mettent à gonfler. Pour que la gélatine soit solubilisée, il est nécessaire de la chauffer à des températures supérieures à 40°C.

- Pour des températures supérieures à 40°C, la gélatine présente une structure dite désordonnée, dans laquelle on retrouve en solution, un mélange de différentes fractions α , β , γ en conformation de pelotes statiques. Le système ainsi obtenu est une solution de gélatine, on dira également que la gélatine est à l'état sol (Bigi et al., 2004).

- Si l'on refroidit la solution de gélatine, un phénomène de gélification se met alors en place qui traduit une transition conformationnelle, c'est-à-dire le passage de l'état désordonné (pelote statistique) à l'état ordonné (hélice gauche). Il peut être suivi par la mesure du pouvoir rotatoire qui détecte l'apparition ou la disparition des hélices gauches.

I.3.3.3. Propriétés technologiques et caractéristiques de la gélatine

Le comportement physicochimique de la gélatine est principalement déterminé par la séquence en acides aminés de la molécule, par sa structure spatiale, sa distribution en masses moléculaires, ainsi que par les conditions du milieu (pH, force ionique et la réaction avec d'autres composés). Les propriétés de la gélatine peuvent être divisées en deux groupes. Le premier associé aux propriétés gélifiantes de la gélatine (force en gel, viscosité, etc.) et le second plutôt lié aux propriétés de surface de la gélatine.

- Les propriétés associées à la gélification sont principalement la formation du gel, la texturation, et l'effet épaississant, sont dépendantes de la viscosité, de la structure, de la masse moléculaire et de la

température du système. Le refroidissement d'une solution de gélatine conduit à la formation d'un gel réversible, théoriquement illimité

- Les propriétés de surface sont basées sur le fait que les chaînes latérales de la gélatine, comme celles de toutes les protéines, ont des groupements chargés des acides aminés hydrophiles ou hydrophobes. Les parties hydrophiles et hydrophobes ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse. Cette propriété est utilisée dans la production et la stabilisation des mousses et émulsions.

Les différentes propriétés technologiques de la gélatine dépendent fortement de type de gélatine et du procédé d'extraction. Le **Tableau I.8**, présente quelques propriétés physiques en fonction de l'origine de la gélatine.

Tableau I.8. Propriétés physiques de la gélatine en fonction de l'origine.

	Bovine (type B)	Porc (types A et B)	Poisson (type A)	Références
Température de gélification (°C)	24-25	19-23,9	11-19	Karim and Bhat .(2009)
Point de fusion (°C)	29-33	31-36	14-27	Karim and Bhat .(2009)
Point isoélectrique (pH)	4-5	7-9	7-9	Saxena et al.(2005)
Force de gel (g)	210-239	216-295	56-323	Karim and Bhat .(2009)

I.3.4. Applications de la gélatine

La propriété gélifiante de la gélatine est la plus connue et la plus utilisée. Le marché de la gélatine est axée principalement vers le pharmaceutique, l'alimentaire et le photographique.

I.3.4.1. Industrie pharmaceutique

Dans l'industrie pharmaceutique, la gélatine est utilisée pour la fabrication des gélules et des capsules. Elle protège les médicaments des effets néfastes de la lumière et de l'oxygène. Les gélules sont essentiellement employées pour les médicaments liquides, alors que les capsules sont utilisées pour les poudres. La gélatine permet de lier les principes actifs du médicament et de prolonger leur durée de conservation. Grâce à une sélection et un dosage rigoureux, la gélatine peut même influencer sur la vitesse de libération des principes actifs, soit en l'accéléralant, soit en la ralentissant. Les comprimés enrobés de gélatine représentent un nouveau progrès technologique dans le domaine de santé. L'application de la gélatine en industrie pharmaceutique sera détaillé dans les applications de ce polymère pour la préparation des films, d'enrobage et des capsules (partie I.3.6).

I.3.4.2. Industrie alimentaire

La gélatine est largement utilisée en industrie alimentaire, grâce à sa texture agréable et son caractère fondant. De nombreux produits allégés ou pauvres en matières grasses n'existeraient pas sans la gélatine. Elle est ainsi présente dans la margarine ou le beurre allégé, les pâtes à tartiner ou les fromages à taux réduit en matières grasses. La gélatine est sans goût, lie de grandes quantités

d'eau, forme des gels et procure une agréable sensation en bouche. La gélatine est très utilisée en préparations alimentaires comme agent épaississant et gélifiant (Sobral et Habitante, 2001 ; Gomez-Estaca et al., 2009). La gélatine alimentaire est indispensable dans de nombreuses confiseries, telles que les bonbons gélifiés (oursons, gommages), les caramels mous, etc. Elle leur confère une grande élasticité, une consistance optimale pour la mastication et améliore leur durée de conservation. C'est la gélatine qui donne aux terrines et aux aspics leur apparence si appétissante. En poissonnerie, la gélatine est surtout employée pour la fabrication de produits en gelée. Outre ses fonctions esthétiques, la gélatine protège de la lumière et de l'oxygène. Sa capacité à fondre à la température de consommation en fait un substitut indispensable aux matières grasses dans les aliments allégés. La gélatine, un polymère naturel également considéré comme un sous-produit de l'industrie alimentaire, possède un grand nombre d'applications comme films biodégradables et comestibles. La forte abondance de la gélatine à des coûts relativement bas, ajoutée à sa biodégradabilité, à ses excellentes propriétés filmogènes, ses bonnes propriétés barrière à l'oxygène et aux arômes ont fait de cet hydrocolloïde un bon matériau pour des applications en emballages comestibles (Cao et al., 2007a) ou emballages actifs (Gomez-Guillen et al., 2009). L'application de la gélatine comme emballage alimentaire sera détaillée dans la partie (I.3.5)

I.3.4.3. Industrie de la photographie

Les produits photographiques à base de sels d'argent sont constitués de plusieurs couches de gélatine (jusqu'à 15) qui sont coulées sur film ou sur papier. La gélatine est utilisée comme liant pour les sels d'argent hautement photosensibles. Son pouvoir gonflant permet aux produits de développement de pénétrer dans les couches sensibles et d'en être éliminés par lavage. Les propriétés de la gélatine sont à la base de la production de films photographiques ultrasensibles, en particulier pour atteindre sur les films couleur et radiographiques, le haut degré de sensibilité requis. Bien que la photographie argentique tend à disparaître, la gélatine est également indispensable pour la photographie numérique. Les papiers pour imprimantes à jet d'encre enduits de gélatine, assurent la brillance des couleurs et la netteté des contours, permettant des impressions d'excellente qualité.

I.3.5. Emballages biodégradables et comestibles à base de gélatine

Les films à base des protéines (zéine, gluten de blé, l'albumine, la kératine et la gélatine) ont des meilleures propriétés barrières aux gaz (O_2) que les films formés à partir des polysaccharides (la pectine, la MC, HPMC ou amidon) (Gontard et al., 1996 ; Park, 1999). Ceci est dû à la structure compacte de protéines qui couvre une large gamme de propriétés fonctionnelles potentielles, essentiellement dues aux liaisons inter-moléculaires. En raison de sa disponibilité et ses propriétés biologiques, le collagène de type I est largement utilisé comme un biomatériau. Il est surtout utilisé sous forme de film et de membrane (Sisken et al., 1993). Le collagène possède des caractéristiques intrinsèques comme un biomatériau très différent des polymères synthétiques, c'est est un excellent candidat utilisé pour la préparation des films comestibles. Les films de collagène offrent plusieurs avantages: ils sont biocompatibles et non toxiques pour la plupart des tissus, ils ont des bonnes propriétés immunologiques, structurelles, physico-chimiques. Hood. (1987) a montré que les films de

collagène extrudés sous la forme d'enveloppe cylindrique utilisé comme emballage primaire pour les saucisses peuvent être considérés comme un matériau d'emballage comestible. La gélatine, obtenue par dégradation partielle du collagène a été largement étudiée comme matériau d'emballage. C'est un polymère biodégradable, relativement peu coûteux et qui possède des propriétés fonctionnelles et filmogènes excellentes (Cao et al., 2007a ; Arvanitoyannis, 2002).

La gélatine est soluble dans l'eau, ce qui permet d'obtenir des films par refroidissement et séchage d'une solution aqueuse. Ces films sont transparents, flexibles, résistants et imperméables et peuvent être utilisés comme enrobage superficiel pour protéger les aliments contre la lumière et l'oxygène (Gennadios et al., 1994). Ces auteurs ont montré que la gélatine peut être utilisée comme film d'emballage et d'enrobage appliqué sur les viandes afin de réduire le taux de transfert de gaz et d'humidité favorisant ainsi une longue durée de conservation. Dans ce domaine, des emballages comestibles à base de mélanges de gélatine avec des constituants amylacés ont été récemment commercialisés (Arvanitoyannis et al., 1997). L'application d'enrobage à base de gélatine sur des morceaux de viande congelés utilisé comme garniture de pizza, permet de réduire d'une façon considérable le risque d'oxydation et le changement du couleur durant le stockage (Villegas et al., 1999). Cependant, les films de gélatine restent moins résistants que ceux élaborés à partir du collagène. Aujourd'hui, les films de collagène reconstitués ou régénérés ont plus d'applications commerciales dans l'industrie de la viande. Ces types de films sont largement utilisés comme emballages de jambons et rôti de filet (Gennadios et al., 1997).

Dans les années 2000, les films à base de gélatine de poisson ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs (Sobral et al., 2001 et Gomez-Estaca et al., 2009), en substitution de la gélatine du porc ou de bœuf. En effet, soit par conviction religieuse, soit dû au risque lié à l'Encéphalopathie spongiforme bovine, la gélatine de poisson est préférée. Gomez-Guillen et al. (2007) ont montré que les films de gélatine de thon ont des propriétés barrières à la vapeur d'eau plus importantes que celles de gélatine du porc les films issues de gélatine du porc, dans les mêmes conditions de plastification. Kim et Min. (2012) ont démontré les avantages de la gélatine de poisson pour la fabrication des films comestibles stable à température ambiante et avec des très bonnes propriétés physiques et barrières. Avena-Bustillos et al. (2006) et Carvalho et al. (2008) ont aussi rapporté les avantages de la gélatine de poisson pour la préparation des films comestibles plus résistants à la vapeur d'eau. Enfin, la gélatine peut être utilisée pour la micro-encapsulation et l'enrobage dans le domaine alimentaire et la fabrication pharmaceutique (Guilbert, 1986). Cependant, les films de gélatine, comme la plupart des films protéiques, ont des faibles propriétés barrières à la vapeur d'eau, ce qui limite leurs applications. Toutefois, la modification du réseau protéique par réticulation des chaînes de polymère peut être envisagée pour améliorer la fonctionnalité des films de gélatine

I.3.6. Application de la gélatine en tant qu'agent d'encapsulation de molécules actives

I.3.6.1. Domaine pharmaceutique et médicale

Dans l'industrie pharmaceutique, la gélatine est souvent utilisée sous forme de capsules ou de films d'enrobage. Des microcapsules à base de gélatine sont utilisées pour la libération des médicaments anti-cancer tel que le méthotrexate, la curcumine, la noscapine, le cycloheximide,...(Elzoghby, 2013).

L'avantage de la gélatine pour vectorisation des traitements anti-cancer est relié à sa faible cytotoxicité, à sa biocompatibilité et aussi la simplicité et la reproductibilité de préparation de capsules. Kaul et Amiji.(2002) ont été les premiers à développer des nanoparticules de gélatine de type B pour le transport et la libération des séquences génomiques. La gélatine de type B, chargé négativement à pH neutre (7) peut encapsuler, physiquement, les acides nucléiques (ADN plasmidique) et les protéger durant le transport intercellulaires. Des nanoparticules à base de gélatine ont été aussi choisies comme modèle d'encapsulation et de délivrance de médicament oculaire (Friess, 1998). Au cours des dernières années, les microcapsules à base de gélatine ont été introduites pour le transport et la libération contrôlée des composants nutraceutiques bioactifs. Selon Chen et al. (2010), l'activité antioxydante de catéchines de thé a été gardée après trois semaines de stockage via l'encapsulation dans des microcapsules de gélatine. Des nano et microcapsules à base de gélatine réticulée par le glutaraldéhyde ont été utilisés avec succès pour l'immobilisation de glucoamylase (Wong et al., 2011). En se basant sur l'aptitude de gonflement et de « dégonflement » des microcapsules de gélatine réticulée, pendant plusieurs cycles de chauffage et de refroidissement, ce système pourrait être envisagé pour l'immobilisation et la libération des enzymes. À des températures supérieures à 40°C, le glucoamylase a été libérée avec une activité très importante, mais à des températures au-dessous de 40°C, l'enzyme reste immobilisé dans les microcapsules (Wong et al., 2011). Meyer et al. (2000) ont travaillé sur la réticulation de gélule à base de gélatine, pour optimiser la libération des composants actifs en pharmacie. Ce phénomène de réticulation induit la formation d'une pellicule insoluble autour de l'enveloppe de la gélule limitant la libération du principe actif contenu à l'intérieur (Carstensen et Rhodes, 1993). La réticulation de la gélatine conduit à un réseau complexe de haut poids moléculaire qui produit un hydrogel gonflé par l'eau. Ceci permet de réduire considérablement, voire empêcher, la dissolution de la gélatine et donc retarde la libération des composants actifs.

I.3.6.2. Domaine alimentaire

La gélatine est utilisée pour encapsuler la phase huileuse des ingrédients alimentaires et des produits pharmaceutiques afin d'assurer sa protection contre l'oxygène et de la lumière (Gennadios et al., 1994). L'utilisation d'enrobage à base de gélatine, encapsulant des antioxydants, appliqué au niveau de la viande de dinde et de poulet est efficace pour limiter le rancissement et prolonger la durée de conservation de ces aliments (Arvanitoyannis et al., 1997). Les protéines semblent être parmi les biopolymères les mieux adaptés pour l'encapsulation de systèmes volatils, tel que les arômes (Embuscado, 2009). Lamprecht et al. (2001) ont travaillé sur l'encapsulation par coacervation des esters d'acide gras Omega-3 dans un système de gélatine et gomme arabique. Ils ont montré que la coacervation conduit à une protection significative de l'huile de poisson par rapport aux systèmes non encapsulés. Barrow et al. (2007) ont travaillé sur l'encapsulation des huiles essentielles polyinsaturées (poisson) dans des matrices de gélatine, par coacervation, en montrant l'efficacité de système d'encapsulation contre l'oxydation des acides gras. Un système de coacervation complexe a été utilisé pour encapsuler de l'huile aromatisée dans des microcapsules de gélatine - gomme arabique pour améliorer les propriétés organoleptiques des aliments congelés lors de leur réchauffage en contrôlant la vitesse de libération de l'huile (Yeo et al., 2005). Soper. (1999) a montré l'avantage de l'utilisation de la gélatine de poisson de degré bloom entre 150 et 300, pour la micro-

encapsulation des huiles végétales ou compléments alimentaires. Ils ont montré que des volumes très faibles en gélatine de poisson peuvent former des capsules très rigides comparativement aux autres types de gélatine. Chiu et al. (2007) ont développé un système d'encapsulation (émulsion) de gélatine et d'acide poly-glutamique pour protéger le lycopène de l'oxydation. Ces auteurs ont montré que la libération du lycopène à partir des microcapsules était rapide à des valeurs de pH entre 5,5 et 7, alors qu'aucune libération du lycopène n'a été observée aux pH 2-3,5, ainsi le système est resté intact dans l'estomac et ensuite a libéré le lycopène dans l'intestin

L'incorporation des bactéries probiotiques (eg ; lactiques) dans les produits alimentaires fonctionnels est devenue une tendance de plus en plus populaire en raison de leurs capacités à exercer des effets bénéfiques sur la microflore intestinale (Gobbetti et al., 2010). Des microcapsules à base de gélatine, formé par extrusion et séchage par atomisation, ont été développées pour améliorer la viabilité des bactéries lactiques (Li et al., 2009) et les bifido-bactéries (Lian et al., 2002) contre le pH acide de l'estomac.

En outre, la technologie d'encapsulation peut être utilisée pour le développement de matériaux d'emballage incorporant des composés bioactifs, par exemple, des extraits poly-phénoliques de plantes ont été encapsulés dans des films de gélatine (Gómez-Guillén et al., 2011). Mise à part, la protection du potentiel actif de l'extrait naturel et le contrôle de sa libération dans le produit alimentaire, l'encapsulation était très utile pour le masquage du goût et l'odeur marqués des extraits naturels Bao et al. (2009) ont incorporé des nanoparticules de chitosan contenant des polyphénols de thé dans un film de gélatine de poisson, pour les protéger contre l'oxydation. Ils ont aussi montré que l'oxydation des huiles de poisson pourrait être effectivement retardée lorsqu'elles sont emballées dans ce matériau composite.

I.3.7. Paramètres influençant sur les propriétés des films de gélatine

I.3.7.1. Nature de la gélatine

En règle générale, les propriétés physiques des films de gélatine dépendent principalement des propriétés des matières premières extraites de différentes espèces animales, des conditions de traitement et de la fabrication de la gélatine (Gomez-Guillen et al., 2009). Les perméabilités à la vapeur d'eau et à l'oxygène des films à base de gélatine de poisson sont nettement inférieures à celles trouvés dans le cas de films préparés à partir de gélatines bovines ou porcines (Chiou et al., 2008). De plus, Avena-Bustillos et al. (2006) ont signalé que la perméabilité à la vapeur d'eau des films de gélatine de poisson extraite à l'eau froide est nettement inférieure à celle des films fabriqués à partir de gélatine de poisson extraite à l'eau chaude ou de la gélatine de mammifères. Cette différence est expliquée par la différence de composition en acides aminés, la gélatine de poisson, en particulier celle extraite à l'eau froide, contient des quantités importantes d'acides aminés hydrophobes et des quantités plus faibles d'hydroxy-proline. Similairement, Carvalho et al. (2008), en utilisant les mêmes plastifiants (sorbitol ou glycérol, 25 à 30 % de la teneur en gélatine), ont montré que la perméabilité à la vapeur d'eau des films de gélatine de poisson a été également inférieure à celle des films à base de gélatine de mammifères (Sobral et Habitante, 2001). Plus généralement, même si on utilise la gélatine du poisson avec la même teneur en plastifiant, la nature de la gélatine influe beaucoup sur les propriétés physicochimiques des films. Les acides aminés les plus

caractéristiques de la gélatine sont: Gly, Pro, et Hyp (triplets des acides aminés prédominants dans la composition des molécules de collagène). Plusieurs études ont montré que la gélatine de mammifère donne des films plus rigides (TS forte) que la gélatine de poisson (Avena-Bustillos et al., 2006; Gomez-Guillen et al., 2007; Sobral et Habitante, 2001; Thomazine et al., 2005). Dans une autre étude, Gómez-Estaca et al. (2009) ont confirmé que les films de gélatine de poisson (thon) sont 10 fois plus déformables que ceux obtenus à partir de gélatine bovine, alors que les deux types de films ont des valeurs de TS très similaires. La différence de déformabilité des films est due au rapport Hyp/Pro qui était plus élevé dans la gélatine bovine (210/1000 résidus) que dans celle de poisson (185/1000 résidus). Toutefois, les valeurs de déformation sont considérablement plus élevées pour les films de gélatine de poisson et ne peuvent pas être expliquées par la distribution du poids moléculaire, car la gélatine bovine a une grande quantité de fractions peptidiques hydrolysées, qui interagissent facilement avec le plastifiant et augmentent ainsi la déformation. Gomez-Guillen et al. (2009) ont montré que les déformations les plus importantes dans le cas des films issus de la gélatine de poisson sont essentiellement corrélées aux faibles teneurs en acides aminés libres dans ce type de gélatine.

I.3.7.2. Condition de séchage

La méthode et les conditions de séchage affectent les propriétés physiques de film final tel que: la morphologie et la microstructure, les propriétés barrières et mécaniques (Perez-Gago and Krochta, 2000). Kozlov et Burdygina. (1983) ont montré que les solutions filmogènes de gélatine séchées à des températures différentes peuvent donner des films avec des propriétés physiques très différentes, selon que le séchage était au-dessus ou au-dessous de la température de gélification. Les chaînes de gélatine dans une solution séchée au-dessous de la température de gélification peuvent former des structures en triple hélice avant l'évaporation complète de l'eau. Dans ce cas, le film séché peut conserver ces structures hélicoïdales, en fonction de la teneur en eau. Au contraire, les chaînes de gélatine dans un film séché au-dessus de la température de gélification sont en pelote statique. Dans ce cas, le film séché garde cette structure amorphe. Chiou et al. (2009) ont étudié l'effet de la température de séchage (4, 23, 40 et 60°C) à une humidité relative fixe (84%) sur deux variétés de film de gélatine. Ils ont montré que les films de gélatine issus des solutions filmogènes coulés à froid (4°C) conservent leurs structures initiales après séchage. Alors que les films coulés à chaud (60°C) étaient amorphes. Ces derniers ont des valeurs de contrainte à la rupture et de pourcentage d'allongement moins faibles et des propriétés barrière à la vapeur d'eau plus élevées. Les valeurs élevées de la perméabilité à la vapeur d'eau sont dues à la teneur en eau plus importante dans les films amorphes.

I.3.7.3. Plastifiant

Pour les films protéiques, l'ajout du plastifiant améliore leurs flexibilités et élongation et affecte aussi leurs perméabilités. D'une façon générale, l'ajout du plastifiant augmente la perméabilité des films et d'enrobage (McHugh and Krochta, 1994). Le type de plastifiant et sa concentration sont deux facteurs critiques qui vont influencer les propriétés physiques des films. En raison de leur groupement hydroxyle (OH), le sorbitol et le glycérol forment des liaisons hydrogène avec les groupes réactifs des résidus d'acides aminés, réduisant ainsi les interactions entre les chaînes des

protéines. L'augmentation de la concentration en plastifiant dans une solution filmogène forme un film qui est moins rigide, plus extensible et plus perméable à la vapeur d'eau (Sobral & Habitante, 2001). Selon Thomazine et al. (2005), les films de gélatine plastifiés avec du glycérol sont très sensibles à l'humidité et plus extensibles que les films plastifiés avec du sorbitol, tandis qu'un mélange de glycérol et de sorbitol donne des films à propriétés mécaniques, viscoélastique et barrières à la vapeur d'eau intermédiaires. D'autres plastifiants tels que le propylène glycol, le diéthylène glycol, et d'éthylène glycol ont été également utilisés pour plastifier les films de gélatine, mais en fonction des propriétés fonctionnelles qui en résultent, ils étaient moins efficaces que le glycérol (Vanin et al., 2005). Dans une étude antérieure, Ressouany et al. (1998), ont montré que les films à base de protéines contenant du sorbitol donnent un réseau final avec une viscoélasticité importante. Inversement, les films avec le polyéthylène glycol et le mannitol engendrent des films plus rigides et moins élastiques. Sothornvit and Krochta. (2001) ont montré que le glycérol est le plastifiant le plus efficace pour les films à base de protéine. D'autre part, l'état solide du plastifiant influence énormément sur les paramètres de perméabilité et de flexibilité des films protéiques. Le plastifiant solide a un effet anti-plastifiant (Dangaran and Krochta, 2007). L'anti-plastification se produit lorsque le système est plus dure et moins flexible que le polymère pur à une température au-dessous de sa température de transition vitreuse T_g (Chang et al., 2000).

I.3.8. Limites des applications de la gélatine en tant que film d'emballage et d'enrobage

Comme tous les films protéiques, les films à base de gélatine ont des bonnes propriétés mécaniques et des bonnes propriétés barrière à l'oxygène et aux arômes (Khwaldia et al., 2004), mais modestes pour les propriétés barrière au CO_2 (Nisperos-Carriedo, 1994 ; Gennadios et al., 1994)). Toutefois ces films restent hautement sensibles à la vapeur d'eau. Gennadios et Weller. (1990) ont aussi montré que leurs applications pour la conservation des viandes et des volailles sont très limitées du fait de la surface hydrophile de ces films. Gómez-Guillén et al. (2011) ont montré que la nature très hygroscopique du film de gélatine est son principal inconvénient dans le cas d'utilisation comme barrières de protection, car il a tendance à gonfler ou se dissoudre au contact avec la surface humide des denrées alimentaires. Cuq. (1996) a signalé que ce problème pourrait être résolu après réticulation physique des chaînes de gélatine. Carvalho et Grosso.(2004) ont aussi rapporté l'ajout d'agent réticulant à n'importe quel type de gélatine permet de pallier à cette difficulté. Dans la même perspective, Inamura et al. (2013) ont amélioré les propriétés barrière à la vapeur d'eau, mécaniques et la stabilité thermique de films composites de gélatine et de fibres par des traitements de réticulation (thermiques ou irradiations), grâce à la densification du réseau final par arrangement des chaînes des protéines. Par conséquent, la tendance actuelle dans la conception de matériaux biodégradables à base de gélatine s'oriente vers la combinaison de la gélatine avec des biopolymères qui ont des caractéristiques différentes. On cite par exemple: les lipides (Pérez-Mateos, Montero, & Gómez-Guillén, 2009), isolats protéiques de soja (Cao et al., 2007b; Denavi et al., 2009), la gomme gellane (Lee et al., 2004), le konjac glucomannane (Li et al., 2006), le chitosan (Hosseini et al., 2013 ; Arvanitoyannis et al., 1998), les pectines (Farris et al., 2009), de nouveaux plastifiants hydrophiles ou hydrophobes (Cao et al., 2009), ou des polymères synthétiques comme l'alcool polyvinylique. Sabato

et al. (2001) et Perez-Gago and Krochta. (2000) ont montré que la cohésion entre les chaînes peptidiques des protéines et la dispersion uniforme des lipides s'avère efficace pour l'amélioration des propriétés barrières des films protéiques. Une autre méthode pour améliorer la résistance des films protéiques à l'humidité consiste en la conception d'un film multicouche. Martucci and Ruseckaite. (2010) ont montré que les films multicouches à base de gélatine bovine ont des bonnes propriétés mécaniques (TS et YM) et aussi des bonnes propriétés barrières à la vapeur d'eau comparativement aux films fabriqués avec seule couche.

I.4. Films obtenus à partir de mélange de protéines et polysaccharides

Avant de présenter l'effet de mélange d'hydrocolloïdes sur les propriétés physicochimiques et les performances des films, nous présentons ci-après une brève description de la nature des interactions entre protéines et polysaccharides en solution ainsi que les paramètres affectant ce type de complexation.

I.4.1. Nature des interactions entre protéines-polysaccharides

Schmitt et al. (1998) ont montré que dans la plupart des cas, le mélange des biopolymères en solution est instable et une séparation de phase peut être obtenue selon deux cas distinctes:

- Dans le cas où les interactions entre les deux biopolymères est de nature répulsive, ce qui donne lieu à un système à deux phases séparées, où chacune des phases est enrichie en l'un ou l'autre des polymères, dans ce cas il s'agit d'une incompatibilité thermodynamique entre les hydrocolloïdes en solution, appelé aussi séparation de phases ségrégative.
- Dans un autre cas, les interactions est de nature attractive et le système donne lieu à deux phases, une concentrée, qui contient les deux macromolécules, et l'autre non. Ce cas est souvent appelé coacervation complexe ou séparation de phase associative. La coacervation complexe entre deux biopolymères est maintenant largement utilisé dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Le phénomène de coacervation est soit simple soit complexe, selon que le mélange contient un seul biopolymère ou plus, et c'est cette propriété qui est intéressante pour la fabrication de films.

A- Coacervation simple

Dans le cas de mélange d'un seul biopolymère avec un solvant incompatible, comme l'éthanol ou le polyéthylène glycol, ce dernier agit comme agent déshydratant et favorise les interactions biopolymère/biopolymère, donnant lieu à une séparation de phase. Khalil et al. (1968) ont montré la spécificité de la structure en hélice de la gélatine pour la coacervation simple, à un pH isoélectrique et à faible force ionique. Cette configuration (en hélice) compacte est le résultat des forces attractives intermoléculaires dues à l'équilibre de charge atteint au pH isoélectrique. En s'éloignant du pH isoélectrique, les forces deviennent de nature répulsive permettant un dépliage partiel des

molécules, ce qui favorise l'accessibilité du solvant pour le biopolymère et gêne le phénomène de coacervation.

B- Coacervation complexe

Dans ce cas, il s'agit d'un mélange de deux biopolymères (ou plus) en phase solvante. Si les deux biopolymères sont compatibles, par exemple deux molécules de charges opposées, ces derniers s'interagissent et se concentrent dans la phase pauvre en solvant (ou la phase concentrée), alors que le solvant occupe la phase riche en biopolymère. Ce phénomène de séparation de phase a été présenté pour la première fois par Bungenberg de Jong. (1949) pour un système de gélatine et gomme d'acacia dont le principal mécanisme d'interaction est de nature électrostatique, relié à leur dépendance au pH et à la force ionique. Dans notre étude nous avons réalisé un mélange de chitosan et de gélatine dans les conditions optimales de formation de complexes polyélectrolytiques (chitosan chargé positivement et gélatine chargée négativement), il s'agit de la formation d'un réseau essentiellement due aux attractions de charges opposées, c'est la coacervation complexe. Les propriétés physiques des films dépendent ainsi largement des interactions mises en jeu entre ces deux macromolécules en solution. Plus généralement, les interactions impliquées entre deux biopolymères peuvent être répulsives et non spécifiques et provenir de l'effet d'interactions électrostatiques et/ou de volume exclu. Les interactions attractives peuvent être faibles ou fortes, spécifiques ou non spécifiques (Tolstoguzov, 1997). Les liaisons covalentes sont spécifiques contrairement aux liaisons ioniques, aux forces de van der Waals, aux interactions hydrophobes et aux liaisons hydrogène. Il peut y avoir une interaction électrostatique entre des macromolécules d'une charge nette de même signe par l'intermédiaire de zones portant des charges de signe opposé (Xia et Dubin, 1994). Bien que les interactions électrostatiques soient majoritaires lors de la formation des complexes (Samant et al., 1993), des forces d'autres natures sont impliquées dans certains systèmes. Par exemple, la formation de complexes pectine/gélatine à un pH supérieur au pI de la protéine et à une force ionique supérieure à 0,2 pouvait s'expliquer uniquement par la présence d'interactions électrostatiques. En fait, la présence d'une température critique de miscibilité (20°C) du système gélatine/pectine a permis de détecter la présence de liens hydrogène, favorisés à basse température (Chen et al., 1989). D'autre part, le traitement thermique des complexes protéine/polysaccharide a permis d'améliorer leur stabilité lors de variations de pH ou de force ionique, et cette amélioration a été associée à des interactions hydrophobes (Chen et al., 1989).

I.4.1.1. Interactions électrostatique

Les interactions électrostatiques peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle. Les dipôles peuvent être permanents ou induits. Les interactions ion-ion sont impliquées entre des molécules possédant une charge électrique permanente. Typiquement, deux types de complexe peuvent être formés par des interactions électrostatiques, le complexe soluble, obtenu lorsque le nombre des charges opposés de deux macromolécules sont différents, la charge résultant permet la solubilisation du complexe suite à son interaction avec le solvant. Cependant, si le nombre des charges opposés portés par les deux macromolécules sont égales, donc la charge totale du complexe est égale à zéro, le complexe sera insoluble. Plusieurs travaux de recherches ont réalisé des

complexes polysaccharides-protéines par des interactions électrostatique des charges opposés, on cite à titre d'exemple, le mélange des polysaccharides (anionique) et des protéines (cationique): gomme de mesquite-protéines de lactosérum (Osés et al., 2009), pectine-gélatine (Farris et al., 2011), pectine/carboxy méthyl cellulose- caséinate /protéines de lactosérum (Parris et al., 1995; Sabato et al., 2001 ; Brindle et Krochta, 2008), alginate de sodium-protéine de lactosérum/gélatine (Wang et al., 2010). Dans d'autres cas on pourra favoriser un mélange de polysaccharides (cationique) et de protéines (anionique), c'est l'exemple du chitosan-gélatine à un pH de 5,6-6,2 (Pereda et al., 2011 ; Cofré et al., 2012 et Staroszczyk et al., 2014).

I.4.1.2. Interactions non-électrostatique

Liaisons hydrogène

Il s'agit d'une liaison de faible énergie entre un atome électronégatif (oxygène) et un atome électronégatif (groupement carboxylique). Par exemple, la formation de coacervats gélatine-pectine ou gélatine-alginate à pH entre 6 et 7,6 se fait à travers une liaison hydrogène (Nikolava et al., 2005; Liu et al., 2007). Le complexe soluble entre ces deux macromolécules (gélatine et pectine/alginate) peut être formé sur une large plage de pH supérieurs à 4,8 (point isoélectrique de la gélatine). On peut citer aussi, la formation de complexe protéines de lactosérum et alginate (Parris et al., 1995) ou protéines de lactosérum-carboxy méthyl cellulose (Su et al., 2010) à travers des liaisons hydrogène. La formation de liaisons hydrogène a été aussi rapporté par Pereda et al. (2011) ; Cofré et al.(2012) et Staroszczyk et al.(2014) dans le cas de mélange chitosan-gélatine lors de la formation du complexe polyélectrolytique (pH du mélange entre 5,6 et 6,2).

Interactions hydrophobes

Il s'agit d'une interaction de type dipôle-dipôle. Ce type d'interaction est essentiel pour l'amélioration de la stabilité thermique des biopolymères en mélange. Ce type d'interaction est réalisé dans des mélanges de type protéines-xanthane à pH égale à 3,7 (Scmitt et al., 1998) ou protéine-chitosan à pH 3 (Abugoch et al., 2011)

Liaisons covalentes

Il s'agit d'une interaction entre les groupements amines des protéines et les groupements carboxyliques des polysaccharides pour former une liaison covalente de type amide, on cite à titre d'exemple le complexe β -lactoglobuline-dextranes (Dickinson and Galazka, 1991), protéine de lactosérum-amidon (Hattori et al., 1945)

I.4.2. Paramètres influençant la formation des complexes protéines-polysaccharides

Les paramètres influençant la coacervation complexe entre protéines et polysaccharides sont schématisés sur la **Figure I.10**

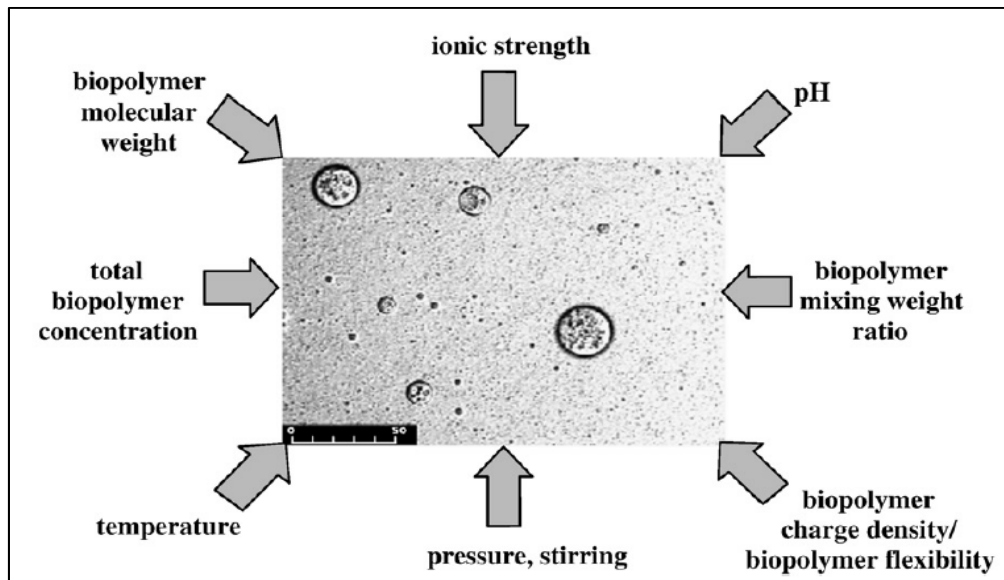


Figure I.10. Paramètres physicochimiques influençant la coacervation complexe dans un système protéines-polysaccharides. La barre d'échelle: 50 μm . (D'après Schmitt et al., 2011)

I.4.2.1. Influence du pH et de la force ionique

Le pH agit sur la charge des complexes en influençant le degré d'ionisation des groupes amines et carboxyliques. Une forte concentration en sels inhibe la formation de complexes en créant un effet d'écran électrostatique. De même, une force ionique insuffisante inhibe la complexation. En effet, la forte charge portée par les macromolécules induit une modification de leur configuration de manière à favoriser la formation d'agrégats et ce, au détriment des complexes (Singh et Burgess, 1989). Le ratio protéine/polysaccharide est un troisième facteur influençant la charge nette et les propriétés du complexe obtenu. Ce ratio est le facteur ayant le plus d'influence sur la solubilité des complexes. Dans le cas d'un mélange polysaccharide anionique et protéine, le rendement de coacervation le plus élevé est obtenu au-dessous du point isoélectrique de la protéine. À cette condition, les deux biopolymères ont des charges nettement opposées qui résulte en une attraction électrostatique maximale (Schmitt et al., 1998). Mais dans le cas du chitosan en solution acide (groupement amine NH_3^+), l'interaction entre chitosan et protéine se fait au-dessus de point isoélectrique de ce dernier pour qu'il soit chargé négativement.

I.4.2.2. Influence du poids moléculaire

Lorsque les interactions électrostatiques entre protéine et polysaccharide sont très fortes, l'effet du poids moléculaire du polysaccharide sur la quantité de protéines complexées est négligeable (Morr et Ha, 1993). Lorsque ces interactions sont faibles, un polysaccharide de poids moléculaire élevé complexe une plus grande quantité de protéines; le plus grand espace occupé dans la solution favorise alors le contact avec la protéine (Semenova, 1996). Les protéines de grand poids moléculaire ont tendance à former des gels ou des précipités plutôt que des complexes. Les molécules de faible poids moléculaire interagissent par appariement ionique, plutôt que par complexation, conduisant à la formation d'agrégats moléculaires.

I.4.2.3. Influence de la température et de la pression

La température influence la formation de complexes en favorisant les interactions hydrophobes et covalentes à haute température et les liaisons hydrogène à basse température (Schmitt et al., 1998). L'application d'une pression hydrostatique facilite aussi la formation de complexes. En effet, ce traitement mène à la dénaturation partielle des protéines et permet l'exposition de leurs sites réactifs, initialement inclus dans la molécule (Dickinson et Pawlowski, 1996).

I.4.3. Mélanges protéines et polysaccharides: performances et applications en emballage

Plusieurs études ont montré que les films préparés à partir de mélanges polysaccharides-protéines semblent améliorer les propriétés physicochimiques et la performance de ces hydrocolloïdes pour des applications en emballage et enrobages grâce aux interactions qu'elles peuvent former dans le mélange (Arvanitoyannis and Biliaderis, 1998; Ciesla et al., 2006; Coughlan et al., 2004; Gounga et al., 2007; Lee et al., 2004; Parris and Coffin, 1997; Turhan et al., 2007). Des études supplémentaires seront encore nécessaires, dans ce domaine, afin de bien cerner les mécanismes d'interactions et de miscibilités entre ces macromolécules et leurs influences sur les performances des films (Di-Pierro et al., 2006; Schmitt et al., 1998).

I.4.3.1. Propriétés barrières à la vapeur d'eau et à l'oxygène

Garcia et al. (2000) ont montré que la perméabilité à la vapeur d'eau dépend de plusieurs facteurs: rapports phase cristalline/phase amorphe, taux de mélange, mobilité des chaînes des polymères et les interactions spécifiques entre les groupes fonctionnels. Récemment, Zuo et al. (2009) ont affirmé que le phénomène de transport d'humidité à travers un film à base du mélange protéine/polysaccharide est largement dépendant de la nature et des interactions intermoléculaires entre ces composants. L'ajout de xylane jusqu'à un taux de 40% dans un film de gluten de blé n'affecte pas significativement le transfert de vapeur d'eau au travers de films plastifiés avec 17% de glycérol (Kayserilioglu et al., 2003). De même, la perméabilité à la vapeur d'eau ne varie presque pas pour un mélange de films protéine/polysaccharides de type caseinate de sodium/pullulan à un taux

de 0,33/3 (w/w) (Kristo et al., 2007). Osés et al. (2009) ont montré que la perméabilité à la vapeur d'eau des films de protéines de lactosérum reste d'un même ordre de grandeur après incorporation de gommes (polysaccharides) à différents taux. Inversement dans le cas de plusieurs mélanges, la résistance à l'eau augmente avec l'augmentation du ratio polysaccharide/protéine (Coughlan et al., 2004; Rhim et al., 1999b). Al-Hassan et Norziah. (2012) ont montré une légère diminution de la perméabilité à la vapeur d'eau de films d'amidon après ajout de gélatine de poisson à un taux 2 :1. D'autre part, Ryu et coll. (2002) sur des films de zéine de maïs avec des proportions croissantes d'amylose, ont montré que la perméabilité à la vapeur d'eau diminue avec le taux de zéine. Ce résultat est principalement dû à la forte hydrophobie de la zéine. Paranto et al. (2007) ont trouvé que l'addition de gellane diminue significativement la perméabilité à la vapeur d'eau des films de gélatine. Les interactions ioniques (pH acide) entre ces biopolymères, limitent le transfert d'eau à travers le film. Le K-carraghénane forme aussi un complexe ionique avec la gélatine mais plus faible que le réseau gellane-gélatine (Al-Hassan et Norziah, 2012). Farris et al. (2011) ont montré que l'interaction électrostatique entre la gélatine et la pectine forme une barrière à l'eau. Ces derniers se mettent en concurrence pour interagir avec les mêmes sites hydrophiles le long du squelette moléculaire de deux biomolécules. Cette tendance a été renforcée en présence d'agents réticulants. Liu et al. (2007), ont montré que la combinaison pectine-gélatine de poisson (1 :5 (w/w) permet de diminuer la solubilité et le taux de transfert d'eau par rapport aux films de pectine. Letendre et al. (2000) et Liu et al. (2006) ont signalé que l'incorporation de pectine et d'agar dans une formulation de protéine améliore les propriétés barrières à l'humidité des films. Parris et al. (1995) ont préparé des films à base de protéines de lactosérum et d'alginate ou de pectine dans le but d'améliorer la résistance des films à l'eau. Ils ont montré que les films de protéines en présence d'alginate ont une meilleure propriété barrière à la vapeur d'eau que les films contenant la pectine. L'espacement entre les macromolécules peut être réduit, conduisant à une réduction de la perméabilité. Özge et al. (2005) ont montré qu'un film à base de protéine de lactosérum et de méthylcellulose présente une propriété barrière à la vapeur d'eau meilleure que celle des films des biopolymères seuls. Ce résultat est en accord avec des études antérieures (Le Tien et al., 2000 ; Coughlan et al., 2004) qui ont montré que l'incorporation des polysaccharides aux films de protéines de lactosérum augmente la résistance à la vapeur d'eau des films résultants. Les films de méthylcellulose-protéine de lactosérum peuvent potentiellement être appliqués sur des diverses denrées alimentaires hétérogènes (pizza, gâteaux ou biscuits avec garniture) ou des aliments mixtes (céréales à base de fruits secs avec d'autres céréales) où l'humidité migre entre les différents composants (Özge et al., 2005). Les protéines de lactosérum sont compatibles avec divers polysaccharides en solution. Cependant, l'incompatibilité a été observée dans des mélanges avec quelques polysaccharides neutres, comme le dextran, les maltodextrines ou le phénomène de séparation de phase est due aux forces de répulsion entre ces biopolymères qui ont plus d'affinité au solvant (Turgeon et Beaulieu, 2001).

Il est souvent connu que les films protéiques, et dans certains cas des films polysaccharidiques, sont des barrières efficaces contre les substances non-polaires (O_2 , CO_2 , lipides), particulièrement aux faibles gradients d'humidité relative (Lin and Zhao, 2007). Selon Park and Chinnan. (1995), la perméabilité aux gaz (O_2 , CO_2 , et le rapport CO_2/O_2) des films à base de gluten de blé sont plus faibles que celles des films à base de méthylcellulose. Par ailleurs, Debeaufort and Voilley. (1994) ont montré que les films à base des protéines de gluten ont des meilleures propriétés barrières aux composés aromatiques que les films à base de méthylcellulose. En se basant sur ces informations,

Zuo et al.(2009) ont rapporté que la fabrication d'un film comestible à base de gluten de blé et de méthylcellulose, en jouant sur le taux de mélange, pourrait être un piste de recherche très important pour l'élaboration d'un réseau de polymère avec des propriétés barrières efficaces contre l'O₂ et la CO₂ et les composés de faible polarité. Brindle et Krochta. (2008) dans le cas d'un film mélange de protéine de lactosérum et d'hydroxy-propyl-méthylcellulose, ont montré que la perméabilité à l'oxygène était significativement moins faible pour le mélange que pour de film pur à base de d'hydroxy-propyl-méthylcellulose. D'après leurs expériences, ils ont signalé aussi que les deux biopolymères devient partiellement miscibles (donc propriété barrière à l'oxygène importante) quand les protéines formeront la phase dominante. La phase majeur dans un mélange des films partiellement miscibles domine la plupart des propriétés (Shonaike and Simon, 1999; Brady, 2003). Zhong et Xia. (2008) ont rapporté que les propriétés barrières aux gaz des films à base de chitosan, d'amidon et de gélatine augmentent avec l'augmentation de la proportion d'amidon et de la gélatine dans le mélange. Ceci est attribué à la formation de liaison hydrogène entre le groupement NH₃⁺ de chitosan, d'une part avec la chaine latérale de la gélatine et d'autre part avec le groupement OH⁻ de l'amidon. Ces interactions moléculaires, résultent en une structure plus compacte et par conséquent un taux de transfert d'oxygène réduit.

I.4.3.2. Performances mécaniques

Fabra et al. (2008) ont montré que l'ajout de polysaccharides aux films à base des protéines fait diminuer la résistance à la rupture, le module de Young et inversement augmente l'élongation des films, mais cela reste dépendant du taux de mélange. Des résultats similaires ont été observés par d'autres auteurs qui ont travaillé avec des films de caséinate ou des protéines de lactosérum incluant différents taux d'alginate, de pectine et de carboxy methyl cellulose (Parris et al., 1995; Sabato et al., 2001). Osés et al. (2009) dans la préparation d'un film protéine-polysaccharide ont rapporté que la résistance à la rupture des films à base de protéine de lactosérum est très élevé comparativement aux films incorporant la gomme de mesquite à différentes proportions. L'établissement des forces intermoléculaires entre les chaines des protéines contribuent à leur bonne résistance mécanique. L'addition de gomme de mesquite à ce système protéique engendre un film plus flexible, car ce polysaccharide participe à l'affaiblissement ou la réduction du nombre de liaisons hydrogène. Inversement, Su et al. (2010) ont montré que pour un film de protéine de lactosérum et de carboxy-méthylcellulose, la résistance à la rupture augmente significativement avec la teneur en carboxy-méthylcellulose (0-40% en poids). L'enchevêtrement moléculaire entre ces deux biopolymères améliore la résistance à la traction des films due aux groupements OH⁻ des longues chaines de carboxy methylcellulose qui participe aux fortes interactions intermoléculaires (liaison hydrogène, effet des charges opposés, force d'orientation dipôle-dipôle). Des résultats similaires ont été constatés par Zhou et al. (2008). Brindle et Krochta. (2008) en étudiant les performances d'un film à base de protéines de lactosérum et d'hydroxy-propyl-méthylcellulose, plastifié par du glycérol, ont montré que ce film est plus rigide que le film de protéine plastifié dans les mêmes conditions, il est aussi plus flexible et extensible que celui d'hydroxy-propyl-méthylcellulose. Les propriétés mécaniques des films polysaccharides-protéines peuvent êtres significativement améliorés grâce aux interactions des charges opposées entres les deux biopolymères. Dans ce contexte, Farris et al. (2011) ont noté une amélioration des propriétés mécaniques de films de gélatine (TS et %E) après

ajout de pectine grâce aux interactions des charges opposées entre ces deux biopolymères. Ils ont observé une augmentation de 35% et de 30% respectivement pour TS et E, après ajout de la pectine à la gélatine. Cette interaction électrostatique a été favorisée d'avantage en présence d'agent réticulant (glutaraldehyde). Al-Hassan et Norziah. (2012) ont montré qu'à un certain niveau de taux de mélange amidon-protéine on favorise les interactions entre les deux biopolymères, influençant ainsi les propriétés mécaniques du réseau final. Fonkwe et al. (2003) ont rapporté que les polysaccharides forment un réseau dense avec la gélatine grâce aux liaisons anioniques-cationiques, permettant d'augmenter la résistance des films. De même, Lee et al. (2004) ont observé une amélioration de la résistance de film (TS) après ajout de gellane (polysaccharides chargé négativement) au film de gélatine au-dessus du point isoélectrique. Wang et al. (2010) en travaillant sur un mélange complexe protéine de lactosérum et de gélatine et d'alginate de sodium, ont montré que les protéines de lactosérum ont le plus d'effet sur la résistance mécanique du film. Cependant le mélange gélatine+alginate sans protéine de lactosérum forme un film mécaniquement plus résistant. Ce résultat est essentiellement dû à la conformation aléatoire de l'hélice de gélatine qui lui permet de former un nombre élevé d'interactions avec l'alginate de sodium. Ces auteurs, ont montré aussi que le coefficient d'interaction (déterminé selon un modèle quadratique des paramètres analysés (TS, %E) en fonction des propriétés physiques des biopolymères) entre la protéine de lactosérum et l'alginate était négatif et que le mélange diminue la résistance mécanique du film. Ce résultat est évident, car ces deux biopolymères sont chargés négativement à une valeur de pH de 6, il y avait donc une répulsion électrostatique relativement forte entre l'alginate et la protéine de lactosérum. Les propriétés mécaniques des films composés de deux biopolymères ou plus, dépend du degré d'interactions à l'interface de ces composants (Peters, 2003). L'incompatibilité entre deux macromolécules due à l'absence d'interactions spécifiques entre les phases fait diminuer les performances mécaniques des films. Généralement, une bonne interaction entre deux macromolécules améliore d'une façon significative les propriétés mécaniques des films (Shonaike and Simon, 1999).

I.4.3.3. Propriétés thermiques

Al Hassan et al. (2012) ont montré que la variation de la température de transition vitreuse est un indicateur effectif concernant la compatibilité des polymères en mélange. Les hydrocolloïdes ont été largement étudiés comme matériaux pour film d'emballage, mais la dynamique des interactions en mélange restent cependant peu étudiées. Ces auteurs ont montré que la présence d'une seule température de transition vitreuse, lors d'analyse thermique différentielle, dans un film d'amidon et gélatine de poisson pourrait indiquer que ces biopolymères sont compatibles. Cela a été aussi observé, par Arvanitoyannis and Biliaderis. (1998) pour un film amidon+caséinate, plastifié avec du glycérol lors d'une analyse thermique différentielle. Su et al. (2010) ont montré la présence d'une seule Tg (75-100°C) après combinaison de protéines de lactosérum (Tg=60°C) et de carboxy methyl cellulose (Tg=55°C) à différents taux, et ils ont confirmé que ce phénomène prouve la bonne compatibilité et miscibilité moléculaire entre les deux biopolymères. Ils ont aussi signalé que la Tg de différents taux de mélange était supérieure à celle de chaque biopolymère seul, dû aux liaisons intermoléculaires entre les hydrocolloïdes. Ceci est aussi confirmé par une analyse de la tenue thermique de films par TGA, qui montre que la température de décomposition thermique des

différents mélanges est supérieure à celle de chaque polymère. De plus, tous les mélanges présentent un seul stade de décomposition thermique ce qui prouve davantage la compatibilité. Pereda et al. (2011) ont montré que la faible température de transition vitreuse (-52°C) observé pour des films de gélatine pourrait être associée à la relaxation du glycérol ajouté comme plastifiant. La transition observé à -33°C pour le film de chitosan est lié au mouvement des chaînes latérales en se liant au glycérol par interactions hydrogène (Quijada-Garrido et al., 2007). La faible température de transition vitreuse des films de chitosan augmente de -52°C à -42°C après ajout de la gélatine, en suggérant que la mobilité du glycérol est plus limitée dans le mélange en raison des interactions entre les composants du système.

I.4.3.4. Microstructure

Abugoch et al. (2011) en utilisant la microscopie environnementale à balayage ont montré une structure plus homogène et continue pour les films mélange à base de protéine de lactosérum et de chitosan comparativement aux structures des films à base des protéines de lactosérum seules. Farris et al.(2011), ont signalé qu'au pH 4,5, les charges positives de la gélatine en solution (NH_3^+) interagissent avec les charges négatives de la pectine (COO^-) pour former un film à structure très homogène. L'association des groupements fonctionnels entre les deux polymères à pH contrôlé permet d'obtenir un film à structure homogène et plus compact avec des propriétés physicochimiques importantes. La même observation a été signalée par Pereda et al. (2011) dans le cas d'un film chitosan-gélatine. Ces auteurs ont montré une surface lisse et homogène, sans pores et avec une excellente intégrité structurale. Inversement, Liu et al. (2007) en travaillant sur un film de pectine avec deux protéines (gélatine de poisson et /ou protéine de lactosérum), ont montré que les films de pectine ont des surfaces relativement plus lisses que celles des films à base du mélange. Ces derniers apparaissent plus denses, cassants, avec apparition de quelques particules irrégulières réparties uniformément à l'intérieur du réseau de pectine. Pranoto et al.(2007) ont également trouvé des zones discontinues avec fissures visibles distribuées au hasard dans le réseau de film de gélatine de poisson et gellane ou k-carraghénane. Cependant, ils ont conclu que l'ajout de gellane à forte proportion aux films de gélatine de poisson contribue à l'élimination de ces fissures, en donnant un aspect de surface plus compacte. Tandis que l'addition du k-carraghénane n'a aucune contribution dans l'élimination de ces fissures.

Ma et al. (2013) dans une étude microstructurale des films protéines d'haricot et de chitosan, en utilisant la technique de fluorescence combiné avec la microscopie environnementale à balayage ont montré une structure homogène des films de chitosan ou de protéine. Cependant une séparation de phase a été observée au niveau du film mélange (0,1g/g: chitosan/protéine). Ce film présente une microstructure continue des protéines dont les phases riches en protéine et en chitosan sont visibles. À un taux de mélange de 0,2g/g une structure bi-continue a été observée où une partie des protéines ont été segmentées par le chitosan pour former des microsphères. Avec l'augmentation de la proportion de chitosan dans le mélange (0.4g/g) la microstructure bi-continu a été transformée en une structure continue de chitosan où la phase riche en protéine a été dispersée dans la matrice de chitosan. En outre, en utilisant uniquement la microscopie environnementale à balayage, ces auteurs ont confirmé l'hétérogénéité de la microstructure à partir d'un taux de 0,2 g/g. Ainsi, l'incompatibilité entre les deux biopolymères dans les conditions de concentrations étudiées et sous

un pH de mélange égale à 3 explique la séparation de phase. Osés et al. (2009) ont rapporté que dans un mélange de polysaccharides anioniques (gomme de mesquite) et de protéine de lactosérum, les interactions électrostatiques seraient basées sur la nature des charges nettes de chaque molécule. Les deux biopolymères ont des charges similaires, favorisant donc la répulsion électrostatique entre ces macromolécules, et donc la formation d'agrégat. Plus généralement Norton and Frith. (2001) ont indiqué que le mélange de deux biopolymères donne lieu à une séparation de phase pour former des domaines riches en une seule macromolécule. Ils ont considéré que cela était dû à la tendance de ces molécules d'être associées avec d'autres ayant des structures similaires. Ce phénomène de séparation de phase a été aussi rapporté dans le cas de film mélange chitosan-protéine de lactosérum (Ferreira et al., 2009), chitosan-gliadines (Li et al., 2010) et gluten de blé-méthylcellulose (Zuo et al., 2009).

I.4.3.5. Propriétés de surface

L'angle de contact avec l'eau est l'une des propriétés de base du mouillage des films d'emballage. Ma et al. (2013) ont utilisé cette technique pour étudier les propriétés d'un film de protéines d'haricot et de chitosan à différents taux. Ils ont montré que l'angle de contact augmente avec le taux de chitosan dans le mélange. Le film de chitosan présente le plus grand angle de contact (90°). Le mécanisme sous-jacent de ce phénomène est encore inconnu. Toutefois, il peut être associé à la réorientation préférentielle des fragments hydrophobes de la chaîne latérale des protéines vers la surface de films après ajout de chitosan. Cette orientation préférentielle des fragments hydrophobes vers la surface a été aussi observée dans le cas de films de gélatine ou des films à base de lactosérum (Yin et al., 2007). La distribution de chitosan à la surface des films suite aux interactions ioniques avec la gélatine augmente l'hydrophobie des films. Des travaux similaires ont rapporté l'augmentation de l'angle de contact avec l'eau après ajout de chitosan aux protéines de lactosérum (Ferreira et al., 2009; Silva et al., 2007). Récemment, Fan et al. (2014) ont montré l'augmentation de l'angle de contact pour les films de protéines d'haricot après ajout de chitosan, ils ont noté que l'angle de contact avec les liquides bipolaire (comme l'eau) augmente due à la diminution de la densité de surface des groupements polaires à la surface des films suite à l'ajout de chitosan. Il a été aussi noté que l'énergie libre de surface diminue alors que l'angle de contact de l'eau augmente avec le taux de chitosan dans le mélange (Ma et al., 2013). Ceci est dû au caractère amphiphile des protéines qui possèdent une teneur élevée en acides aminés polaires capables de réagir avec le chitosan.

I.4.3.6. Opacité

Divers travaux de recherche ont été réalisés afin d'améliorer les propriétés mécaniques et barrières des films et d'enrobages comestibles mais très peu des études ont porté sur les propriétés optiques telles que la couleur, la brillance et la transparence. Les propriétés optiques sont des caractéristiques de surface, qui sont généralement détectés par la vision humaine touchant ainsi certains aspects cruciaux de la qualité organoleptique des aliments. La microstructure de film, interne et de surface, joue un rôle important dans les propriétés optiques du film. L'étude de l'opacité de films est très importante et conditionne parfois l'application alimentaire de films à base de mélange. En outre, elle peut être considérée aussi comme un moyen efficace pour indiquer l'aspect structural de mélange.

En effet un aspect translucide a été attribué à une phase moins visqueuse formant une matrice continue ; au contraire une phase plus visqueuse forme des phases dispersées (Brindle et Krochta, 2008). Des films translucides ont été observés pour un mélange chitosan-gélatine (Lopez-Caballero et al., 2005), konjac glucomannane-gélatine (Li et al., 2006), amidon de maïs-caséine et amidon de maïs-gélatine (Jagannath et al., 2003). Typiquement, la translucidité indique une miscibilité incomplète entre deux composants ou plus. Li et al. (2006) ont rapporté une miscibilité complète entre le konjac glucomannane et la gélatine mais avec une proportion konjac glucomannane de 40% (w/w). Habituellement, une plus grande transparence est considéré comme souhaitable pour les enrobages et les films d'emballage alimentaires. Yoo et al. (2011) ont montré que les films à base de protéines de lactosérum sont les films les plus transparents comparativement aux films polysaccharidiques ou aux différents films à base de polysaccharides-protéines. Les films à base de méthylcellulose et d'hydroxy-propyl-méthylcellulose entier étaient aussi transparents. Mais le film issu du mélange méthylcellulose ou hydroxy-propyl-méthylcellulose et protéines de lactosérum ont la plus faible transparence, ce qui pourrait indiquer un certain degré d'incompatibilité moléculaires entre ces biopolymères en mélange, résultant ainsi à une structure hétérogène. Après avoir discuté les performances des mélanges filmogènes protéines-polysaccharides ainsi que les différentes interactions mises en jeu en fonction de la proportion de chacun de deux macromolécules et en fonction des conditions du milieu (pH,...), nous allons présenter dans le tableau suivant (**Tableau I.9**), les applications de ces complexes en emballage et enrobage.

Tableau 1.9. Mélange d'hydrocolloïdes pour des applications en emballage et enrobage.

Complexe protéine-polysaccharide	Forme	Application	Avantage/Inconvénient	Référence
Chitosan-pectine	enrobages	emballage de protection après récolte	activité antimicrobienne/mais enrobage épais	Elsabee et al. (2008)
Chitosan-protéine de lactosérum	enrobages	emballage alimentaire	excellent adhésion mais barrière faible à l'oxygène	Farris et al. (2009)
Pectine - protéine de lactosérum	gels	stabilisant de système alimentaire	propriété adapté /mais turbidité	Farris et al. (2009)
Pectine-gélatine de poisson ou farine de soja	films	emballage alimentaire ou enrobage alimentaire et médicale	bonne résistance mécanique mais très soluble dans l'eau	Liu et al. (2007)
Pullum- protéine de lactosérum	films	enrobage alimentaire	barrière à l'oxygène mais moins résistant à l'humidité	Gounga et al. (2007)
Gomme de mesquite – protéine de lactosérum	films	emballage alimentaire	flexible	Osés et al. (2009)
Methylecellulose- protéine de lactosérum	films	emballage des aliments sensibles à l'eau	barrière à la vapeur d'eau	Farris et al. (2009)
Gélatine-konjac glucomannane	films	films d'emballage comestible	propriété de scellage	Li et al. (2006)
Gélatine-pectine	films	enrobage alimentaire	transparent	Nikolava et al. (2005)
Gélatine-alginate de sodium	films	enrobage comestible	barrière à l'oxygène	Liu et al. (2007)
Gélatine-maltodextrine	gels	libération des composants actifs	propriété adapté	Nickerson et al. (2006)
Chitosan-gélatine	membranes	biomédical	bioactive	Nagahama et al. (2009)
Zéine-amidon	films	emballage alimentaire (intérieur) pour le fromage	barrière à l'eau mais faible flexibilité	Farris et al. (2009)
Amidon-fibre de cellulose	films	emballage alimentaire	bonne résistance à la rupture mais propriétés optique faible	Muller et al. (2009)

I.4.4. Mélange chitosan-gélatine: performances et limites d'application en emballage

Les films de chitosan, comme la plupart des films à base de polysaccharides, possèdent une bonne imperméabilité aux gaz mais est une faible propriété barrière à la vapeur d'eau, dû à la présence de nombreux groupes pouvant former des liaisons hydrogène dans leurs structures (Olabarrieta et al., 2001). Les films à base de gélatine ont des bonnes propriétés mécaniques meilleurs que celles de chitosan mais restent sensibles aux gaz carbonique et surtout très sensible à l'humidité. Un film mono-composant a généralement soit une bonne propriété barrière ou une bonne propriété mécanique, mais rarement les deux. Ainsi des films comestibles à base de plusieurs composants filmogènes ont été mis au point afin de tirer parti des propriétés complémentaires et limiter les inconvénients propres à chacun d'entre eux. Porta et al. (2011) ont montré que les performances des films à base d'hydrocolloïdes peuvent être améliorées après mélange protéine-polysaccharide en formant un réseau continu et consistant. Des études récentes se sont intéressées au mélange de chitosan et de gélatine pour obtenir un film avec des propriétés fonctionnelles intéressantes (Arvanitoyannis et al., 1998 et Sionkowska et al., 2004). Ces films ont des structures plus compactes avec des nouvelles propriétés physiques. Travel et Domard. (1995) ont montré que la combinaison de chitosan et de gélatine semble être une méthode prometteuse pour améliorer les propriétés des matériaux qui en résultent, ainsi des nouvelles applications peuvent être envisagées. Après une analyse thermique et microstructurale sur des films en mélanges, Jridi et al. (2014) ont montré une structure plus homogène associée à une stabilité thermique élevée pour les films composite chitosan-gélatine de poisson comparativement aux polymères purs, grâce à la compatibilité entre ces hydrocolloïdes.

Hosseini et al. (2013) ont montré que l'ajout de chitosan au film de gélatine engendre un film plus flexible en jouant comme plastifiant du mélange. Dans une autre étude portant sur un mélange chitosan-gélatine de poisson, Benbettaieb et al. (2015a) ont présenté une amélioration de la rigidité (résistance à la rupture), des propriétés barrières et de la stabilité thermique des films de chitosan après ajout de la gélatine. Selon Pranoto et al. (2007), il y avait un niveau optimal du taux de mélange pour une meilleure interaction moléculaire entre les polysaccharides et de la gélatine, où la gélatine constitue la phase continue système. L'augmentation de la résistance mécanique avec une proportion croissante de la gélatine peut être un avantage très important pour les films composites (chitosan-gélatine) dans certaines applications en emballage. La réalisation des mélanges de polymères a pour objectif d'élaborer de nouveaux matériaux à propriétés améliorées (Utracki, 1989). De plus, élaborer un nouveau matériau à partir d'un mélange de polymères est moins coûteux et moins aléatoire que synthétiser un polymère dont les propriétés sont inconnues, à partir d'un nouveau monomère. Les mélanges sont aussi réalisés pour générer rapidement et économiquement une gamme de matériaux de différentes propriétés chimiques, mécaniques ou autres (Belhaneche-Bensemra et Bedda, 2001). D'un point de vue écologique, les mélanges de polymères permettent d'augmenter la vitesse de biodégradation des films composites comparée à celle des polymères seuls (Ikejima et Inoue, 2000). Cheng et al.(2003) et Schmitt et al.(1998) ont montré que le film chitosan-gélatine est très homogène dû à la miscibilité entre ces deux biopolymères. L'interaction entre ces hydrocolloïdes se fait par des liaisons électrostatiques et hydrogène lorsque le chitosan est chargé

positivement et la gélatine est chargée négativement dans des conditions appropriées de pH. Cofré et al. (2012) ont montré que pour obtenir une bonne miscibilité entre le chitosan et la gélatine en solution, le pH de la solution filmogène doit être fixé à 5,5 afin de favoriser la formation de complexes polyélectrolytes (pH supérieur au point isoélectrique (I_p) de la gélatine (4,5-5,2) pour qu'elle soit négativement chargée et au-dessous du pK_a du groupement amine ($pH=6,2-6,5$) du chitosan pour qu'il soit positivement chargé. Pereda et al. (2011) ont signalé, que cette condition est nécessaire pour obtenir un film homogène et ainsi des propriétés mécaniques du réseau optimales. Staroszczyk et al. (2014) ont étudié les interactions et liaisons mises en jeu dans un mélange ($pH=5,6-6,2$) de chitosan et de gélatine de poisson en utilisant la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Ces auteurs ont mis en évidence la présence d'interactions hydrogène entre les chaînes des biopolymères. Comme ils ont détecté des changements au niveau de la position de pics relatifs aux bandes amide-I (associé à la vibration NH) et amide-II (associé à la vibration CO) au niveau de chitosan et de la gélatine. Ces changements peuvent être dus aux interactions moléculaires, d'une part entre le NH_3^+ provenant de la protonation du groupement amine (NH_2) du chitosan en milieu acide, et d'autre part par du groupement carboxylique (COO^-) de la gélatine au-dessus de son point isoélectrique (**Figure I.11**). Les groupements amino et carbonyle interagissent principalement par des interactions électrostatiques pour former un complexe poly-électrolyte. Les mêmes observations ont été faites aussi par Jridi et al. (2014). Liu et al. (2012) ont montré que les changements de la position de pics à 1649 , 1542 et 1234 cm^{-1} associés respectivement aux groupes amide-I, amide-II et amide-III, indiquent la formation d'une liaison de type hydrogène entre le chitosan et la gélatine dans les films.

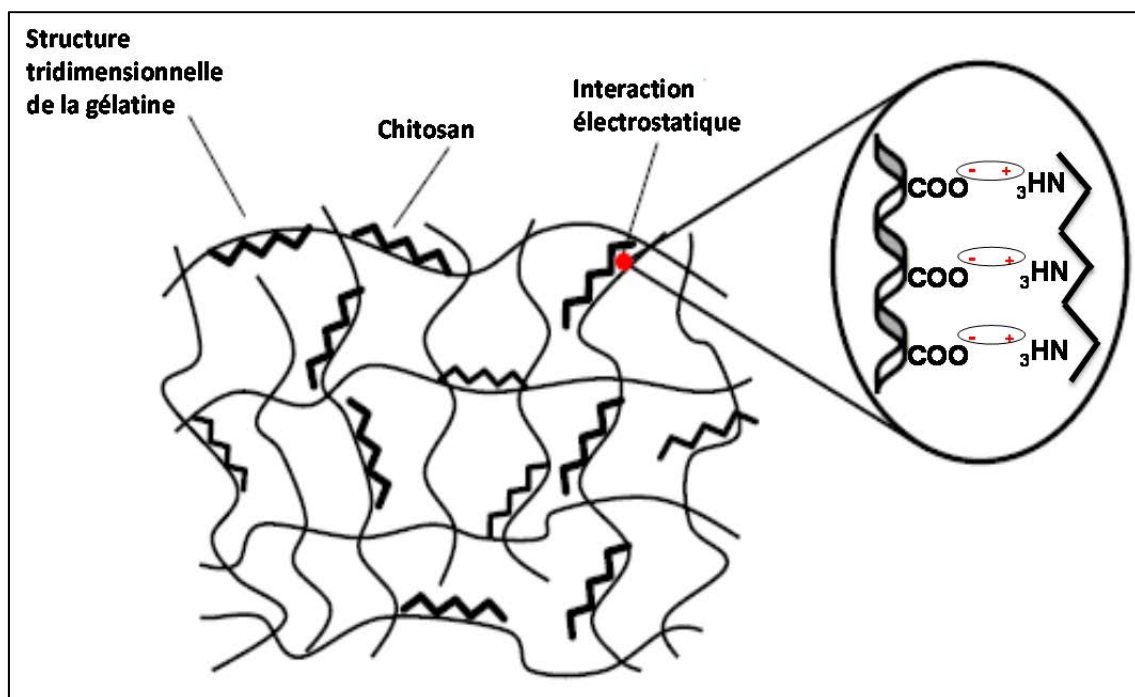


Figure I.11. Présentation schématique de l'interaction électrostatique entre la gélatine et le chitosan (pH de mélange=5,6) (d'après Farris et al., 2009)

Un film de chitosan-gélatine élaboré dans des conditions appropriés (degré d'acétylation et masse moléculaire de chitosan, degré bloom et point isoélectrique de la gélatine, pH du mélange,..) pourrait être une alternative pour la formation d'un film avec des propriétés meilleures que celles issues des polymères purs. Ce type d'assemblage entre chitosan et gélatine a trouvé des nombreuses applications, comme enrobage antimicrobien (Lopez-Caballero et al., 2005), ou films d'emballage (Zhong et Xia, 2008 ; Pereda et al., 2011 ; Cheng et al., 2003). Cependant le caractère essentiellement hydrophile des hydrocolloïdes, y compris le chitosan et certaines protéines, induit à la formation d'un réseau à faibles propriétés barrière à la vapeur d'eau (Kester et Fennema, 1986 ; Gennadios et al., 1997; McHugh, 2000).

L'une des voies les plus prometteuses pour surmonter ces faibles propriétés barrières et mécanique, consiste à la modifier l'organisation et la structure physique des films en induisant des nouvelles liaisons inter et intramoléculaire par des méthodes chimiques, enzymatiques et physiques (Rhim et al., 1999a). Ces traitements permettent de modifier, à travers la réticulation des chaînes, la structure du réseau des polymères (Partie I.5)

I.5. Modification of functional properties of polysaccharides proteins films

Some studies have demonstrated that the mechanical and the barrier properties to CO₂ of protein-based films are better than those possessed by polysaccharide-based films (Aydt et al., 1991; Cuq et al., 1995b), whereas the latter show a more effective barrier to oxygen (Nisperos-Carriedo, 1994). However, all have poor moisture barrier. It is well known that electrostatic, dipole-dipole and hydrophobic interactions, as well as covalent and hydrogen bonds, are responsible for the structure of the films and, consequently for their barrier properties. Among natural biopolymers, polysaccharide and protein (only or in mixtures) are very promising (Tharanathan and Saroja, 2001) as they can give rise to different kinds of biodegradable and edible wraps with different characteristics, so that their formulations can be tailor-made to suit to the needs of a specific commodity. Many approaches exist to improve the barrier properties of edible proteins and polysaccharides films, such as by modifying properties, by combining with hydrophobic material with synthetic polymers (at low concentration). But it's difficult to control the miscibility between these compounds and polymers. For instance, the cross-linking intermolecular and intramolecular bonding of polysaccharides and protein films by means of chemical, enzymatic or physical treatments was reported to improve functional properties of films (Rhim et al., 1999a; Sabato et al., 2001; Ouattara et al., 2002; Ressoany et al., 1998).

I.5.1. Chemical crosslinking

Chemical treatments with acid, alkali or crosslinkers have been extensively used to improve the properties of films. In the case of protein films, the modification of protein films forming solution using chemical treatment such as alkaline or acid modification would occur with extended chain structures; less permeability and greater tensile strength should be obtained in the final film.

Chemical agents used for covalent cross-linking of protein have included essentially formaldehyde, glyceraldehyde and glyoxal (Orliac, et al., 2002; Bourtoom, 2009). Hernandez-Munoz et al. (2004) reported that addition of glutaraldehyde, glyoxal and formaldehyde to the film-forming solution of glutenin-rich films enhances the water barrier properties of the films, and increases the resistance to breakage, and decreases film deformability. The formation of more resistant films suggests the occurrence of new covalent bonds between glutenin via chemical reaction through formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal and amino acid side chain reactive groups. The formaldehyde is the most effective cross-linker in terms of these properties. Formaldehyde is a low molecular weight molecule and could easily migrate between the protein chains and establish new covalent bonds with the Lys, Cys and His groups of the proteins (Gallietta et al., 1998). In addition, the higher TS values for films treated with formaldehyde can be due to the lack of specificity of this chemical with respect to the different amino acids. In addition to amines, formaldehyde reacts with sulphhydryl, phenolic, imidazolyl, indolyl and guanidinyll groups (Bourtoom, 2009). Embuscado. (2009) displayed that formaldehyde and glutaraldehyde have been used to cross-link whey proteins through lysine residues. However, the cross-linked products are no longer edible, due to the toxicity of the cross-linking agents (Gallietta et al., 1998). Very few scientific publications exist on the film-forming ability of such combinations of protein and polysaccharide components under chemicals crosslinking. Rhim et al. (1998) demonstrated the potential use of dialdehyde starch as a cross-linker for protein films and coatings. Dialdehyde starch substantially reduces the solubility of soy protein films in water and increases their mechanical strength.

Galus et al. (2013) also showed that tensile strength of the composite films significantly increased as the oxidized starch content increased in soy protein films. Differential scanning calorimetry displayed that the thermostability of the films is obviously enhanced due to the hydrogen bonding between soy proteins and oxidized starch molecules. The high tensile strength in the dry state and the good miscibility between soy protein isolates and oxidized starch were confirmed by observing the microstructure. Saravanan et al. (2011) observed an improvement of the thermal stability of chitin-bentonite blend film after glutaraldehyde addition.

Ma et al. (2003) showed that, chitosan can function as a bridge to increase the cross-linking efficiency of glutaraldehyde in the collagen-based scaffolds owing to the large number of amino groups in its molecular chain. Hence, one can expect that less glutaraldehyde could be used in the presence of chitosan and the potential cytotoxicity of glutaraldehyde might be decreased. The collagenase digestion test proved that the presence of chitosan can obviously improve the biostability of the collagen/chitosan scaffold under the glutaraldehyde treatment, where chitosan might function as a crosslinker. They suggest that collagen/chitosan scaffold cross-linked by glutaraldehyde is a potential candidate for dermal equivalent with enhanced biostability and good biocompatibility. So it's expected to produce an edible collagen-chitosan film with higher functional properties in the presence of small quantity of glutaraldehyde.

Staroszczyk et al. (2014) determine, by the FTIR technique, the molecular structure of chitosan and gelatin film, as well as to reveal their interactions in the blends film crosslinked or not by ethylene dichloride. They showed the formation of iso-peptide bonds between amine groups of gelatin or chitosan, and activated carboxylic acid groups of glutamic or aspartic acid residue of gelatin in the presence of ethylene dichloride. This finding is in agreement with those founded by Kuijpers et al. (2000). Therefore; using ethylene dichloride is a new way to increase crosslinking between chitosan

and gelatin. A cytotoxic analysis show that these chemicals agents (glutaraldehyde, formaldehyde, ethylene dichloride,...) are very toxic, which limit their use in edible biobased films. Consequently, a new natural agents like antioxidants (Ferulic acid, tannins...) are now focused for both crosslinking ability and antioxidant activity in edible films. The effect of these compounds on film structure and physicochemical properties is more discussed in Part I.6.2.

I.5.2. Enzymatic crosslinking

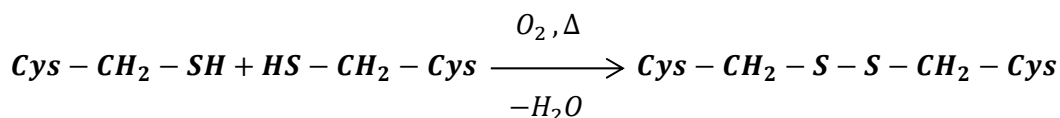
Crosslinking of protein and polysaccharides films can be accomplished enzymatically (Bourtoom, 2009; Mariniello et al., 2003). Edible film protein crosslinking with enzymatic tools is receiving more attention because chemical crosslinkers usually provide toxicity unacceptable for biomedical or food applications. Transglutaminase (TGase) is a food grade enzyme that uses the acyl-transferase mechanism to link the gamma-carboxamide (acyl donor) of a glutamine residue to the gamma-amine (acyl acceptor) of lysine residues along protein chains (Mahmoud and Savello, 1992). TGase has received extensive recent attention for its capacity to cross-link protein films; it has been investigated with various protein sources including k-casein, soy proteins, gelatin and whey proteins, where different responses in gel and films strength were dependent on the reaction conditions and on the different protein sources (Bourtoom, 2009). Egg white proteins were effectively cross-linked using TGase (Lim et al., 1998), as marked by an increase in protein molecular weight determined by SDS-PAGE. Cross-linking can improve elongation because protein chains are associated through covalent bonds instead of relatively weaker van der Waals interactions in film matrices (Chambi and Grosso, 2006). Babin and Dickinson. (2001) worked on enzymatic modification of gelatin. The treatment with TGase could present both positive or negative effects on the strength of gelatin Types A and B. This depended on the order in which the cross-linkages were formed, and whether before or after the formation of junction zones induced by the cooling of the solution to temperatures below 35°C. Inversely, Carvalho and Grosso. (2004) founded an improvement of water barrier and mechanical properties of gelatin films using TGase independent of gelatin type. Larre et al. (2000) showed that TGase was effective in introducing covalent bonds into films obtained from slightly deamidated gluten. In this case the addition of covalent bonds by the use of TGase increased the film's integrity and heavy-duty capacity as well as its capacity to stretch. Yildirim et al. (1996) prepared biopolymer from crosslinking whey protein isolate and soy bean by TGase. Resulting network has higher water moisture barrier efficiency. Yildirim and Hettiarachchy. (1998) worked on mixed film made from 11S fraction of soy protein and whey protein (50%- 50%, w/w) and crosslinked using TGase. Treated films are over two time's stronger (tensile strength) than control films. Transglutaminase is now possible to be obtained at a lower cost from microbial sources (Chambi and Grosso, 2006), and has been used in both homogenous protein systems and mixtures of proteins to affect tensile strength and permeability properties. Most of research works were interested on the modification of protein films, or mixed between two protein types using TGase. But very few study presented the effect of this enzyme on polysaccharides or mixing protein-polysaccharides films. Mariniello et al. (2003) presented the effect of TGase on oxygen, carbon dioxide and water vapour permeabilities as well as solubility of pectin-*soy flour* -based films. They founded that films prepared in the presence of TGase showed a significant decrease in solubility ($p < 0.01$) compared to non-crosslinked controls because of the presence of intermolecular soy protein isopeptide bonds

produced by the enzyme. Mariniello et al.(2003) demonstrated that the film permeability to oxygen and carbon dioxide is strongly influenced by the TGase-produced soy protein crosslinks, since the films obtained in the presence of the enzyme showed a significant decrease in permeability to both gases compared to control films ($p < 0.01$). In the same manner, permeability to water vapour was founded to be reduced by TGase-mediated crosslinks.

I.5.3. Physical crosslinking

I.5.3.1. Physical crosslinking by heating

Heat is another physical method used to crosslink and improves functional properties of biopolymers network. But it's much used in the case of protein. Protein film forming solution, for which the solvent is water, are typically formed at room temperature and stabilized through electrostatic interactions, hydrogen bonding, and van der Waals forces among the protein chains (Embuscado, 2009). The protein film network may be improved through heat-denaturation, which improves the tensile strength and barrier properties of solvent casted films by induction of cross-linking between the protein chains. Disulfide bond formation, which occurs with heat-denaturation in protein based films, is often used to modify film properties (Perez-Gago et al., 1999). Heat-denaturation, and the subsequent polymerization of protein chains, has been studied for two milk proteins commonly used to make edible films: whey and soy protein (Le Tien et al., 2000)._Outtara et al. (1998), showed the mechanisms of crosslinking of whey protein by heating (80°C, 30min). This physical treatment initially, involves oxidation of the thiol groups of cystein residu that form intermolecular disulfide linkage:



Disulfide bonds play a crucial role: they stabilize the structure of proteins in space as they covalently link cysteine residues with the peptide chain. During this process, the heat is used to linearize the proteins chains so that intra-globular thiol groups are exposed to the outside, which favorites the crosslinking reaction. McHugh and krochta. (1994) also produced whey proteins isolate films by heating protein solutions from 75 to 100 °C. They confirmed that heat was essential in the formation of the intermolecular disulfide bonds. Moreover, Vachon et al. (2000) reported that combination of radioactive and thermal treatments of the films based on calcium caseinate and whey proteins resulted in an increase in the puncture strength of the films as well as insoluble fraction matter. For soy protein films, thermal treatment is also important for the formation of a film matrix. As reported by Renkema and Van Vliet. (2002), soy proteins (with the exception of beta-conglycinin) and purified glycinin participate in heat-induced gel formation, which aggregation is facilitated through formation of disulfide bonds to provide matrix cohesion. Okamoto. (1978) showed that films made from 11S soy protein were stronger than those made from the 7S fraction because of the intermolecular disulfide bonds formed between 11S protein chains after heat treatment of film forming solution. Autoclaving enhances protein-polysaccharide, pectin-protein and agar-protein interactions,

resulting in a three-dimensional network with improved mechanical properties (Letendre et al., 2002). According to Thakur et al. (1997), high temperatures generate a less ordered structure, making more functional groups available. Furthermore, Letendre et al. (2002) founded that when calcium, whey proteins and polysaccharide are mixed together, a fully disordered and dissociated polymer chains could interact more favorably together.

I.5.3.2. Physical crosslinking by irradiation

I.5.3.2.1. Authorized radioisotopes installation and requirements irradiation doses in food and packaging

One of the first questions often asked about irradiated food is whether it is radioactive. Not many people understand that food and any natural substance contains natural radioactivity which can be measurable. It is therefore important to put the issue on natural radioactivity and possible induced radioactivity in food in perspective. While there is a clear consensus among the scientific community that no radioactivity is induced when food is irradiated by gamma rays from cobalt-60 or cesium-137, electron generated by a machine with energy less than 10 million electron volt (MeV) or X rays produced generated by a machine with energy less than 5 MeV. Furthermore, according to the Codex General Standard for Irradiated Foods (CAC, 2003), ionizing radiations foreseen for food processing are limited to high energy photons (gamma rays of radionuclides cobalt-60 and, to a much smaller extent, cesium-137, or, X-rays from machine sources with energies up to 5 MeV, or accelerated electrons with energies up to 10 MeV. As food irradiation is gaining wide acceptance in many countries, it was considered timely to compile data on natural and induced radioactivity in food irradiation. Brynjolfsson. (1975) provides clear explanations not only why radioactivity cannot be induced in food irradiated by radiation sources but to what extent the increase in dose or energy level of radiation sources would induce significantly radioactivity in food. The compilation of such data was prompted by a desire to increase the energy limit and the absorbed dose based on the need to irradiate thicker samples of food and to use sterilizing dose up to 60 kGy. This publication concluded that the increase in radiation background dose from consumption of food irradiated to an average dose up to 60 kGy with gamma rays from cobalt- 60 or cesium-137, with 10 MeV electrons or with 5 MeV X rays is insignificant, it is best characterized as zero. In addition, food irradiated with X ray with energy up to 7.5 MeV to a dose of 30 kGy has radioactivity well below natural radioactivity in non-irradiated food. There is no adverse effect from consumption of irradiated food which contains radioactivity well below background level. In 1980, at the Meeting of the Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food recommended a 10 MeV for electron beams and 5 MeV for X rays.

These types of radiation are chosen because:

- They produce the desired food preservative effects.
- They do not induce radioactivity in foods or packaging materials.
- They are available in quantities and at costs that allow commercial use of the irradiation process (Farkas, 2004).

Etude bibliographique. Chapitre I

Accelerated electrons have low penetrability thus the practically usable penetration depth-limit for 10 MeV electrons in high moisture food (water-equivalent material) is 3.9 cm. Gamma rays and X-rays have high penetrating characteristics, thus they can be used to treat food even in pallet-size containers. Except for different penetration, effects of electromagnetic ionizing radiations and electrons are equivalent in food irradiation.

In case of gamma irradiation, the long residence time enable the continuous diffusion of oxygen into the polymer. Knowing that, oxygen can limit crosslinking mechanisms, the use of electron beam to crosslinking material became advantageous. The G values of cross-linking (yield) are thus much lower than electron beam and deterioration of the material properties are intensified (Chmielewski et al., 2005).

Food processing establishments are constructed and operated in accordance with regulatory requirements in order to ensure safety of the processed foods for consumption. **Table I.10** presents the guidelines for dose requirements of various applications of irradiation on food and packaging.

Table I.10. Guidelines for irradiation dose requirements for food and polymer.

	Effect and types application	Dose (kGy)	References
Food	Inhibition of sprouting of potatoes and onions	0.03-0.12	Farkas (2006)
	Killing and sterilizing insects (disinfection of food)	0.2-0.8	
	Prevention of reproduction of food-borne parasites	0.1-3	
	Extension of shelf-life of food by reduction of microbial population	0.5-5	
	Elimination of viable non-spore forming pathogenic microorganisms in fresh and frozen food	1-7	
	Reduction or elimination of microbial population of dry food ingredients	3-10	
	Reduction of the number of more viable microorganisms	25-60	
Naturals polymers	Crosslinking milk proteins (soy, whey, caseinate)	32-64	Brault et al.(1997) ; Mezgheni et al.(1998)
	Crosslinking polysaccharides films (Chitosan, konjac-glucomannan/chitosan)	10-25kGy	Yang et al. (2003) Li et al. (2011)
Synthetic polymers	Crosslinking of poly-butadiene films	Up to 100	Pentimalli et al.(2000)
	Crosslinking of polystyrene films	More than 100	

Electron beam processing of cross-linkable plastics (wire and cable) has yielded materials with improved dimensional stability, reduced stress cracking, higher service temperature, reduced solvent and water permeability and contributed significant improvement in other thermo-mechanical characteristics. According to Pentimalli et al. (2000), polystyrene undergoes crosslinking at high doses

of irradiation and its mechanical properties are also affected only at very high doses (more than 100kGy) and no significant effects can be observed under 100 kGy. However, poly-butadiene very easily undergoes both cross-linking and degradation at range of doses until 100kGy.

For natural polymers, most of protein undergoes crosslinking reaction occurred between 8 and 128kGy with a maximum yield at 64kGy. Whereas, in the case of polysaccharides, degradation and crosslinking can occur simultaneous at the dose range from 10 to 25kGy. The effect of irradiation on biopolymers is discussed in the next part.

I.5.3.2.2. UV, gamma and electron beam irradiation for crosslinking of biopolymers films

There are other methods for inducing cross-linking of protein and polysaccharides chains besides chemicals and enzymatic treatment. Irradiation has been successfully used to improve the functional properties of protein films via cross-link mechanisms (Rhim et al., 1999a; Vachon et al., 2000; Lacroix et al., 2002). Very little research works was done in the case of modification of carbohydrate films under irradiation. Radiation crosslinking of polysaccharide has been reported by Yoshii et al. (2003) who showed that water-soluble polysaccharides derivatives lead to radiation crosslinking at high concentrated aqueous solution. For protein, most of data concerns the irradiation of film forming solutions before casting and drying. The mechanism of protein film crosslinking under irradiation was characterised by Lacroix et al. (2002). Water forms hydroxyl radicals when exposed to gamma-irradiation. Aromatic amino acids, such as phenylalanine and tyrosine react more with the hydroxyl radicals than with aliphatic amino acids (Sabato et al., 2001). Brault et al. (1997) hypothesized (**Figure I.12**) the formation of bi-tyrosine linkages between protein chains in radical polymerization processes.

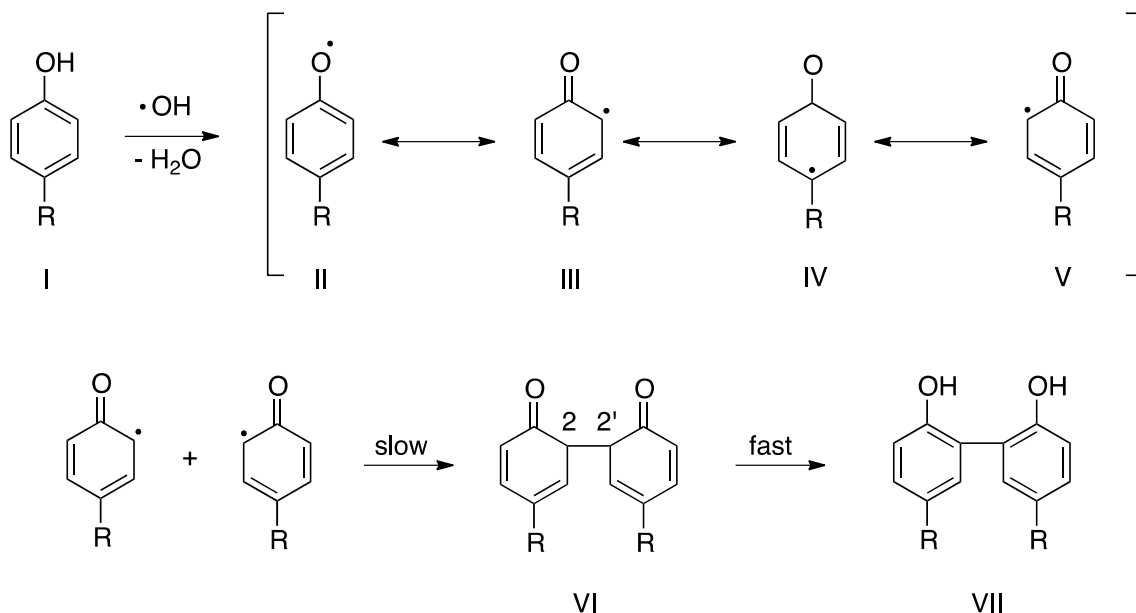


Figure I.12. Mechanism of the radical polymerization process involving the formation of bi-tyrosine linkages between two residues of tyrosine (Brault et al., 1997).

After water radiolysis, hydroxyl radical was formed, and involves the formation of phenoxyl radical (tyrosyl) by hydrogen abstraction from hydroxyl group of phenol. After, keto-enol rearrangement, two phenoxyl radicals form a dimer or a bi-phenolic (bi-tyrosine) product.

There are two hypotheses to explain the effect on gamma irradiation of protein solution (Bourtoom, 2009):

- the participation of several molecular residues in intermolecular interactions in case of proteins (tyrosine residue as mentioned above).
- the formation of inter- and/or intra-molecular covalent cross-links between proteins chains in the film-forming solutions (Ouattara et al., 2002).

Mezgheni et al. (1998) used the fluorescence analysis to characterize the *in vitro* interactions between proteins and the formation of bityrosine upon gamma-irradiation (8 to 128kGy) of caseinate edible film containing or not calcium ions. They found that the fluorescence intensity linearly increases with irradiation. Thus amount of bityrosine is positively correlated to irradiation treatment. The formation of bityrosine upon gamma-irradiation leads to a branching of polypeptide chains to form a three-dimensional network. This three-dimensional network and interactions between the protein and plasticizer molecules contribute to the mechanical behavior of the films. The puncture strength of films containing propylene glycol or triethylene glycol at 2.5 % increased significantly with irradiation until 64kGy (high crosslink density). Triethylene glycol was found to interact more favorably with the caseinate than propylene glycol, being responsible for the improved film extensibility. Moreover, high irradiation dose (more than 64kGy) seemed to affect the protein structure, accounting for the decrease of the breaking strength of gels and for the depreciation of the mechanical behavior of films. This uncommon trend might be explained by a partial fragmentation or conformational changes of the caseinate at very high irradiation dose, mainly 96 kGy and 128 kGy. Proteins irradiated at very high doses were reported to be more susceptible to molecular damage of the primary, secondary, tertiary and quaternary structures (Garrisson, 1987).

Irradiation at 32 and 64kGy was found to be effective doses for the improvement of both barrier and mechanical properties of the edible films and coatings based on protein. Ouattara et al. (2002) worked on the effect of gamma irradiation on the permeability of milk protein films and they also demonstrated that γ -irradiation showed that water vapour permeability (RH gradient of 100%), decrease by 33% after 32kGy irradiation dose, for all caseinate-whey protein at various ratios. However, at 56% RH gradient, only a significant effect was observed for the pure casein films. In the same study and using SDS-PAGE technique, it was been found that high molecular weight proteins increase from 2×10^5 Da (for native non-irradiated films) to more than 10^7 Da (for irradiated film). Lacroix et al. (2002) and Lee et al. (2004) demonstrated that γ -irradiation (32kGy) was effective in inducing crosslinking in casein and soy proteins by the aggregation of polypeptide chains, resulting in a film with enhanced water barrier and mechanical properties. They showed also that molecular weight peak shifted from 60 to 2000 kDa after irradiation. This process can thus improve the structural and mechanical properties of protein films (Wihodo and Moraru, 2013).

In the same way, Lee et al. (2005) also showed that gamma-irradiation (0 to 50kGy) decreased the viscosity of gluten film solution due to the cleavage of the polypeptide chains below 16 kGy and increased it by aggregation of the proteins above 32 kGy. Tensile strength of the gluten films was also affected by the gamma-irradiation treatment, resulting in 1.5-fold increase at 50 kGy. Inversely, the

elongation of films was decreased. Finally, the water vapour permeability marked reduced by 29% at 50kGy. They assumed that the formation of a higher molecular weight protein network, aggregated from cleaved polypeptide chains by gamma-irradiation, may contribute to the reduction in WVP and enhancement of mechanical properties. Inamura et al. (2013) in the case of composite gelatin-nut shell fiber after a 40 kGy irradiation dose, they found that thermal stability was improved after electron beam irradiation by the formation of a denser network via arrangement of chains. The exposure of proteins to ionizing radiation can cause conformational changes, oxidations of amino acids, ruptures of covalent bonds (biopolymer degradation), formation of protein free radicals, recombination or polymerization reactions. More generally, most food proteins undergo irradiation-induced cross-linking, which can be used to subsequently improve the film functional properties (Kuana et al., 2013). Gennadios et al. (1998) and Rhim et al. (1999a) found that UV radiation is absorbed by double bonds and aromatic rings, which causes free radical formation in amino acyls (such as tyrosyl and phenylalanyl). These instable products can react together and lead to the formation of intermolecular covalent bonds, which can further enhance physical properties of protein films. They founded that UV treatment (253.7 nm, 81.8J/m²) increases the tensile strength of gluten, zein, and albumin proteins. Inversely, the same dose reduced water vapor permeability of albumin but did not affect water vapor permeability of gluten and zein. Ressouany et al. (1998) also showed similar results in the case of caseinate protein film. They indicated that maximum puncture strength was obtained for all the films at an irradiation dose of 64 kGy, which an optimal irradiation dose is yielding the highest number of crosslinks without inducing protein degradation. Inversely, Micard et al. (2000) reported that gamma irradiated gluten films, in solid state, displayed an increased tensile strength and a decreased elongation at 10 kGy, while higher radiation doses (20 and 40 kGy) reduced the observed effect due to the polymer degradation.

Radiation crosslinking of polysaccharide has been reported by Yoshii et al. (2003). They showed that water-soluble polysaccharides derivatives, such as carboxymethylcellulose, carboxymethylstarch, carboxymethylchitin, and carboxymethylchitosan, lead to radiation crosslinking at high concentrated aqueous solution. Recently, gamma-ray (25, 50 and 70kGy) induces crosslinking of chitosan in the powder form in the presence of CCl₄ (Ramaprasad et al., 2009). They reported that chitosan film, obtained by casting methods, which normally undergoes degradation when exposed to electron beam irradiation, can be crosslinked when irradiated in the presence of CCl₄. In the same works, from the dissolution it is seen that electron beam crosslinked chitosan film has better crosslinked fraction compared to gamma ray crosslinked ones. They showed also, that mechanical properties of crosslinked chitosan film are increased with irradiation dose (reached the maximum values at 70kGy) due to the increase in crosslinking fraction.

Fang et al. (1997) reported the decrease of the tensile strength and breaking elongation when pure chitosan film was gamma irradiated at 5–25 kGy both in air and nitrogen atmospheres. However, the 2.6 times increase of the tensile strength and 20% decrease of breaking elongation was observed when the chitosan tubes were sterilized by 25 kGy gamma rays (Cao et al., 2005). The increase of both tensile strength and breaking elongation of the pure chitosan film was also observed when the film was gamma irradiated for 14–18 kGy (Yang et al., 2003).

Li et al. (2011) preparing an edible blend film between konjac-glucomannan and chitosan and they showed that the strong intermolecular hydrogen bonds existing between the amino groups of

chitosan and the hydroxyl groups of konjac-glucomannan in the blend films resulting in the enhancement of mechanical properties especially to the blend film (with a 8:2 weight ratio between konjac-glucomannan and chitosan), that the as blend films had good biocompatibility, making it possible to apply the blend film to biomaterial. The amplitude of tensile strength is more remarkable and achieved its maximum value at 111MPa (2 times that of the pure chitosan film without irradiation) when irradiated by 25 kGy. The considerable enhancement in tensile strength of blend films indicated increase of intermolecular interactions between konjac-glucomannan and chitosan due to the low gamma irradiation dose. So it was deduced that low irradiation dose (25kGy) could be an efficient method to modify the konjac-glucomannan /chitosan blend film. Zhai et al. (2004), in the case of blend film composed by chitosan and starch, founded that the tensile strength and the breaking elongation did not changed markedly when modified by 30 kGy gamma irradiation dose. However a micro-phase separation system was observed. So, when irradiation dose increase (60-80kGy), the tensile strength of all the films decreased sharply. This means that high irradiation dose (more than 60kGy) decreases the mechanical properties of the konjac-glucomannan /chitosan blend films due to the molecular chain degradation of chitosan (Kang et al., 2007; Yoshii & Kume, 2000). Moreover, Li et al.(2011) works in konjac-glucomannan-chitosan films showed that the IR spectra of films irradiated by different doses did not change, which means that the irradiation did not form new chemical bonds. So it proved that the free radical polymerization between konjac-glucomannan and chitosan could not be happened. But XRD and SEM analysis displayed that gamma irradiation affect the crystalline structure of the blend film, sequentially influencing its microstructure, and finally brought about changes of its mechanical properties.

The combination of polysaccharide and protein material showed a synergism resulting in a better mechanical property (Lee et al., 2004). It is believed that the presence of pectin and agar in a protein formulation improves the moisture barrier of the resulting films (Letendre et al., 2002). Jo et al. (2005) used two agricultural by-products from plant and animal origins, pectin and gelatin, to prepare biodegradable film and to investigate their mechanical properties and biodegradability under irradiation. Gamma irradiation (10, 20 and 30kGy) of solution formed from mixtures of pectin-gelatin (50%-50%,w/w) is effective to crosslink polysaccharides-proteins film and to improve both gas barrier and mechanical properties. The TS of the 10 kGy-irradiated films is the highest among the treatments but the %E, WVP, and swelling ratio are the lowest. In conclusion, irradiation at 10 kGy increases the mechanical and water barrier properties of the pectin and gelatin-based film. From the present investigation, the preparation of packaging materials with higher functional properties can be obtained using the agricultural by-products and irradiation. But the irradiation dose of the film composition should be determined.

Among the previously described irradiation processes, very few studies relate the effect of electron beam technology on functional properties of protein and polysaccharides film. Most of the uses of electron beam are related to the crosslinking of synthetic polymers, wire and cable at high irradiation dose. Sabato et al. (2007) evaluated the mechanical and thermal properties of films made with Tilapia fish proteins by applying electron-beam radiations (doses from 25 to 200 kGy). They reported a slight improvement of the tensile strength at the irradiation dose of 100 kGy, most probably attributed to the radiation-induced cross-linking of proteins but without confirmation from thermal

analyses. Recently, Perkasa et al. (2013) founded an increase of TS of fish gelatin film after crosslinking, in solid state, using electron beam irradiation at 50kGy irradiation dose. Crosslinking of polymers using electron beam is a good alternative, as that requires limited sample preparation. Moreover, electron beam is fast and does not require any catalyst or temperature increase (Woods & Pikaev, 1994). Furthermore, the yield of crosslinking using electron beam is more important than UV and gamma irradiation.

I.6. Encapsulation of active compound in edible and bio-based films

I.6.1. Enhancement of edible films functionalities by active compounds: food applications

Edible films are progressively used to improve the quality of fresh, frozen, and manufactured food items and to extend their shelf life (Porta et al., 2011). To increase their functionalities, a new generation of edible films is being especially designed by incorporating natural or chemical antimicrobial agents, antioxidants, enzymes or functional ingredients such as probiotics, minerals and vitamins (Bifani et al., 2007). Edible films have advantages over direct applications of the antimicrobial or antioxidant agents because they can be designed to slow down the diffusion of the active compounds from the surface of the food. Edible films can enhance the nutritional value of foods by carrying basic nutrients and/or nutraceuticals in its matrix. The sensory quality of food products can also be improved when they are packed by edible films incorporating flavour and pigment.

I.6.1.1. Antioxidants agents

Many different chemical compounds have shown some antioxidant activity through different mechanisms of action. According to Laguerre et al.(2007), these mechanisms result in antioxidant activity of a particular compound, such as singlet oxygen deactivation, peroxide enzyme inhibition, chelation of transition metals, enzymatic detoxification of reactive oxygen species, and their stabilization through hydrogen radical transfer.

Main categories of natural antioxidants are tocopherols (α , β , γ or δ), phenolic compounds (flavonoids, tannins, quercetin, phenolic acids such as ferulic acid, protocatechuic acid, and caffeic acid, resveratrol, and anthocyanins), carotenoids (β -carotene, cryptoxanthin and lycopene), plant extracts, essential oils (thymol, carvacrol, eugenol, cinnamaldehyde,..), phospholipids, ascorbic and citric acids. These antioxidants have been incorporated into active packaging systems in different forms; such as, independent sachet packages, coating on packaging material surface, incorporated into packaging polymer films, multilayer films, and covalent immobilization onto the film surface (Tian et al., 2013).

Incorporation of antioxidants in edible films-forming preparations to increase product shelf life by protecting foods against oxidative rancidity, degradation, and discoloration becomes very popular (Baldwin et al., 1995). We can note also that most antioxidant compounds have antimicrobial

properties. The appropriate selection of the antioxidant compound becomes the crucial step in manufacture of antioxidant film for food packaging (Gomez-Estaca et al., 2014). The antioxidant compounds and the film material should be compatible in order to achieve a homogeneous distribution of antioxidants and therefore to favour its release on all food contact surface. In the last decade, many edible materials incorporating antioxidants have been tested as protectors against the deleterious effect of microbial contamination and oxidation, both on fresh cut vegetables such as lettuce, pieces of fruits or vegetables, and grated or sliced products such as cheese, meat and fish. Some examples of studies performed on these foodstuffs are given in **Table I.11** as a function of active compounds, and films materials. Extending the shelf life of fresh or lightly processed food, not able to be heat sterilized or pasteurized, using active edible films is certainly one of the great challenges for the food industry in the near future. For instance, the application of edible films on fruits and meats products, include the use of citric and ascorbic acid, α -tocopherol and essential oils in order to prolonging shelf life, to inhibit oxidation and to preserve color of the product during storage. Mei et al. (2002) demonstrated that edible films made with a mixture of xanthan gum, calcium lactate and α -tocopherol can decrease the white discoloration, but increase the orange color of baby carrots during 3 weeks of storage. Also, the edible film maintained the quantities of β -carotene, and increases the nutrition value of vitamin E and calcium in the carrots (Mei et al., 2002; Han et al., 2005). Oxygen could have a very negative effect on the colour of meat products, due to the spontaneous oxidation of myoglobin to form metmyoglobin, which imparts brownish colour (Bekhit and Faustman, 2005). For this reason, the application of antioxidant films to meat products may be beneficial. Jung et al. (2009) developed a horseradish-coated film containing natural antioxidants that efficiently enhanced the stability of both pork and fish. Zinoviadou et al. (2009) showed that antimicrobial films prepared by incorporating oregano oil into sorbitol-plasticized whey protein isolate films was effective in increasing the beef shelf life by a factor of 2, while minimizing changes in colour. Maizura et al. (2007) reported that starch-alginate edible films containing lemon grass oil are effective in inhibiting the growth of *Escherichia coli* O157:H7 at all levels. However, generally all these studies showed their efficacy in vitro against various microorganisms but they were not tested with real foods. The incorporation of essential oils into milk protein-based edible film applied onto muscle meat helps to reduce microbial load and to increase antioxidative activity, during 7 days of storage (Oussalah et al., 2004). These results showed also that the inhibition growth of *E. coli* O157:H7 and *Pseudomonas SPP*, by essential oils depend on the nature and the concentration of the phenolic compounds. Oregano-based films exhibited the most effective antimicrobial property, whereas pimento-based films presented the highest antioxidant activity. Gómez-Estaca et al. (2010) reported that when the complex gelatin-chitosan film incorporating clove essential oils was applied to cod fish during chilled storage, the growth of microorganisms is considerably reduced in gram-negative bacteria, especially enterobacteria, while lactic acid bacteria remains practically constant for much of the storage period. Furthermore, Gómez-Estaca et al. (2007) reported that the stability of cold-smoked sardine muscle is improved by coating the muscle with functional gelatin- based edible films. Films enriched with oregano or rosemary extracts are able to slow lipid oxidation, but they fail to slow microbial growth.

Friedman et al. (2009) discovered that carvacrol in apple films inhibited the growth of *E. coli* O157:H7 on the surfaces of raw chicken breast. Moreover, the sensory panel preferred carvacrol-containing tomato film chicken wraps over the corresponding apple film wraps (Avena-Bustillos et al., 2009).

These findings suggest that edible films containing antibacterial essential oils can be used to protect raw chicken pieces against bacterial contamination without adversely affecting sensory preferences of cooked wrapped chicken pieces. Hua et al. (2011) reported that tomato and apple edible films containing 3% cinnamon, allspice, thyme, and oregano oil inhibit the growth of the aflatoxin produced by fungi on almond surface during storage. These results suggested that the use of edible films as carriers of natural antioxidants constitutes an approach for external protection of almonds against microbial growth and oxidization.

Extracts like tea extracts (Li et al., 2014), fruit and vegetables extracts (Akthar et al., 2012) ginseng extract (Norajit et al., 2010) and plant extracts (Gomez-Estaca et al., 2009), possess excellent antioxidant activity, can retard lipid oxidation, and improve the quality and shelf life of various food when they are incorporated in films packaging (**Table I.11**). The antioxidant activity of these extracts results mainly from phenolic compounds and their synergistic, antagonistic, and additive effects (Krochta et De Mulder-Johnson, 1997). Several studies on antioxidant and antiradical extracts that confer color to films have been published (Gomez-Estaca et al., 2009, Akthar et al., 2012). In addition, it has been well documented that extracts exhibit coloring and antioxidant properties that, in some cases, allow good control against photo-oxidation through reduced light transmission, especially UV radiation (Li et al., 2014).

I.6.1.2. Antimicrobial agents

Common chemical antimicrobial agents used in food systems, such as benzoic acid, propionic acid, sodium benzoate, sorbic acid, and potassium sorbate, may be incorporated into edible films and coatings to inhibit the outgrowth of both bacterial and fungal cells (Cha et Chinnan, 2004). Ouattara et al. (2000) showed that the preparation of antimicrobial films by the inclusion of acetic and propionic acids into a chitosan matrix inhibits the surface spoilage bacteria in processed meat. The growth of *Enterobacteriaceae* and *Serratia liquefaciens* was delayed or completely inhibited, whereas lactic acid bacteria were not affected (Ouattara et al., 2000). Cagri et al. (2001) reported antimicrobial WPI films containing *p*-aminobenzoic acid or sorbic acid for inhibition growth of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7, and *Salmonella* Typhimurium DT104. These antimicrobial compounds, when establish contact with food, inhibit the development of microorganisms present in the surface (Appendini et Hotchkiss, 2002). However, due to the health concerns of consumers related to chemical preservatives, the demand for natural foods has spurred the search for natural biopreservatives in edible films-forming preparations. The most frequently used biopreservatives for antimicrobial are lysozyme and nisin. These biopreservatives are shown bactericidal effect on Gram (+) bacteria but they can also become effective on Gram (-) bacteria if they are combined with chelating agents such as ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Sivaroban et al., 2008). Common other biopreservatives that may be used in edible films are bacteriocins, such as lactacin (Scannell et al., 2000) and pediocin (Santiago-Silva et al., 2009) and antimicrobial enzymes, such as chitinase and glucose oxidase (Suppakul, 2003). The use of these biologically derived antimicrobials in biobased edible films is recently attracting increasing interest, particularly for their antilisterial activity. Natrajan et Sheldon. (2000) reported on the inclusion of nisin in calcium alginate films that were subsequently applied to poultry skin contaminated with *Salmonella* Typhimurium *Nar* and led to reduce ranging between 1.8 to 4.6 log cycles after 72 to 96 h of exposure, at 4°C. Cha et al.(2002)

reported that magnesium-alginate film containing nisin and lysozyme inhibited gram-positive and gram-negative bacteria. Ko et al. (2001) founded the efficiency of soy/whey protein, and egg albumin-based films containing nisin against *L. monocytogenes*. Padgett et al.(2000) displayed the effects of nisin incorporated corn zein film on water permeability and inhibition of bacterial growth. The film containing nisin reduces the cell count, as well as increases the inhibition zone. Moreover, wheat gluten and gelatin films containing bacteriocins and other antimicrobials has been proposed for foods that can be potentially contaminated with *Listeria monocytogenes*, such as meat foods, fruits and vegetables (McCormick et al., 2005; Iburguren et al., 2010). **Table I.11** shows some example of antimicrobial agents incorporated in biobased films for food packaging application.

I.6.1.3. Others actives agents

Beside the advantage uses of plant extract to improve functionality of edible films, probiotic and nutraceuticals can be also investigated for food packaging application. Recently, edible biobased films can be used as a host for carrying basic nutrients and/or nutraceuticals that are presents at only low quantity in fruits and vegetables. Recently, Tapia et al.(2007) showed that alginate- and gellan-based edible films seem to be efficient in supporting *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on fresh-cut apple and papaya. Indeed, values greater than 10^6 CFU/g of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 were maintained for 10 days during refrigerated storage of fresh-cut apple and papaya. However, the bifidus-containing films were more permeable to water vapour than the corresponding cast films. The use of edible films based on fructo-oligosaccharides showed benefits like their specific physiological effect on human digestive track especially growth stimulation of beneficial bifidobacteria in the digestive tract, low calorific value and non-cariogenicity (Ramesh and Siddalingaiya, 2006). The development of nutritionally fortified edible films strongly depends on the type of carriers (film-forming materials), the type and the concentration of nutraceuticals added into the film-forming solutions (Park and Zhao, 2004). Nutraceuticals as calcium, zinc, or vitamin E incorporated in a chitosan based film matrix provided alternative ways to fortify fresh fruits and vegetables (Park and Zhao, 2004).

Table I.11. Encapsulation of active compounds on edible and biobased films to food application

Films composition	Active compound	Application	References
Milk protein	Oregano and/or pimento essential oils	Beef muscle	Oussalah et al.(2004)
Soy protein isolat	Ferulic acid	Lard	Ou et al. (2005)
Whey protein isolat	Oregano oil	Beef	Zinoviadou et al. (2009)
Whey protein isolat	P-aminobenzoic acid or sorbic acid	Culture media	Cagri et al.(2001)
Whey protein isolat	Oregano	Strawberry	Du et al.(2011)
Gelatin	Tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles	Fish oil	Bao et al.(2009)
Fish gelatin	Oregano and rosemary	Culture media	Gómez-Guillén et al. (2011)
Commercial fish gelatin	Borage extract BHT α -tocopherol	-	Gómez-Estaca et al.(2009)
Gelatin-based films with chitosan	Rosemary or oregano essential oils	Cold-smoked sardine	Gómez-Estaca et al.(2007)
Bovine-hide gelatin and chitosan	Clove	Cod fish	Gómez-Estaca et al.(2010)
Wheat gluten	Nisin	Turkey Bologna	McCormick et al.(2005)
Zein	Gallic acid; p-hydroxy benzoic acid; ferulic acids; catechin; flavone; quercetin.	-	Arcan and Yemenicioğlu (2011)
Alginate	Nisin	Poultry	Natrajan and heldon.(2000)
Alginate-gellan	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Fresh-cut apple and papaya	Tapia et al.(2007)
Magnesium-alginate	Nisin and lysozyme	Culture media	Cha et al.(2002)
Starch-alginate	Lemon grass oil	Culture media	Maizura et al.(2007)
Xanthan gum and calcium lactate	α -tocopherol	Carrots	Mei et al.(2002)
Chitosan	Acetic/propionic acid	Buffer	Ouattara et al.(2000)
Chitosan	Acetic/propionic acid	Meat	Ouattara et al.(2000)
Chitosan	Nisin	Poultry	Natrajan and heldon.(2000)
Chitosan	Vitamin E	Fresh fruits and vegetables	Park and Zhao.(2004)
Chitosan	Divergicine M35	Smoked salmon	Benabbou et al.(2008)

Films composition	Active compound	Application	References
Apple puree, tomato puree	Carvacrol, cinnamaldehyde	Spinach	Du et al.(2011)
Apple puree, tomato puree	Cinnamon, allspice, thyme, oregano	Almond	Hua et al.(2011)
Methylcellulose-polyethylene glycol (3g:1ml) stearic acid	Ascorbic acid, citric acid	Mushroom and cauliflower	Ayranci and Tunc.(2003)
Cellulose	Pediocin	Meat	Ming et al.(1997)
Cellulose	Nisin/Lacticin 3147	Cheese/ham	Scannel et al.(2000)

I.6.2. Effects of active compounds on physicochemical and structural properties of edible films

Several researchers have previously reported on the potential benefits of using antimicrobials and antioxidants compounds in edible and bio-based films for food extending shelf life (Natrajan et Sheldon, 2000; Chen et al., 1996; Oussalah et al., 2004; Ouattara et al., 2000). However, little information exists about the influence of these compounds over films structural and physicochemical properties. Edible films can increase the shelf-life of foods by providing barrier properties against migration of moisture, gases, and vapor (Kunte et al., 1997), functioning as a carrier of food ingredients, additives, antioxidants and antimicrobial agents, and offering mechanical protection of foods (Ko et al., 2001). The interaction between the added active agents and film-forming materials can also affect the mechanical properties, water vapor and oxygen permeability of the resulting films. Wu et al. (2013) founded that the incorporation of green tea extract in silver carp skin gelatin film, improved the antioxidant activity and directly affected the properties most likely due to the interactions between protein chains and phenolic compounds. They showed that higher green tea extract content incorporated into gelatin films revealed significantly higher tensile strength and lower elongation at break, water solubility and water vapor permeability. Moreover, the thermal stability of gelatin- green tea extract films was improved and raised with the increasing concentration of extract. In the same case, Rattaya et al. (2009) reported that seaweed extract, significantly ($p < 0.05$) decreases the water vapor permeability and film solubility of fish skin gelatin film. Thermal stability was also improved after antioxidants addition. Thus, the addition of seaweed extracts has the impact on the property of fish skin gelatin film, most likely due to the enhanced formation of protein cross-links. This finding is confirmed by Hoque et al. (2011) in the case of cuttlefish skin gelatin film incorporated by herb extracts (cinnamon, clove and star anise extracts). These authors founded a significant increase of TS and inversely a decrease of WVP when herb extracts are added (**Table I.12**). They revealed the presence of crosslink between gelatin and active compounds, using electrophoretic and FTIR study.

Kavoosi et al. (2014) studied antioxidant and antibacterial activity of gelatin incorporated with *Zataria multiflora* essential oil (2 to 8% w/w of gelatin). They founded that beside their excellent antibacterial properties against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, bioactive films have new functional properties. So, as *Zataria multiflora* essential oil is hydrophobic material, it favorably interacts with hydrophobic domain of gelatin and may hinder polymer chain-to-chain interactions and consequently, causes an increase in films solubility and water vapour permeability. At the same time, elongation at break increases but tensile strength and Young's modulus significantly decreases ($p < 0.05$). Gomez-Estaca et al. (2010) reported that gelatin-chitosan films in the presence of essential oil, show a significant increase in the film solubility which is in accordance with previous results. Furthermore, Pranoto et al. (2004) showed a marked decrease of TS and increase of WVP for alginate based film containing garlic oil (0.4 % v/v). It probably occurred due to the hydrophobic property of garlic oil. In this system, garlic oil might contribute to extend intermolecular interactions of the structural matrix in alginate film; therefore, it enhanced moisture passing through the edible film.

A reverse tendency was observed, on water barrier and mechanical properties, when essential oils of lemon, thyme or cinnamon incorporated in chitosan film before casting (Peng and Li, 2014). These authors showed that WVP and water content decreases with the addition of essential oils, particularly the WVP of chitosan-Lemon-Cinnamon film decreased from 9.36 to 7.52×10^{-11} g/m.s.Pa (**Table I.12**). The tensile strength of chitosan-Cinnamon and chitosan-Lemon-Cinnamon film increased by 12% and 19%, respectively, compared with the control film. Similarly, Ojagh et al. (2010) reported that the tensile strength increases when introducing cinnamon essential oil into chitosan films, but the elongation percentage decreases. However, Sánchez-González et al. (2010) reported that the tensile strength and elongation at break of chitosan film decreases with the incorporation of bergamot oil. Because the tensile strength and elongation at break are usually related to the film network microstructure and the intermolecular force (Atarés et al., 2010), the contradictory results may be related to the nature, the concentration, reactive site and groups of antioxidants agents. For water transport properties, essential oils as lipid compounds are known to enhance the water barrier properties of polymer based films because of their hydrophobic nature (Sánchez-González et al., 2009; Du et al., 2011). Water vapour transfer generally occurs through the hydrophilic portion of the film; thus, water vapour permeability depends on the hydrophilic-hydrophobic ratio of the film components (Hernández, 1994). Water vapor permeability increases with polarity, unsaturation, and branching degree of the lipid, depending also on the water absorption properties of the polar part of the film (Gontard et al., 1994). Essential oil's chemical nature also plays an important role in the barrier properties of edible films. Phenolic compound containing an alcohol group (carvacrol) in its chemical structure seems to be a good barrier compared to aldehyde compounds (e.g., cinnamaldehyde, citral) because the hydroxyl group has less affinity for water than for the carbonyl groups. Peña et al. (2010) using tannin as antioxidant incorporated in protein film, they showed that hydrogen and/or hydrophobic interactions between gelatin and tannin molecules induce changes in the formation of triple helix in gelatin and surely reduce the mobility of the side chains, and increment of the glass transition temperature of resulting films. An optimum tannin content around 10 wt% in gelatin-tannin films gives rise to strong, thermally stable, moisture resistant and flexible films. Furthermore, crosslinking bovine gelatin films with tannic acid results in reduction of film solubility by about 80% (Zhang et al., 2010). Tammineni et al. (2014) founded that tensile strength of bovine gelatin increases, inversely water solubility and water vapour permeability reduces with tannic acid incorporation ($P > 0.05$) and does not vary significantly for fish gelatin films (**Table I.12**). In the same study, bovine and fish gelatin films with highest level of tannic acid (0.15g/g of gelatin) showed an increase in glass transition temperature of approximately 12 and 6 °C, respectively for bovine and fish gelatin.

Beside its use as antioxidant agent, ferulic acid is found to covalently link to polysaccharides by ester bonds (Mueller Harvey et al., 1986), and consequently enhances various film properties. Mathew and Abraham. (2008) showed that, the incorporation of ferulic acid improve the barrier properties and tensile strength of starch-chitosan blend films as well as their lipid peroxide inhibition capacity. Moreover, such increase in tensile strength in the presence of ferulic acid was also observed for gelatin-soy protein films (Cao et al., 2007a) and for soy protein films (Ou et al., 2005). Fabra et al. (2011) showed a decrease in oxygen permeability of sodium caseinate film only due to ferulic acid or α -tocopherol addition at a 60 mg/g concentration). This can be explained by the cross-linking

between ferulic acid/ α -tocopherol and amino acid residues of the protein which makes the matrix tighter and limits oxygen transfer. But they observed a slight decrease of the film resistance to break (without significant changes in stretchability) and water barrier properties when both antioxidants are incorporated into the protein matrix (**Table I.12**).

Ko et al. (2001) founded that the incorporation of nisin into WPI film-forming solutions may have caused rearrangement of disulfide and hydrophobic bonds or more protein-protein interactions, resulting in increased TS for WPI films. Theoretically, addition of nisin would be expected to improve water barrier property of films by hydrophobic interactions with protein constituents because nisin itself is a hydrophobic protein (Klaenhammer, 1993). However, nisin at the added amounts (from 3 to 120,000 IU/15 mL of film solution) had no significant effect on the WVP values of WPI films.

Antioxidants have been also used as plasticizer in edible films. Yoon et al. (2014) founded that ascorbic acid added as a plasticizer on potato starch-based blend films with and without heat curing enhances mechanical, water barrier, thermal, and optical properties compared the control films. Moreover, mechanical and water barrier properties of the ascorbic acid -added film are also greater to those of other films with polyol plasticizers (glycerol and xylitol). Similarly Park et al. (2001) showed an increase on TS and a decrease of WVP after incorporation of ascorbic acid as plasticizer on chitosan and k-carrageenan films (**Table I.12**).

Table I.12. Effect of active compounds addition on mechanical and water barrier properties of edible films

Films	Active compounds	TS (MPa)	WVP (10^{-11} g/m.s.Pa)	References
Chitosan	Control	41.5 ±2.5 a	9.3±0.2 a	Peng and Li.(2014)
	Lemon and cinnamon (1/100)(v/v)	50±2 b	7.5±0.5 b	
Chitosan	Control	3.2±0.7 a	360± 20 a	Park et al.(2001)
	Ascorbic acid (3%)(v/v)	4.7±0.8 b	300± 20 b	
k-Carrageenan	Control	30.2±13.1 a	190±3 a	Park et al.(2001)
	Ascorbic acid (3%)(v/v)	37.8±8.4 b	160±2 b	
Alginate	Control	66.12 a	22653 b	Pranoto et al.(2004)
	Garlic oil (0.4 %(v/v)	38.67 b	34442 b	
Sodium caseinate	Control	27.1±1.6 a	16470±270 a	Fabra et al.(2011)
	Ferulic acid (60mg/g of film)	23±0.8 b	12150±1350 b	
	α –tocopherol (60mg/g of film)	20±0.8 c	13500±1890 a,c	
Bovine gelatin	Control	4.4±0.26 a	5900±370 a	Kavoosi et al.(2014)
	Zataria multiflora essential oil 4 % (w/w of gelatin)	3.4±0.23 b	6750±590 a,b	
	Zataria multiflora essential oil 8 % (w/w of gelatin)	2.7±0.18 c	8370±702 b	
Bovine gelatin	Control	48±1.8 a	56700±4050 a	Tammineni et al.(2014)
	Tannic acid (0.15g/g of gelatin)	55±2 b	43200±3520 b	
Fish gelatin	Control	21±1.8 a	48600±3240 a	Tammineni et al.(2014)
	Tannic acid (0.15g/g of gelatin)	16±2 b	45900±4050 a	
Pigskin gelatin	Control	95±5 a	-	Peña et al.(2010)
	Tannin at 10%(w/w)	105±8 a	-	
	Tannin at 30%(w/w)	70±4 b	-	

Films	Active compounds	TS (MPa)	WVP (10^{-11} g/m.s.Pa)	References
cuttlefish skin gelatin	Control	32.78±3.10 a	9.6±0.3 a	Hoque et al. (2011)
	Clove extract 1% (w/w)	39.04±1.43 b	7.7±0.7 b	
	Oxidized clove extract 1% (w/w)	43.11±1.82 c	8.8±0.5 c	
silver carp skin gelatin	Control	25.25±1.17 a	11±0.36 a	Wu et al. (2013)
	Green tea extract (0.7% (w/w)	36.88±1.22 b	9±1 b	
Soy protein isolate	Control	1.47±0.044 a	2656±69 a	Ou et al.(2005)
	Ferulic acid (50mg/100g film)	1.68±0.13 b	2610±57 a	
	Oxidized Ferulic acid (50mg/100g film)	-	2311±149 b	
Whey protein isolate	Control	1.95±0.39 a	39100±1350 a	Ko et al. (2001)
	Nisin (4-160 IU/film disk); pH=3	3.5±0.34 b	42930±3240 a	
Soy protein isolate	Control	8.59±0.94 a	46440±1890 a	Ko et al. (2001)
	Nisin (4-160 IU/film disk); pH=3	10.43±2.53 a	47790±540 a	
Wheat gluten	Control	1.80±0.60 a	71280±8370 a	Ko et al. (2001)
	Nisin (4-160 IU/film disk); pH=3	1.96±0.76 a	58050±6210 a	
Egg albumin	Control	1.79±0.21 a	65070±4860 a	Ko et al. (2001)
	Nisin (4-160 IU/film disk); pH=4	1.39±0.18 a	59400±6480 a	

Value in same column and type of film, with different superscript letter are significantly different ($p < 0.05$).

I.6.3. Controlled release of active compounds from edible films after crosslinking

Controlled release systems have been developed and used extensively for pharmaceutical applications (Brayden, 2003). Different strategies for achieving controlled release of drugs, and preparation and modeling of drug delivery systems have been reported (Siepmann and Peppas, 2001; Arifin et al., 2006). However, the studies in the field of food packaging are very limited although controlled release of active agents through food packaging materials is an essential feature to provide desired concentrations on food surfaces. Han and Floros. (1998) are one of the first researchers who used the concept of controlled release in food packaging applications. They suggested controlling the release kinetics of antimicrobials by using a multilayer structure. Ozdemir and Floros. (2003) formed a controlled release system by dispersing hydrophobic wax particles within a hydrophilic film matrix, thus, increasing hydrophobicity and tortuosity of the films against the diffusion of antimicrobial agent. Lacoste et al. (2005) proposed to use smart blending technique to develop controlled release packaging materials. Buonocore et al.(2004) has encapsulated the active compounds in a polymer matrix and tried to control the release rates by changing the concentration of crosslinking agent in the matrix. They founded that, changing the film structure under crosslinking reaction increase the retention of active compounds in polymer networks and thus controlled its release during time. In addition, Berger et al. (2004) showed that the release of the antioxidant from the films might also be related to the film microstructure densification by crosslinking or grafting. Cheng et al.(2008) using formaldehyde as crosslinking agents for soy protein films in order to controlled release of rifampicin from films network to aqueous medium at different pH. They founded a strong dependence of the drug model release rate on the concentration of formaldehyde used to make the films stiffer. So, they showed that higher degrees of crosslinking are likely responsible for slower erosion of the protein networks and hence retaining the drug models for longer times. Although the results presented suggest that over 70% of the loaded compound remains in soy protein film after 6 h compared to non-treated films. Therefore, crosslinking density appears to offer effective means of regulating the release rate of compounds from soy protein films. Rosenberg. (1999) showed the ability of glutaraldehyde to crosslink and to reduce the release rate of theophylline from whey protein-based microcapsules in water media. In the same way, Latha et al. (1995) indicated that glutaraldehyde cross-linked casein based microcapsules exhibited, to a varying extent properties desired for controlled core release. Oussalah et al. (2007) showed that immobilization of the alginate-based films in CaCl_2 (2 or 20%) allows controlled release of the active compounds (essentials oils) from the films to the bologna and ham, and when applied this meat products, a lower release was observed for films pretreated with 2% CaCl_2 . In another study, Oussalah et al.(2006) studied the availability of total phenolic compounds or aldehydes after addition of CaCl_2 in alginate films containing essential oils during meat (beef muscle slices) storage. Better insolubilization treatment of films (20 versus 2% CaCl_2) provides a high level of availability of active compounds in alginate-based films at the end of storage. Furthermore, the active compounds were maintained better in the films treated with 2% CaCl_2 . Thus, the treatment of the films in 2% CaCl_2 changes the structure to form a perfect obstruction, which allows controlled release of the active compounds to the beef muscle during storage. Very little studies have established the effects of

irradiation on the retention and release properties of antioxidant compounds encapsulated in biopolymers films. Tin Wui et al. (2002), worked on the influence of microwave irradiation on the drug release properties of polysaccharides beads, showed that the release-retarding property of alginate and alginate–chitosan beads is significantly enhanced by subjecting the beads to microwave irradiation. They showed that microwave technology can be employed in the design of solid dosage forms for controlled-release application without the use of toxic chemical agents. Caillet et al. (2006) showed that structure modifications in biopolymers chains induced by irradiation could increase the capacity of cross-linked edible films to control the release of embedded active compounds. Lacroix et al. (2002) showed that gamma-irradiation was efficient for inducing cross-links in calcium caseinate edible films and thus can be used to immobilize enzyme or active compounds and controlled their release.

Conclusions

Petrochemical based plastics (polyesters, polyolefin, polyamides, etc.) have been so far extensively used as packaging materials, mostly because of their availability in large amounts at low cost. Although they possess favorable mechanical and permeability properties they are totally non-biodegradable, thus leading to dramatic environmental pollution. Recently, the use of edible films as packaging material has been proposed as an alternative to chemically synthesized biodegradable or non-degradable polymeric films and, among these, several films constituted by polysaccharides and proteins have been extensively studied. Mechanical and the barrier properties to the O₂ of protein-based films are better than those possessed by polysaccharide-based films, whereas the latter show a more effective barrier to CO₂. It is well known that these both kinds of macromolecules can establish networks by electrostatic and hydrophobic interactions as well as by covalent and hydrogen bonds. Thus structural and physical properties of blend films are improved. In order to increase their functionalities, blend films can entrap active compounds (antimicrobial and antioxidant agents, enzymes, probiotics, minerals and vitamins). Beside their uses to produce active and edible films for food application, these compounds would improve barriers and mechanicals properties of films. As the main role of active films is to extend shelf life of food or to improve its organoleptic properties, their concentration on food surface becomes the most important parameters. Therefore, controlled release of active agents through food packaging materials is an essential feature to provide desired concentrations on the food surfaces. Among the technique that can be used to immobilize active compounds in edible films and therefore to control their release, irradiation is able to introduce new molecular linkage between polymers chains and/or between polymers and bioactives compounds. This contributes efficiently to improve retention of active compounds in the film networks. Moreover, crosslinking induced by irradiation enhances mechanicals and barriers properties of films thus are advantageous to make a new ways of applications of active edible films for food packaging.

Chapitre II. Matériels et Méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Les hydrocolloïdes

II.1.1.1. Chitosan

Le chitosan (CS) utilisé dans cette étude est de grade commercial (France chitine, Marseille, France, poudre alimentaire 652, ayant un poids moléculaire de 165 kDa, une viscosité de 43 mPa.s (1% g/g en solution d'acide acétique à 1% et à 25°C) et un degré de désacétylation supérieur à 85%.

II.1.1.2. Gélatine

Deux types de gélatine ont été utilisés dans cette étude :

Gélatine bovine

La gélatine bovine (G) de grade commercial et de 150 degré Bloom a été utilisée pour étudier l'effet du mélange chitosan-gélatine à différentes taux sur les propriétés fonctionnelles des films. Ce type de gélatine a été aussi utilisé pour l'étude de l'influence de l'épaisseur sur les propriétés barrières à la vapeur d'eau des films composés de 25% chitosan-75% gélatine (v/v).

Gélatine de poisson

La gélatine de poisson (FG) de grade commercial (Gélatine pharmaceutique, Rousselot 200 FG 8, de 180 degré Bloom, ayant une viscosité de 4 mPa.s à 45°C (solution de 6,67% dans l'eau et un pH de 5,4) a été utilisée pour étudier l'effet de l'irradiation et de l'incorporation des antioxydants sur les propriétés fonctionnelles de films constitués du mélange 50%chitosan-50%gélatine de poisson (w/w) ainsi pour l'étude de la libération de molécules actives en phase aqueuse.

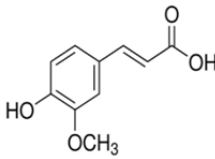
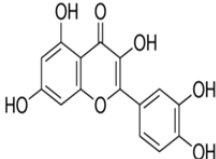
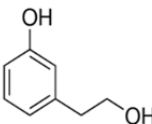
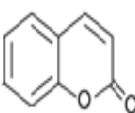
II.1.2. Le Plastifiant

Le glycérol est utilisé comme plastifiant des films. glycérol anhydre (GLY) (Fluka Chemical, Germany) possédant une pureté de 98%, une masse molaire de 92,09 g.mol⁻¹, une densité de 1,257, un point de fusion de 18,6°C, une température de décomposition de 290°C, un log P de -1.8, une pression de vapeur saturante inférieure à 0,1 Pa à 20 °C et une tension de surface de 64 mN.m⁻¹ à 20°C(www.chemspider.com). Il a été ajouté à un taux constant de 10% de la masse sèche du polymère aux formulations afin d'améliorer les propriétés mécaniques des films.

II.1.3. Les antioxydants

L'acide férulique (pureté minimale de 99%, Sigma-Aldrich), la coumarine (pureté minimale de 99%, Sigma-Aldrich), la quercétine (pureté minimale de 95%, Sigma-Aldrich) et le tyrosol (pureté minimale de 98%, Sigma-Aldrich) ont été utilisés comme d'antioxydants naturels modèles encapsulés dans les films de gélatine-chitosan (1 :1, w/w). Leurs principales propriétés physicochimiques (Chemspider.com) sont regroupées dans le **Tableau II.1**

Tableau II.1. Principales propriétés physicochimiques des antioxydants naturels utilisés (Chemspider.com)

Caractéristiques	Acide férulique	Quercétine	Tyrosol	Coumarine
Formule chimique				
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	194,18	302	138	146,14
Point de fusion (°C)	168-172	316	89-92	68-71
Solubilité dans l'eau (g.L ⁻¹) à 25°C	39	0,06	340	1,9
pKa	4,58	7,76	8-12	-
LogP	1,64	1,47	0,85-1,19	1,39
Tension de surface (mN.m ⁻¹) à 25°C	56,2	114,9	50,9	46,4
Point d'ébullition à p atm	372°C	642°C	139°C	298
Pression de vapeur saturante (Pa) à 25°C	3,58x10 ⁻⁴	3,74x10 ⁻¹²	0,133	1,33

II.1.4. Autres composés

II.1.4.1. L'acide acétique

L'acide acétique glacial (Sigma-Aldrich) de pureté 99,85% a permis d'ajuster le pH des solutions filmogènes afin de faciliter la solubilisation du chitosan.

II.1.4.2. L'éthanol

L'éthanol (Sigma-Aldrich) de pureté 96% a été utilisé pour la préparation des milieux de dissolution de la quercétine et comme milieu hydroalcoolique « simulat » pour l'étude de la libération de la quercétine encapsulée dans les films.

II.1.4.3. Les solutions salines saturées

Des humidités constantes connues peuvent être créées par des sels ou des acides dont l'affinité vis-à-vis de l'eau règle la pression de vapeur d'eau dans l'atmosphère confinée. La précision de cette méthode dépend de la régulation de température. Dans le **Tableau II.2** sont présentés les différents sels utilisés pour contrôler l'activité de l'eau de solutions salines saturées. Les sels utilisés pour nos mesures ont été fournis par Prolabo (VWR International, France).

Tableau II.2. Valeurs de l'activité de l'eau (a_w) de diverses solutions sursaturées en sel à 20 °C (d'après Bell & Labuza, 2000).

Sel	Formule chimique	Pureté (%)	a_w de la solution saline saturée (à 20°C)
Gel de silice	Si(OH)_4	100	< 0,01
Nitrate de Magnésium	$\text{Mg(NO}_3)_2$	98	0,53
Bromure de Sodium	NaBr	99	0,57
Chlorure de Sodium	NaCl	99,8	0,75
Chlorure de Potassium	KCl	99,5	0,84

II.1.4.4. Les liquides utilisés pour la détermination de la tension de surface des films

Une série de liquides dont la tension de surface était connue a été utilisée pour calculer la tension de surface des films selon la méthode du point critique de Zisman (Zisman, 1964) ou selon la méthode d'Owens et Wendt (1969). Dans le **Tableau II.3** sont présentées leurs tensions de surface ainsi que leurs composantes polaires et dispersives. Ces différents liquides ont été achetés chez Prolabo (VWR International, France).

Tableau II.3. Valeurs de la tension de surface et ses composantes polaires et dispersives des différents liquides selon (Strom et al, 1987 ; Schultz et al, 1977)

	Tension de surface (mN/m)	Composante Polaire (mN/m)	Composante dispersive (mN/m)
n-octane	21,3	0	21,3
Cyclopentanol	32,7	5,5	27,2
Ethylène glycol	47,7	16,8	30,9
Glycérol	63,4	26,4	37
Eau	72	51	21,8

II.2.Méthodes

II.2.1. Formulation et préparation des films

II.2.1.1. Fabrication des films de chitosan

La solution filmogène à 2% (w/v) à base de chitosan pur a été préparée en dispersant 20 g de poudre de chitosan dans 1 litre de solution aqueuse d'acide acétique à 1% (v/v) sous homogénéisation continu à 1200 rpm à l'aide d'un Ultra Turrax (RW16 basic- IKA-WERKE). Après dispersion complète du chitosan, 10% (w/w du polymère) de glycérol a été ajouté, sous agitation (1200 tpm). Un volume correspondant à une densité de surface de 10 mg de matière sèche/cm² de la solution filmogène (pH=5) a été coulé (casting) dans une boîte de Pétri plastique (13,5 cm de diamètre). Le solvant (eau-acide acétique) a été évaporé par séchage dans une enceinte climatique (KBF 240 Binder, ODIL,

France) à température et humidité contrôlée à 25°C et 45% HR durant 18 à 24h. Les films formés ont ensuite été stockés à 50 % d'HR et à une température de 25°C avant chaque analyse.

II.2.1.2. Fabrication des films de gélatine

Une solution à 6% (w/v) gélatine a été préparée sous agitation magnétique et à une température de 70°C durant 30 min. Après dispersion complète de gélatine, 10% (w/w) de glycérol a été ajouté sous agitation (1000 rpm). Le pH de la solution de gélatine était de 6,5. Les conditions de coulage en boîte de Pétri sont identiques à celles utilisées pour le film de chitosan à la différence qu'immédiatement après coulage, les boîtes étaient placées à 4°C durant 2h pour la gélification. Les étapes de séchage et de stockage des films sont les mêmes que pour les films de chitosan.

II.2.1.3. Fabrication des films issus du mélange de chitosan-gélatine

Dans le but d'obtenir un film de chitosan-gélatine à différentes proportions, les deux solutions filmogènes de biopolymères précédemment décrites ont été mélangées sous agitation magnétique et à une température de 50°C durant 30 min. Le pH de l'ensemble a été fixé entre 5,5 et 6 avec de l'acide acétique ($M=60,0 \text{ g/mol}$; $d=1,049 \text{ g/cm}^3$, molarité= $17,47 \text{ mol/L}$) afin de favoriser la formation d'un complexe polyélectrolytique. En effet, un pH supérieur au point isoélectrique de la gélatine ($pI=4,5-5,2$) lui confère une charge globale négative et au-dessous du pK_a du groupement amine du chitosan ($pK_a=6,2-6,5$) ce dernier est chargé positivement, ce qui favorise les interactions entre les deux biopolymères. Les différents taux du mélange chitosan-gélatine, en pourcentage massique, sont: 50%-50%, 25%-75% et 10%-90%. Un volume déterminé de la solution filmogène du mélange a été coulé dans les boîtes de Pétri plastique (13,5 cm de diamètre) afin d'obtenir une densité de surface de $10 \text{ mg de matière sèche/cm}^2$. Les boîtes ont été placées à 4°C durant 2h pour la favoriser la prise en gel. Les étapes de séchage et de stockage sont les mêmes que pour les films de chitosan et gélatine.

II.2.1.4. Fabrication des films mélange de chitosan-gélatine incorporant des antioxydants naturels

L'incorporation des différents antioxydants utilisés a été réalisée sur le mélange de 50%chitosan-50%gélatine (en pourcentage massique). Les solutions filmogènes du mélange ont été préparées comme décrites précédemment après ajustement du pH. 5% d'antioxydants (masse/masse de biopolymères) ont été ajoutés à la solution filmogène (contenant déjà le glycérol) sous agitation magnétique à 40-50°C avec une vitesse de 1000 rpm, pendant 10 à 15 min à l'abri de lumière. Le coulage et séchage des solutions filmogènes des mélanges chitosan-gélatine contenant les antioxydants ont été identiques aux procédures précédemment décrites.

Les processus de la fabrication des différents types de films sont schématisés dans la **Figure II.1**.

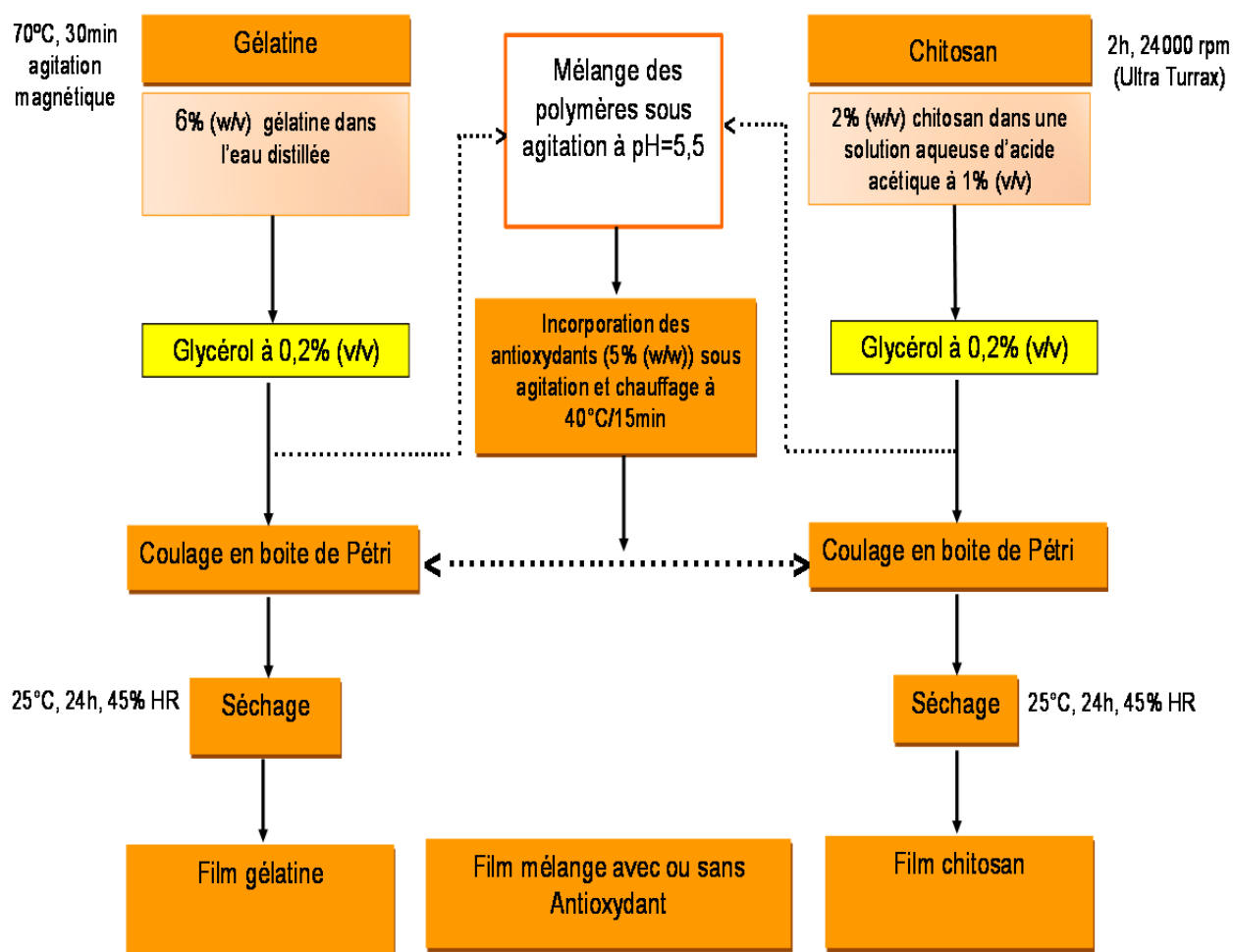


Figure II.1. Processus de fabrication des différents types de films étudiés

II.2.2. Irradiation des films par faisceaux d'électrons

L'irradiation des films a été réalisée dans un accélérateur linéaire d'électrons (**Figure II.2**) pilote du Centre de Ressources Technologiques AgroAlimentaires AERIAL (Park Technologique d'Innovation, Illkirch, Strasbourg, France). Une dizaine de films sèches (préalablement conditionnée à 50% HR) (épaisseur variant entre 65 et 80 μm) ont été placés à température ambiante sur un convoyeur qui se déplace à une vitesse constante sous un faisceau d'électrons d'énergie 2,5Mev. Les doses appliquées dans notre étude sont 20, 40 et 60kGy. Un lot de chaque type de film a été préservé comme film témoin (non-irradié). Le débit de dose utilisée est de 0,3 kGy/sec. Le contrôle dosimétrique du traitement d'irradiation et de la distribution des doses dans le produit a été effectué à l'aide de dosimètres de type alanine calibrés selon les standards ISO/ASTM 51607 (2004). Le dosimètre à l'alanine est un dosimètre constitué d'un acide aminé, l'alanine, dont la molécule est brisée sous l'action des rayonnements ionisants avec formation de radicaux libres. La concentration de radicaux libres formés est proportionnelle à la dose absorbée. La lecture est effectuée par spectrométrie RPE (Résonance Paramagnétique Electronique). Le dosimètre à l'alanine est généralement utilisé comme dosimètre de référence en raison de sa fiabilité. C'est la méthode utilisée en France par le

Laboratoire de Mesure des Rayonnements Ionisants (LMRI). L'irradiation simultanée de dosimètres avec les films, permet d'évaluer la dose effectivement absorbée par les films. L'incertitude globale de la dose absorbée est estimée à 1,2 %.

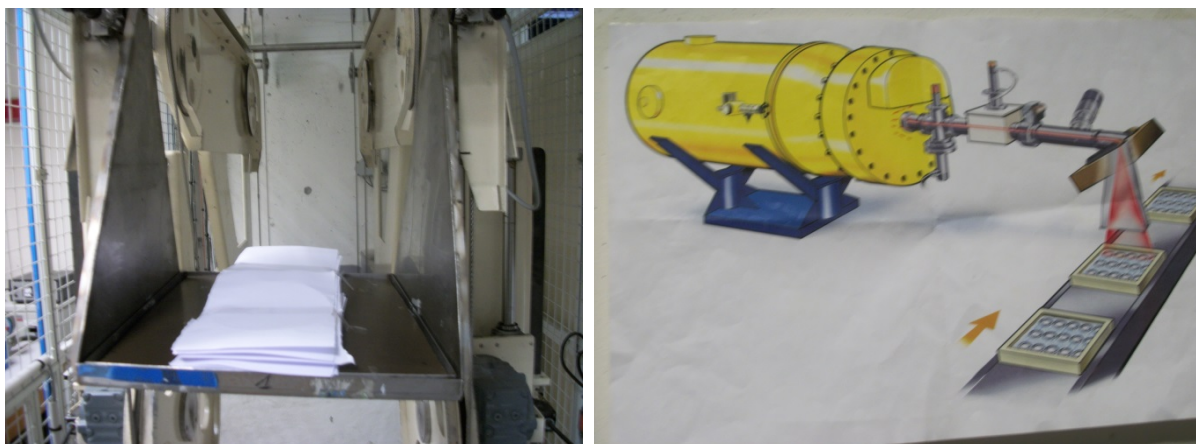


Figure II.2. Pilote d'irradiation par faisceau d'électrons accélérés du Centre de Ressources Technologiques Aériel et schéma de principe.

II.2.3. Caractérisations physicochimique et structurale des films

II.2.3.1. Epaisseur des films

L'épaisseur des films a été mesurée à l'aide d'une jauge d'épaisseur électronique (PosiTector 6000, DeFelsko Corporation, USA) équipée d'une tête de mesure de 5 mm de diamètre à une sensibilité de 2 μm . Cinq mesures ont été prises pour chaque film, une au centre et quatre proches du périmètre de film. L'épaisseur de chaque film était prise comme étant la moyenne arithmétique de ces cinq mesures. L'erreur statistique sur l'épaisseur du film est prise en compte dans le calcul d'incertitude sur la valeur des perméabilités à la vapeur d'eau et à l'oxygène.

II.2.3.2. Couleur des films

La couleur des films a été déterminée avec un colorimètre Minolta (CR-200; Minolta, Japan). Une plaque de couleur blanche standard ($L^*=96,74$, $a^*=0,09$, $b^*=2,20$) a été utilisée comme fond de référence pour la mesure de la couleur des films. Les valeurs mesurées sont L , a et b . Ces valeurs correspondent à : la luminance L : du blanc (+) au noir(-), les indices chromatiques a : du rouge(+) au vert (-) et b : du jaune(+) au bleu (-). La moyenne de trois répétitions a été utilisée pour calculer l'écart de la couleur (ΔE) des films par rapport à la couleur blanche de référence, selon Ghorpade et al. (1995), tel que donné dans l'équation II.1 :

$$\Delta E = \sqrt{(L - L^*)^2 + (a - a^*)^2 + (b - b^*)^2} \quad \text{Équation II.1}$$

où, L^* , a^* et b^* sont les valeurs de référence de la plaque de couleur standard.

II.2.3.3. Observations microscopiques des films

Le microscope électronique à balayage (MEB) environnemental permet l'étude de la surface d'échantillons massifs sous vide modéré et, si nécessaire, en présence d'humidité. Grâce à la "chambre environnementale", la métallisation préalable des échantillons introduits pour les rendre conducteurs (et éviter l'effet d'accumulation de charges sur le polymère non conducteur) n'est plus indispensable et il est possible de travailler en présence de vapeurs jusqu'à des pressions de 8 à 12 torr (environ 35-40% d'HR à 5°C). Les observations microscopiques des films (plage d'agrandissement de 500 à 1 000 fois) ont été réalisées par un Microscope Electronique à Balayage Environnemental (ESEM, Phillips XL 30 ESEM, Japan). L'appareillage consiste en une colonne à électrons qui crée un faisceau d'électrons, d'une chambre où l'échantillon est introduit et d'un système d'imagerie qui construit l'image à partir du signal. L'émission d'électrons se fait grâce à un filament de tungstène et accéléré à une tension de 8 KV et sous un vide de l'ordre de 3 mm Hg. Ce faisceau électronique est dirigé vers la surface de l'échantillon et interagit avec lui en pénétrant dans sa masse. Les électrons rétrodiffusés sont détectés par un capteur d'intensité et transmis à un écran vidéo dont le balayage est synchrone avec celui de faisceau. Un échantillon de film de forme rectangulaire (~5 x 10 mm²) a été coupé avec une lame de rasoir neuve et fixé sur un support métallique à l'aide d'un ruban adhésif à double face, en formant un angle de 90° avec le socle métallique du porte-échantillon et ceci pour l'observation en coupe transversale (tranche). Les échantillons ont été équilibrés sous P₂O₅ puis examinés dans leur état naturel sans aucune modification ou préparation particulière.

II.2.3.4. Teneur en eau des films

Pour déterminer la teneur en eau des films, des échantillons (environ 100 mg) ont été séchés dans une étuve (PROLABO, 220 V, 4-5 A) à une température de 105°C pendant 12h jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Dans ces conditions, l'évaporation du plastifiant (glycérol) dans les films est considéré comme négligeable. La perte de masse de chaque échantillon a été déterminée, puis leur teneur en eau a été calculée:

$$W_c(\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_f} \times 100 \quad \text{Équation II.2}$$

où : m_i est la masse initiale des films avant séchage, et m_f , la masse des films après séchage.

II.2.3.5. Solubilité dans l'eau

La solubilité dans l'eau des différents films a été définie comme étant la quantité de matière sèche solubilisée, après 24 h d'immersion, dans l'eau distillée. Elle a été déterminée selon la méthode décrite par Cuq et al (1996). Un échantillon de film (disque de 2 cm de diamètre) a été séché jusqu'à masse constante dans une étuve à 105°C afin de déterminer la masse sèche initiale (m'_i). Cet échantillon de film a été immergé dans 30 mL d'eau distillée à 25°C. Après 24 h d'immersion, le contenu restant de film a été retiré et séché, jusqu'à masse constante dans les mêmes conditions que précédemment afin de déterminer la masse sèche non solubilisée dans l'eau (m'_f). La solubilité de film dans l'eau (FS, %) a été calculée comme suite :

$$FS(\%) = \frac{(m'_i - m'_f)}{m'_i} \times 100 \quad \text{Équation II.3}$$

La valeur moyenne de la solubilité a été calculée comme la moyenne arithmétique de quatre mesures pour chaque film.

II.2.3.6. Propriétés barrières des films

II.2.3.6.1. Perméabilité à la vapeur d'eau

La perméabilité à la vapeur d'eau a été déterminée selon la méthode gravimétrique décrite dans les normes américaine ASTM E96-80 (1980) et française NF EN ISO 25 28 (2001-09) applicable aux matériaux d'emballage sous forme de feuilles. Nous avons utilisé la méthode modifiée et adaptée aux films comestibles et/ou hydrophiles par Debeaufort et al. (1993). Cette méthode consiste à suivre, au cours du temps, la prise de masse ou la perte de masse d'une cellule de perméation contenant de l'eau ou une solution saline saturée, et obturée par le film à tester et stockée dans une enceinte ayant une humidité relative différente (**Figure II.3**).

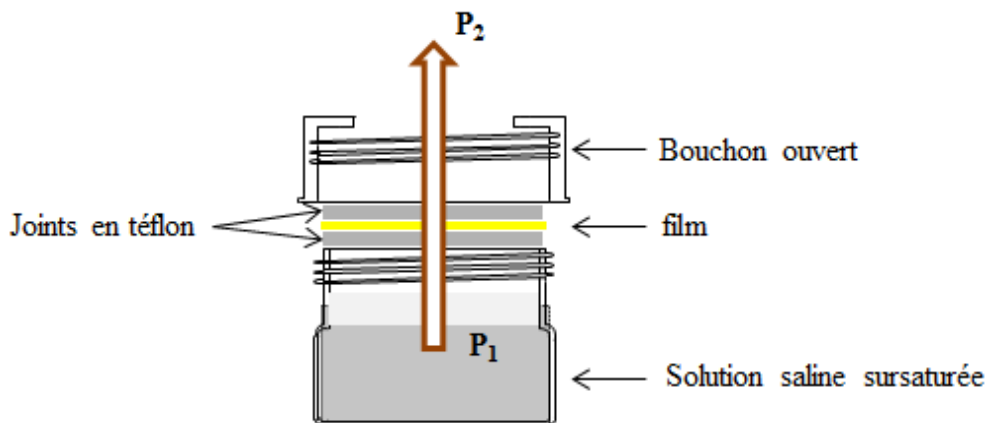


Figure II.3. Schéma d'une cellule de perméation utilisée pour la mesure des transferts de vapeur d'eau.

Avant toute détermination, cinq disques de film d'un diamètre de 4,2 cm (dont 3,5 cm de diamètre sont exposés au transfert) ont été découpés et sont préalablement conditionnés à une température de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ et à une humidité relative de 30 % pendant 72 h. Puis, ils sont fixés entre deux joints téflon sur la cellule contenant soit de l'eau distillée, assurant à l'intérieur de la cellule une humidité relative proche de la saturation, soit une solution saline saturée permettant de fixer des humidités relatives de 75% (NaCl) ou 84% (KCl), soit du gel de silice (HR voisine de 0%). Les cellules sont ensuite disposées dans une enceinte climatique (KBF 240 Binder, ODIL, France) réglée à une température de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ et à une humidité relative de 30%. Dans notre étude quatre gradients d'humidité relative ont été utilisés : 0-30%, 30-75%, 30-84% et 30-100%. Après l'établissement du régime stationnaire du transfert, des pesées périodiques des cellules de perméation permettent de déterminer la perméabilité à la vapeur d'eau (WVP, exprimée en $\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$) comme suit :

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t \times A \times \Delta p} \times e \quad \text{Équation II.4}$$

où Δm représente la variation de la masse (g) de la cellule pendant un temps Δt (s), e l'épaisseur du film (m), A la surface d'échange du film exposée au transfert de vapeur d'eau ($9,08 \times 10^{-4} \text{ m}^2$), et Δp ($= p_2 - p_1$) la différence de pression partielle de vapeur d'eau (Pa) de part et d'autre du film. Les pressions partielles de vapeur d'eau sont calculées à partir de la valeur d'humidité relative et de la valeur de la pression de vapeur d'eau saturante à la température de mesure. Cinq répétitions pour chaque formulation de film ont été réalisées.

II.2.3.6.2. Perméabilité à l'oxygène

La perméabilité à l'oxygène a été déterminée selon la méthode manométrique NF EN ISO 25 56 (2001-02), en utilisant un appareil de mesure de la perméabilité aux gaz (Brugger, Type GDP-C, Brugger Feinmechanik GmbH, Germany). Un échantillon de film (143 cm^2 de surface) est fixé entre les compartiments inférieur et supérieur de la cellule de perméation. Avant chaque test le compartiment inférieur de la cellule est dégazé sous vide primaire ($< 2 \text{ hPa}$). Durant le test, le compartiment supérieur sera balayé avec le gaz d'essai (O_2). Le gaz qui permée au travers du film engendre une augmentation de pression dans le compartiment inférieur de la cellule, qui sera mesurée et enregistrée en continu. A partir de la cinétique de variation de pression en régime permanent, la perméance est déterminée. La perméabilité à l'oxygène du film (PO_2), exprimée en $\text{g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ est calculée comme étant le produit arithmétique de la perméance et de l'épaisseur du film. Durant le test, la température est maintenue constante ($25 \pm 0,5^\circ\text{C}$) en utilisant un bain thermostaté (HAAKE F3 with Waterbath K). L'humidité relative réglée à $53 \pm 1 \%$ a été fixée dans le compartiment supérieur de la cellule de perméation, en faisant barboter l'oxygène à travers une solution saline saturée de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. D'autres mesures de la perméabilité ont été réalisées dans les mêmes conditions mais à une humidité relative de 57% à l'aide d'une solution saline saturée de NaBr.

II.2.3.7. Propriétés mécaniques des films

L'essai en traction consiste à appliquer deux forces opposées sur un échantillon. Les extrémités d'un échantillon de film ont été serrées entre les mâchoires de la machine d'essai en tension, l'une fixe et l'autre mobile. L'échantillon a été ensuite soumis à un étirement uniaxial à vitesse imposée et constante. Les forces ont été enregistrées par le capteur de force situé sur la partie fixe de la machine. Chaque matériau est caractérisé par un diagramme contrainte-déformation. La **Figure II.4** présente un exemple de comportement d'un matériau soumis à une contrainte de traction. On y distingue trois zones :

- la zone 1 de la courbe contrainte – élongation est linéaire et correspond à une déformation élastique (déformation réversible). Le matériau s'allonge sous l'action de la traction et reprend sa forme et ses dimensions initiales lorsque la contrainte est interrompue. Le coefficient de proportionnalité est appelé module de Young ou module d'élasticité.

- La zone 2 est appelée zone de déformation plastique. La déformation est toujours élastique, mais la variation contrainte-déformation n'est plus linéaire. Cette zone présente un maximum au-delà duquel le matériau subit une déformation irréversible. A l'arrêt de la contrainte, le matériau ne retrouve pas sa forme initiale : il existe une déformation résiduelle permanente.

- Au-delà d'une déformation critique, une contraction du matériau s'opère en un point donné jusqu'à rupture. On aborde alors la zone 3 de la courbe, dite zone de rupture. Si un matériau se casse dans son domaine élastique, c'est-à-dire sans subir de déformation plastique avant sa rupture, il est considéré comme fragile. Par contre, il sera considéré comme ductile s'il peut subir de grandes déformations plastiques avant sa rupture.

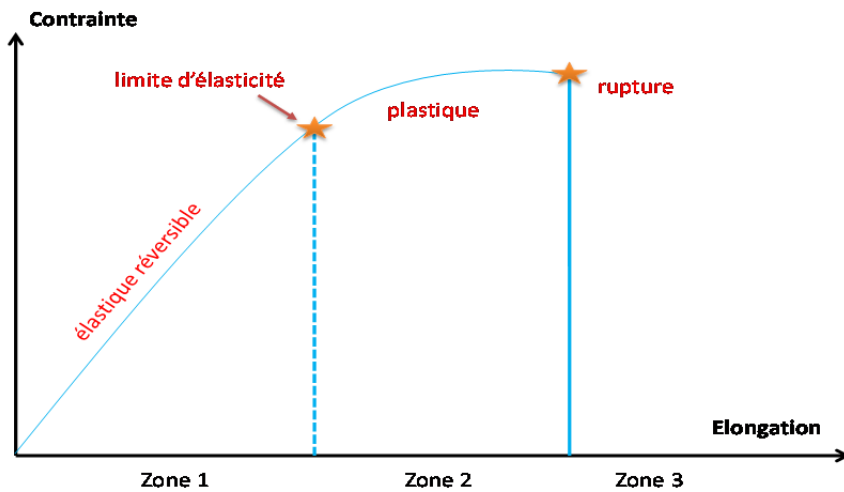


Figure II.4. Comportement d'un matériau soumis à une contrainte mécanique.

Les propriétés mécaniques de différents films ont été évaluées selon la norme Française (NF) en ISO 527-3 (1995) à l'aide d'une machine de traction-compression universelle (TA.HD plus model, Stable MicroSystems, Haslemere, England). Des échantillons rectangulaire ($2,5 \times 8 \text{ cm}^2$) de film ont été préparés en utilisant un massicot de précision à double lame normalisé (Thwing-Albert JDC Precision Sample Cutter) afin d'obtenir des éprouvettes de traction avec une largeur exacte et des côtés parallèles et sans défaut sur toute leur longueur. Avant chaque essai, tous les échantillons ont été équilibrés à 50 % d'humidité relative (HR) et à 25°C durant deux semaines. Ces échantillons pré-conditionnés ont été soumis à un essai de traction uniaxiale (capteur de force de 300 N) à une vitesse constante de 50 mm/min jusqu'à rupture. Les mesures ont été réalisées à température ambiante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), 5 échantillons de chaque formulation ont été testés. A partir des courbes contrainte-déformation enregistrées automatiquement (Force (F) en N en fonction de l'allongement (ΔL) en millimètre), nous avons calculé :

- la contrainte maximale à la rupture (TS, MPa) :

$$TS = \frac{F_{\max}}{S} \quad \text{Équation II.5}$$

avec S est la section initiale de l'éprouvette (m²) et égale au produit de l'épaisseur par sa largeur, et F_{max}, la force maximale à la rupture (N) ;

- Le module d'élasticité ou module de Young (YM, MPa) correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe contrainte-déformation aux faibles déformations :

$$YM = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad \text{Équation II.6}$$

Avec σ , la contrainte (N/m² ou MPa) et ε , la déformation (%).

- le pourcentage de déformation (allongement) du film au point de rupture (E, %) Il correspond au rapport entre l'allongement et la longueur de référence (initiale) :

$$E (\%) = \frac{\Delta L}{l_0} \times 100 \quad \text{Équation II.7}$$

Avec $\Delta L = \ell - l_0$: Allongement à la rupture (mm), et l_0 : longueur initiale de l'éprouvette et ℓ : longueur finale de l'éprouvette.

II.2.3.8. Propriétés thermiques des films

II.2.3.8.1. Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est une technique très utilisée pour la caractérisation thermique des matériaux polymères. Elle permet de déterminer les propriétés thermiques (point de fusion et de cristallisation, mais également la transition vitreuse) des matériaux macromoléculaires. De plus, il est possible de déterminer les énergies mises en jeu au cours de ces transitions. D'autres propriétés intrinsèques des matériaux peuvent être mesurées, comme le taux de cristallinité et la variation de la chaleur massique ou capacité calorifique (C_p) au cours de la transition vitreuse.

Le principe de la DSC est de mesurer la différence de flux de chaleur qui s'établit entre l'échantillon (E) et une référence (R) inerte, lors d'un chauffage ou d'un refroidissement, tout en maintenant leurs températures égales. Ce flux de chaleur est directement proportionnel à la capacité calorifique du matériau considéré. Si un processus endothermique ou exothermique se manifeste au cours de la manipulation, une variation du flux est observée par un pic sur le thermogramme. Le matériau ou le polymère à analyser est chauffé dans un dispositif qui ressemble au dispositif suivant (**Figure II.5**).

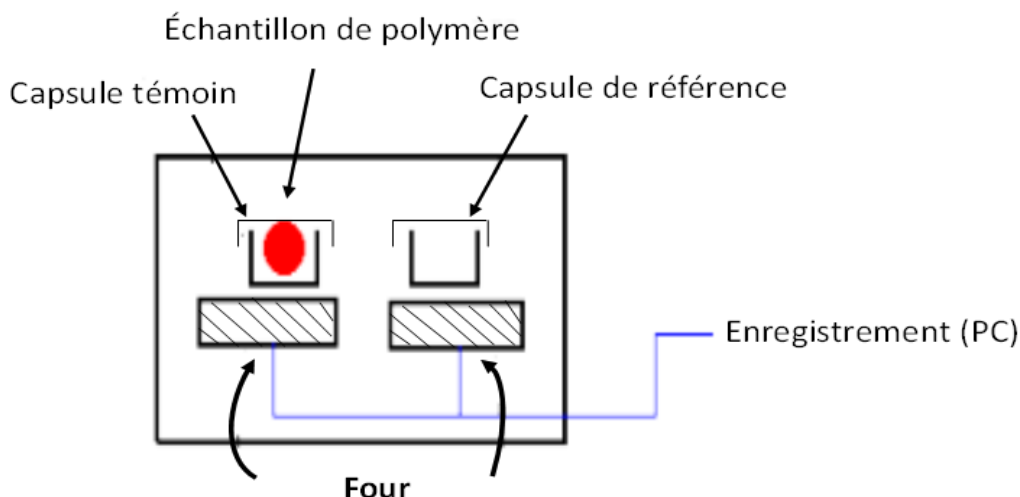


Figure II.5. Schéma simplifié pour un dispositif de chauffage pour la DSC.

Les deux capsules sont placées dans un four qui sert pour le chauffage l'une vide utilisée comme référence et l'autre qui contient l'échantillon de polymère. La température de chaque capsule est mesurée par un thermocouple relié à un système d'acquisition (ordinateur) qui calcule la différence de température entre l'échantillon et la référence, et les convertit en flux de chaleur.

Dans notre étude, les propriétés thermiques des films irradiés et témoin ont été étudiées en employant calorimètre différentiel à balayage (DSC Q1000-0506, TA instruments), équipé d'un système de refroidissement à l'azote liquide. Les films à tester ont été préalablement conditionnés à 25°C et une humidité relative de 50% durant deux semaines. Une prise d'essai d'environ 5 mg a été initialement broyée et placée dans une capsule en aluminium (10 µL) scellée hermétiquement, et stocké 1 h à température ambiante avant l'analyse. Une capsule vide sert de référence inerte. L'appareil a été calibré en utilisant l'indium. Les cycles de chauffage et de refroidissement ont été réalisés sous flux d'azote. Nous avons effectué deux balayages pour chaque échantillon avec les programmes de chauffage et refroidissement suivant :

Premier cycle de chauffage :

- Equilibrage à 25°C, suivie d'un refroidissement de 25°C à -50°C avec une vitesse de 10°C/min, puis refroidissement de -50°C à -80°C avec une vitesse de 4°C/min, suivi d'un maintien à -80°C pendant 4 min, et enfin un premier chauffage jusqu'à 150°C à une vitesse de 10°C/min;

Deuxième cycle de chauffage :

- Un cycle refroidissement de 150°C à -80°C à une vitesse de 10°C/min;
- Un cycle de chauffage de -80°C à 150°C à une vitesse de 10°C/min;
- Et enfin un cycle de refroidissement (rampe) jusqu'à 25°C.

Les mesures ont été effectuées en double pour chaque film avec une excellente répétabilité. La température de transition vitreuse T_g de chaque échantillon a ensuite été déterminée à partir du deuxième chauffage. Ce test a été effectué en Duplicata.

II.2.3.8.2. Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été utilisée pour étudier la stabilité thermique des différents films. Le principe de ce test est basé sur le changement de masse d'un échantillon en fonction d'une montée de température constante dans une atmosphère contrôlée. Un thermogramme, qui présente la variation progressive de la masse (en pourcentage) en fonction de la température, été enregistrée. Les mesures ont été effectuées en utilisant un appareil d'analyse thermique TA (TA instruments Discovery TGA New- Castle, USA) fonctionnant sous flux d'azote. L'échantillon a été chauffé de 25 à 800°C, à une vitesse de chauffage de 20°C/min. Le poids de l'échantillon de film (initialement environ 8 mg) a été constamment mesuré avec une précision de 0,01 mg. Les films ont été initialement stockés à 25°C et 50% d'humidité relative pendant deux semaines avant chaque mesure. Ce test a été dupliqué.

II.2.3.9. Analyses spectroscopiques et de surface

II.2.3.9.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Cette méthode d'analyse vibrationnelle est non destructrice, qualitative et quantitative. Les spectromètres mesurent l'atténuation de la puissance de la radiation absorbée par l'échantillon en fonction du nombre d'onde (en cm^{-1}), permettant une identification des groupements chimiques et une évaluation de leur concentration. Une molécule illuminée par des radiations dans l'infrarouge peut absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupements chimiques la constituant. La mesure de l'intensité de lumière absorbée à chaque longueur d'onde λ conduit à un spectre caractéristique du produit étudié. Le spectre obtenu représente $I/I_0 = f(\tau)$ avec I = intensité absorbée, I_0 = intensité initiale et τ nombre d'onde = $1/\lambda$. La composante principale du spectrophotomètre à transformée de Fourier est l'interférogramme de Michelson. Ce dernier contient un miroir fixe, un miroir mobile et un séparateur de faisceau. Le séparateur de faisceau réfléchit approximativement la moitié de la radiation incidente au miroir mobile et transmet l'autre moitié vers le miroir fixe (**Figure II.6**). Les deux faisceaux sont de nouveau réfléchis par ces miroirs vers le séparateur de faisceau, où ils sont réunis. Les deux faisceaux parcourent des distances différentes dépendant de la position du miroir mobile. Cette différence de trajet optique est appelée le « déphasage ». Les faisceaux interfèrent de façon constructive ou destructive dépendamment de la position du miroir mobile et de la fréquence de la radiation. Le déphasage diffère en fonction de la position du miroir mobile produisant ainsi le même effet sur l'intensité du signal. Le faisceau modulé est ensuite dirigé du porte-échantillon au détecteur.

Au niveau du détecteur, le faisceau produit un signal électrique appelé interférogramme. Il s'agit de la signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier.

Nous avons utilisé la FTIR afin d'étudier les modifications induites par l'irradiation ou après l'incorporation des antioxydants sur la structure des films à l'échelle moléculaire ainsi que les différentes interactions mis en jeu entre polymères et molécules actives. Pour ce travail de thèse, nous avons travaillé en mode de réflexion atténuée à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Perkin-Elmer, Spectrum 65, France) équipé d'un accessoire ATR avec un cristal de ZnSe. Le traitement du spectre infrarouge est effectué grâce au logiciel Spectra-Calc qui permet une exploitation complète des spectres, en particulier la soustraction et la correction de la ligne de base. Le spectre FTIR, exprimé en transmittance (T%), de chaque échantillon de film est enregistré à température ambiante dans la plage de $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$, en utilisant 32 accumulations (scans) et une résolution de 4 cm^{-1} . Les films ont été initialement conditionnés à 25°C et 50% d'humidité relative (HR) pendant au moins 7 jours avant chaque analyse. Cette mesure a été dupliquée.

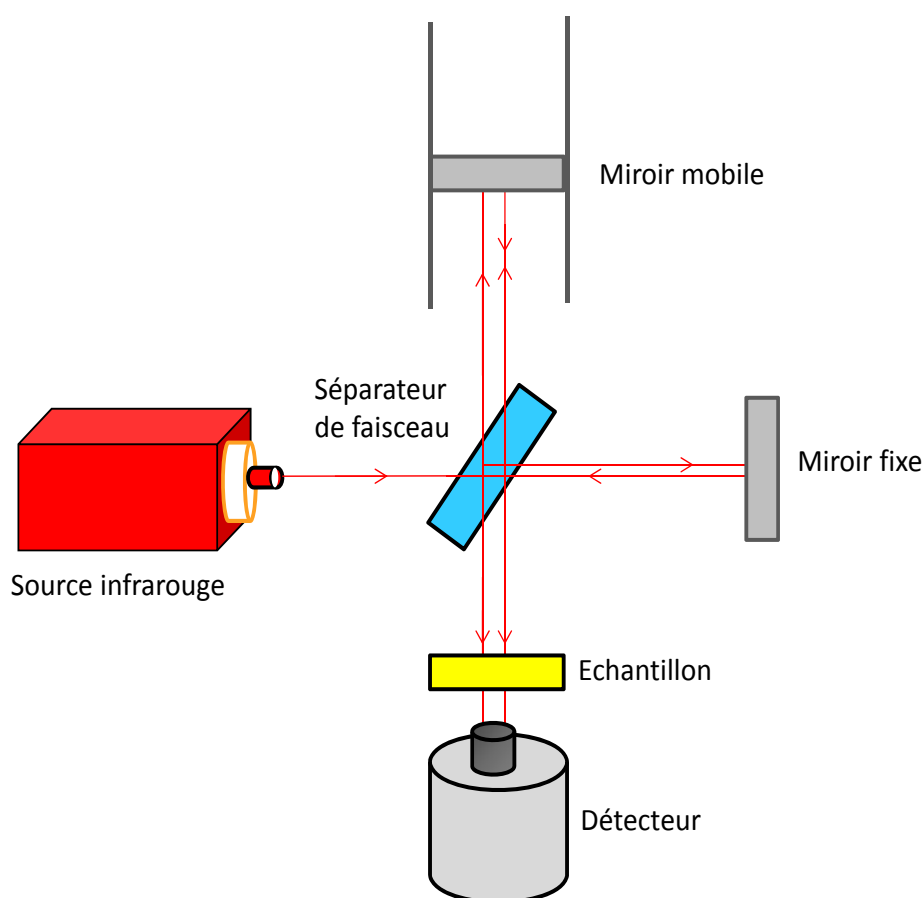


Figure II.6. Schéma d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier et mécanisme de fonctionnement de la partie centrale d'un interféromètre de Michelson.

II.2.3.9.2. Spectroscopie UV-vis

La spectroscopie ultraviolet visible est une technique spectrale mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine des ultraviolets (200nm-400nm), du visible, et jusqu'au proche infrarouge (750nm- 1400nm). Les spectres dans cette région sont dus aux transitions électroniques, et correspondent à des spectres d'émission ou d'absorption. L'absorption de rayonnement ultra-violet visible par des molécules (échantillon) se traduit généralement par plusieurs bandes d'absorption électronique qui sont toutes constituées de nombreuses raies, chaque raie résulte de la transition d'un électron de l'état fondamental à l'un des états énergétiques (Hesse, 1997). Le but de ces essais est d'enregistrer les spectres UV et de déterminer la nature de transitions électroniques, au niveau des chaînes moléculaires, induites par l'irradiation, en fonction de la longueur d'onde d'adsorption.

Les spectres d'absorption UV-vis ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis (OPTIZEN 2120, Mecasys, Yuseong-gu, Daejeon, Korea) dans la gamme de longueurs d'onde allant de 190 à 900 nm. Les échantillons de films ont été coupés en forme rectangle (1×3cm²) et directement placés dans la cellule du spectrophotomètre. Une mesure à vide (sans échantillon de film) a été initialement enregistrée et utilisée comme référence. Deux répétitions de chaque formulation ont été analysées.

II.2.3.9.3. Résonance paramagnétique électronique (ESR)

La résonance paramagnétique électronique est une technique de mesure physique, également connue sous le nom de résonance de spin électronique (ESR). C'est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique. Grâce à sa spécificité et sa grande sensibilité, elle permet une détection directe de toute espèce paramagnétique (radicaux, éléments de transition, défauts de structure...). Celles-ci sont caractérisées par la présence d'un électron non apparié (appelé aussi électron célibataire) sur la couche de valence. Il en résulte qu'elles possèdent une propriété magnétique intrinsèque, le paramagnétisme de spin.

Un des domaines dans lequel l'ESR a trouvé de vastes applications est celui de l'étude de l'action des radiations électromagnétiques ou corpusculaires sur la matière. Sous irradiation, la rupture (et ou la création) de certaines liaisons chimiques a lieu, ce qui entraîne la formation de radicaux libres ou électrons célibataires. L'ESR peut être observée pour toute substance contenant au moins un électron célibataire (électron non apparié). Les espèces suivantes satisfont cette condition :

- les radicaux libres en phase solide, liquide ou gazeuse ;
- les biradicaux, c'est à dire les molécules qui contiennent deux électrons célibataires éloignés de telle sorte que l'interaction des deux centres radicalaires devient faible ;
- les systèmes à l'état triplet (deux électrons célibataires) ;
- les ions des métaux de transition dont la configuration électronique fait apparaître des états de spin différents de zéro.

La résonance paramagnétique électronique permet d'observer l'énergie absorbée par un système (électrons) immergé dans un fort champ magnétique homogène. Rappelons que l'électron possède un spin (moment angulaire de la particule en rotation sur elle-même) et un moment magnétique (il se comporte comme une aiguille aimantée) : en présence d'un champ magnétique extérieur (B), les

deux orientations permises du spin (α et β) déterminent deux niveaux d'énergie. On peut susciter le retournement du spin, c'est-à-dire induire une transition $\alpha \rightarrow \beta$, en appliquant un rayonnement électromagnétique de fréquence appropriée, et détecter l'absorption d'énergie qui résulte de cette transition. L'éclatement des deux niveaux d'énergie varie proportionnellement avec le champ magnétique. En pratique, l'expérience d'ESR est réalisée en maintenant constante la fréquence de la source d'ondes électromagnétiques et en faisant varier continûment le champ extérieur.

Lorsque l'écart entre les niveaux α et β devient égal à l'énergie $h\nu$ des photons, ceux-ci sont absorbés ce qui correspond à la condition de résonance (dans le cas d'un électron célibataire):

$$h\nu = E_f - E_i = g \cdot \mu_B \cdot H \quad \text{Équation II.8}$$

avec g = facteur de Landé; μ_B (ou β) = magnéton de Bohr et H = valeur du champ magnétique à la condition de résonance.

Le signal de résonance dans le spectre de résonance est enregistré sous forme de première dérivée de spectre d'absorption en fonction de champ magnétique. Cela permet de mieux révéler la structure du spectre ESR. Le spectre est caractérisé par sa forme, sa position, sa largeur (ΔH_{pp}) et son amplitude (A_{pp}). Un spectre peut comporter plus d'une raie d'absorption. Ceci s'explique par différentes interactions magnétiques entre l'électron et son environnement. Plusieurs données peuvent être obtenues à partir d'un spectre : la position de la raie permet de déduire le facteur g et donc le couplage entre l'électron et le champ magnétique ; la largeur ΔH_{pp} , la forme et l'amplitude A_{pp} de la raie donnent quant à elles des informations sur le type d'interaction et le mouvement des spins. Chaque signal ainsi enregistré est caractéristique de l'élément paramagnétique et de son environnement proche (sphère de coordinance). La résonance paramagnétique électronique est utile pour l'étude de la structure locale de l'ensemble des matériaux pouvant présenter en son sein un élément paramagnétique. Non seulement utile pour pouvoir décrire l'environnement local, elle peut également servir à l'étude des défauts créés par le passage des rayonnements électromagnétiques (γ , x et électrons accélérés) donnant par exemple une mesure absolue de leur concentration dans la structure.

Les expériences de résonance paramagnétique électronique ont été effectuées au moyen d'un spectromètre Bruker EMX (Bruker, Berlin, Germany) de bande X continu (9,8 GHz). Environ 20mg de film ont été placés dans un tube capillaire de diamètre 5mm et de longueur 25cm, ce dernier est placé et centré au niveau de la cavité optique du spectromètre. Ce tube sera soumis à l'action d'un champ magnétique (B) de $3500 \pm 24G$. La valeur du gain est ajustée afin que, d'une part, le signal ne soit pas noyé dans le bruit et que, d'autre part, il ne sature pas la diode de mesure. La comparaison des spectres n'est possible qu'après division par le gain et la masse de l'échantillon. De plus, étant donné que le spectromètre est très sensible aux impuretés présentes dans la cavité, une acquisition du blanc (mesure sans échantillon) est réalisée régulièrement, afin de pouvoir le soustraire aux spectres. Le spectre a été enregistré, après 5 scans, en utilisant un champ magnétique de 100kHz avec une modulation de 4G et une puissance de micro-ondes de 0,632 mW.

II.2.3.9.4. Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

La diffractométrie des rayons X est une méthode d'analyse physico-chimique universellement utilisée pour identifier la nature et la structure des produits cristallisés. Elle est utilisée pour l'étude de la matière cristallisée (minéraux, métaux, produits organiques cristallisés) et non pas la matière amorphe (liquides, polymères totalement amorphes, verres). Toutefois, la matière amorphe diffuse les rayons X, et elle peut être partiellement cristallisée, la technique peut donc se révéler utile dans ce cas précis. Cette technique permet de reconnaître des produits ayant la même composition chimique brute, mais cristallisés sous des formes polymorphiques différentes.

Un faisceau de rayons X monochromatique et parallèle qui frappe un cristal est diffracté dans une direction donnée par chacune des familles des plans réticulaires (**Figure II.7**), chaque fois que la condition ou la loi de Bragg suivante est réalisée :

$$n\lambda = 2d \sin \theta_x \quad \text{Équation II.9}$$

où λ : longueur d'onde du faisceau de rayons X, d : distance de deux plans réticulaires, θ_x : angle d'incidence des rayons X. n est un nombre entier appelé «ordre de diffraction». Cette relation permet de déterminer les équidistances des différentes familles de plans caractéristiques du matériau à analyser à partir des valeurs de l'angle d'incidence. Dans cette étude, λ est la longueur d'onde de la raie $K\alpha_1$ du cuivre ($1,5406 \times 10^{-10}$ m).

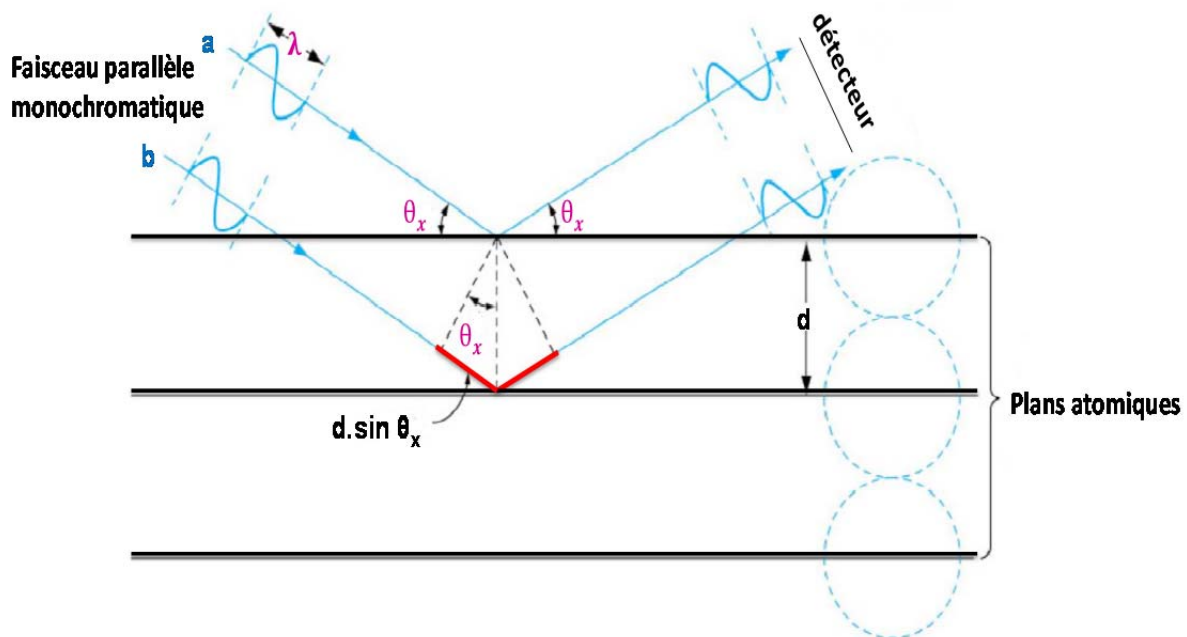


Figure II.7. Schéma de principe de diffractomètre à compteur.

Pour que la diffraction se produise, il faut que les ondes diffractées par les différents plans soient en phase, c'est-à-dire que la différence de marche des rayons rencontrant ces plans soit égale à un nombre entier.

Nos analyses ont été réalisées à l'aide d'un diffractomètre des rayons X (Panalytical, Empyrean X-ray). Le film est bombardé avec le faisceau de rayons X produit grâce à une anticathode de cuivre (Energie du rayonnement : 40 kV ; Longueur d'onde ($K\alpha$ 1) : 1,54060 Å, puissance 40mA). Les mesures ont été réalisées en mode de transmission sur un domaine angulaire ($2\theta_x$) compris entre 3° et 60° avec un pas de 0,02. Le rayonnement émis est défini par un système de fentes (de type Soller) et de fenêtres situées avant et après l'échantillon. Ce dernier est préparé sous forme de pastille dans un porte échantillon cylindrique, de diamètre 16mm, qui tourne avec un mouvement uniforme autour d'un axe situé dans son plan (cercle goniométrique), permettant ainsi d'augmenter le nombre d'orientations possibles des plans réticulaires. Les particules étant orientées au hasard, il y aura toujours une famille de plans donnant lieu à la diffraction, de telle sorte que l'on obtienne simultanément tous les faisceaux susceptibles de diffracter : ces faisceaux forment des cônes de demi-angle au sommet $2\theta_x$. Un compteur (détecteur) linéaire (X'CeLerator) à scintillation mesure l'intensité du rayonnement X diffracté dans certaines directions. L'enregistrement réalisé est la courbe de l'intensité des rayons X diffractés en fonction des angles de diffraction. Le traitement des diffractogrammes, ou spectres, s'effectue à l'aide d'un logiciel basé sur les données des fiches JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) avec une base de donnée PDF (Powder Diffraction File) qui permet la détermination de la proportion fraction amorphe/ fraction cristallisée au niveau des films suite aux irradiations.

II.2.3.9.5. Analyses de surface par goniométrie

II.2.3.9.5.1. Détermination de l'angle de contact

L'angle de contact se rapportant au phénomène de mouillage a été défini initialement au début du 19^{ème} siècle pour des surfaces solides, non poreuses, non absorbantes, et pour lesquelles l'angle de contact se mesure à l'équilibre thermodynamique. En 1805, Young établit la relation impliquant les tensions de surface au point de contact triple entre une phase solide, lisse et rigide S, un liquide L et sa vapeur V :

$$\gamma_{LV} \cdot \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad \text{Équation II.10}$$

où γ_{LV} , γ_{SV} et γ_{SL} désignent les tensions superficielles des interfaces liquide-vapeur, solide-vapeur et solide-liquide, et θ est l'angle de contact (Young, 1805).

L'angle de contact θ (**Figure II.8**) se définit par l'angle entre la surface du solide et la tangente à la surface de la goutte qui passe par le point triple (Zisman, 1964). Par conséquent, il constitue une mesure des tendances compétitives du solide et du liquide, qui aboutissent soit à l'étalement du liquide sur la surface solide, soit, au contraire, à la formation d'une goutte de liquide pour minimiser son aire. Ce phénomène dépend de l'amplitude relative des forces moléculaires existant au sein du liquide (cohésives) ainsi qu'entre le liquide et le solide (adhésives).

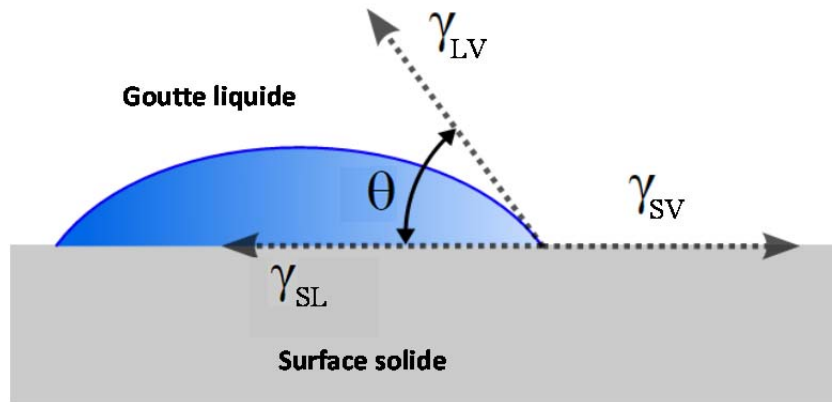


Figure II.8. Angle de contact d'une goutte de liquide déposée sur une surface solide et les tensions interfaciales au point de contact des trois phases.

Cette équation de Young, qui décrit l'angle de contact au moyen des tensions interfaciales du solide et du liquide, traduit clairement que le mouillage se trouve favorisé par une γ_{SL} faible, une γ_{SV} élevée et une γ_{LV} faible, et que l'étalement se produit lorsque $\gamma_{SV} - \gamma_{SL} > \gamma_{LV}$. Si cette condition d'étalement n'est pas satisfaite, la goutte reste de dimension finie, aboutissant alors, à l'équilibre, à l'existence d'un angle de contact. En théorie, la valeur de l'angle de contact peut varier de 0° à théoriquement 180° . Un angle de contact de 0° implique un étalement complet du liquide à la surface du solide, alors qu'une valeur de 180° correspondrait à une surface absolument non-mouillable, ce qui représente la limite irréaliste d'un système dépourvu d'interactions.

Mesure de l'angle de contact : hydrophobie de surface et mouillabilité

L'hydrophobie de surface et la mouillabilité des films ont été évaluées par des mesures d'angle de contact à l'aide d'un goniomètre DGD-DX (GBX, Romans-sur-Isere, France), équipé d'un logiciel d'analyse d'images DIGIDROP (GBX, Romans-sur-Isere, France) selon Karbowski et al. (2006). Un schéma simplifié est présenté dans la **Figure II.9**. L'angle de contact a été mesuré par la méthode de la goutte sessile, procédé optique de mesure de l'angle de contact, qui est la méthode la plus utilisée pour évaluer les propriétés de mouillage de la surface solide du film. Une goutte d'eau distillée (ou de liquide à tester) ($\sim 1\mu\text{L}$) est déposée sur la surface du film à l'aide d'une seringue de précision. Ensuite s'exécutent le traitement d'images et l'ajustement d'un profil de goutte méridien théorique pour la mesure de l'angle de contact entre la ligne de base de la goutte et la tangente à son contour. L'acquisition vidéo d'une image agrandie du profil de la goutte s'enregistre sur ordinateur par l'intermédiaire d'une caméra CCD (Charge Coupled Device) afin de quantifier les changements de forme de la goutte au cours du temps. L'angle de contact à 20 s ainsi calculé résulte de la moyenne des deux angles, diamétralement opposés, mesurés de chaque côté de la goutte. Les données recueillies (pendant 120 s minimum) à l'issue de ces expériences comprennent θ , l'angle de contact,

AS, la surface développée de la goutte au contact de la phase vapeur et V, le volume de la goutte, en fonction du temps t. Pour chaque film, les mesures sont systématiquement répétées cinq fois.

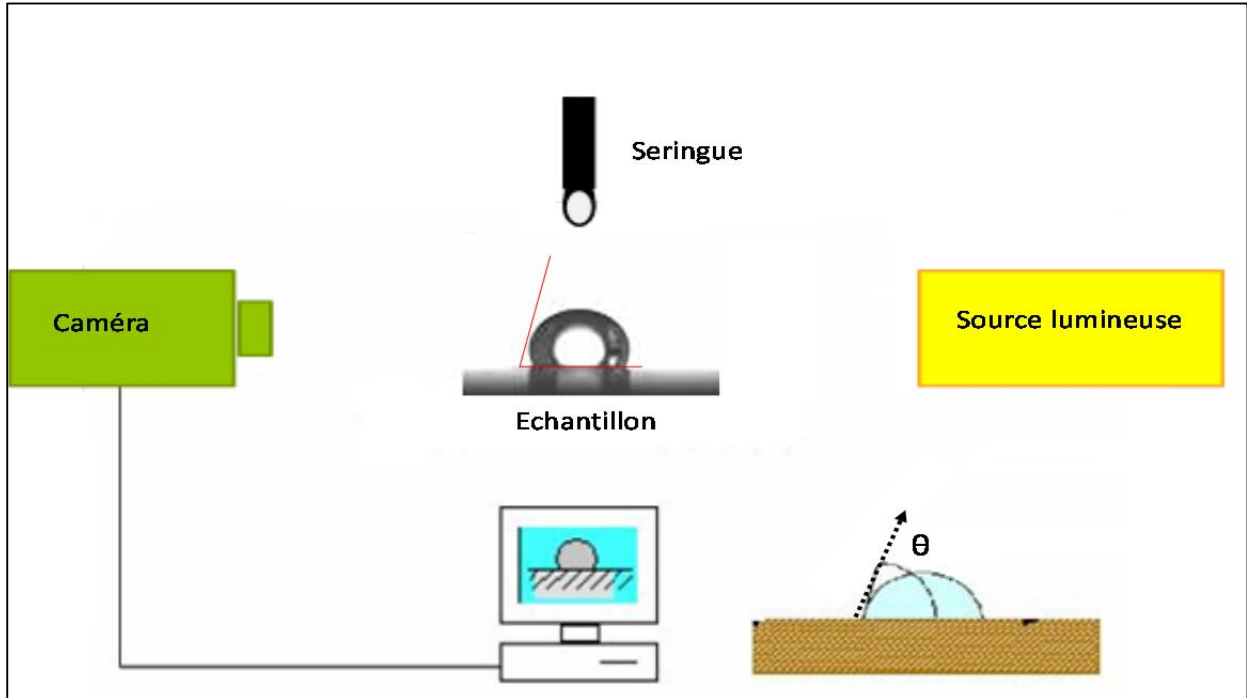


Figure II.9. Schéma simplifié du principe utilisé pour la mesure des angles de contact.

II.2.3.9.5.2. Détermination de la tension de surface et la tension de surface critique

La tension de surface du solide (γ_S) résulte du déséquilibre de forces auquel sont soumises les molécules situées à la surface. Ces forces intermoléculaires peuvent être de nature dispersive, polaire, ionique, covalente ou métallique et sont additives. γ_S peut se décomposer en deux composantes: dispersive γ_S^d et polaire γ_S^p (**Équation II.11**).

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad \text{Équation II.11}$$

Il existe plusieurs méthodes de détermination de la tension de surface d'un solide (γ_S). La plupart d'entre elles ont été mises au point sur des polymères solides. Expérimentalement elles se réduisent à la mesure d'angles de contact de différents liquides sur des surfaces homogènes, lisses et planes.

A partir du modèle de Fowkes (1964), Owens et Wendt (1969) proposent d'exprimer la tension interfaciale γ_{SL} entre un liquide (L) et un solide (S) par l'équation :

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2 \left[\sqrt{\gamma_S^d \times \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \times \gamma_L^p} \right] \quad \text{Équation II.12}$$

Owens et Wendt (1969) considèrent que la pression d'étalement est nulle ($\gamma_{SV} = \gamma_S$) et expriment la tension de surface (γ_S) à partir des équations (II.10 et II.12) par :

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2[\sqrt{\gamma_S^d \times \gamma_L^d} + \sqrt{\gamma_S^p \times \gamma_L^p}] \quad \text{Équation II.13}$$

où γ_L^d représente la composante dispersive de la tension de surface du liquide et γ_L^p la composante polaire. Pour obtenir γ_S^d il suffit de mesurer avec un liquide nonpolaire (par exemple l' α -bromonaphtalène) pour lequel le terme $2 \sqrt{\gamma_S^p \times \gamma_L^p}$ de l'équation (II.12) est nul. γ_S^p est alors calculée après avoir déterminé l'angle avec un liquide polaire, l'eau par exemple.

Dans notre étude la tension de surface des films a été déterminée selon cette méthode d'Owens et Wendt (1969) en utilisant une série de liquides dont on connaît les tensions de surface ainsi que leurs composantes dispersives et polaires (Tableau II.3)

La méthode de Zisman qui consiste à déterminer la tension de surface critique γ_c constitue l'approche la plus simple (Zisman, 1964). Elle est définie comme étant la limite au-delà de laquelle tout liquide de tension superficielle γ_L inférieure à γ_c , peut s'étaler parfaitement sur le film. L'intersection de la droite de régression du $\cos \theta_i = f(\gamma_L)$ pour les différents liquides (**Figure II.10**) avec la valeur de $\cos \theta = 1$ donne la valeur la tension de surface critique γ_c (correspondant à étalement parfait ($\theta = 0$)).

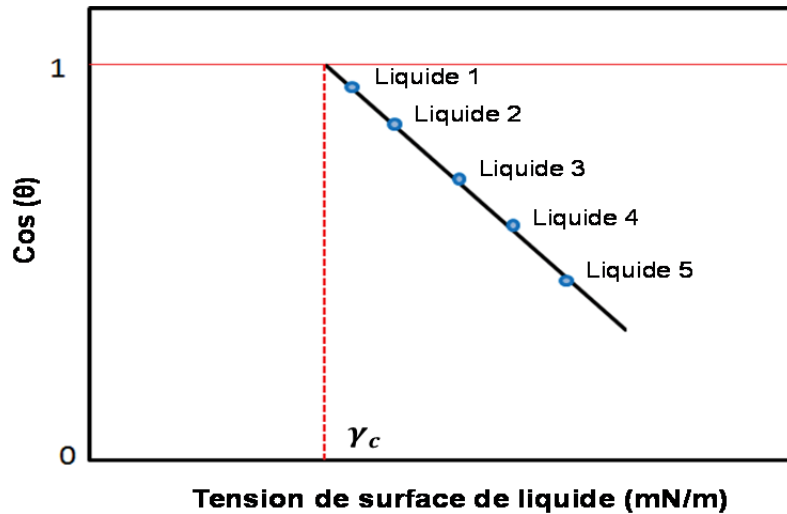


Figure II.10. Tension de surface critique estimée selon la méthode de Zisman (1964)

II.2.3.9.5.3. Détermination de la vitesse et de l'indice de gonflement de films

Les données acquises expérimentalement à l'aide du goniomètre permettent de calculer et de suivre au cours du temps le volume de la gouttelette (Quezada-Gallo, Debeaufort & Voilley, 2000). Quand une goutte d'eau est déposée sur une surface solide, deux mécanismes sont impliqués dans la diminution de volume et de l'angle de contact au cours du temps: l'évaporation, due principalement

à la différence de pression partielle de vapeur entre la goutte d'eau et l'atmosphère environnante, et l'absorption de cette goutte par le solide (film).

Lorsque l'absorption du liquide par le matériau induit un gonflement, le volume de la goutte semble augmenter du fait de la déformation de la surface du film. Dans ce cas, le flux d'absorption ne peut pas être calculé, mais un indice de gonflement sera déterminé. L'indice et la vitesse de gonflement ont été obtenus à partir de la cinétique du volume de la goutte selon les équations suivantes :

$$\text{Indice de gonflement (\%)} = \left(\frac{\Delta V}{V_0}\right) \cdot 100 = \left(\frac{V_{\max} - V_0}{V_0}\right) \cdot 100 \quad \text{Équation II.14}$$

Où ΔV est la l'augmentation de volume de la goutte (μL), V_{\max} est le volume maximal de la goutte (μL), et V_0 est le volume initial (μL) de la goutte.

La vitesse de gonflement, mesurée sur les premières secondes du gonflement, est exprimée de la façon suivante :

$$\text{Vitesse de gonflement (mm}^3/\text{s)} = \left(\frac{\Delta V}{\Delta t}\right) = \frac{V_{\max} - V_{ini\ Sw}}{t_{\max} - t_{ini\ Sw}} \quad \text{Équation II.15}$$

Où, ΔV est l'augmentation de volume de la goutte (μL) pendant le temps Δt .

V_{\max} : correspond au volume maximale de gonflement, $V_{ini\ Sw}$: correspond au volume initiale de début de gonflement, t_{\max} : correspond au temps maximale de gonflement, $t_{ini\ Sw}$: correspond au temps de début de gonflement.

II.2.4. Etude de la libération (release) des antioxydants après immersion des films en milieu liquide aqueux.

Les propriétés de libération des antioxydants depuis les films ont été déterminées au moyen d'un appareil de dissolution à pales d'agitation rotatives (AT7 Smart, Sotax, Basel), à une température fixe de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et avec une vitesse de rotation moyenne de 50 rpm. Pour ce test, 600 mg de chaque film (50% chitosan-50% gélatine de poisson (w/w), contenant 5% d'antioxydants (masse/masse totale en polymère)) ont été introduits ($t=0$) dans un 1 L de milieu de dissolution aqueux. L'eau distillée ajustée à $\text{pH}=7$ avec une solution de NaOH de 0,1M a été utilisée pour l'étude de la libération de l'acide férulique, du tyrosol et de la coumarine. La libération de la quercetin, a été réalisée dans une solution aqueuse à 30% d'éthanol à 96°GL (soit 312,5 ml d'éthanol 96% dans 687,5ml d'eau distillée). Lors du test, 2ml du milieu ont été prélevés périodiquement et placés dans une cuvette en quartz pour mesurer la concentration en antioxydant (mg/L) par spectrophotométrie UV-vis (Biochrom Libra S22. Cette quantité (2ml) a été réintroduite, après lecture optique, dans le milieu de libération pour garantir un volume constant (1L) sur toute la durée du test. La longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) pour chaque antioxydant a été initialement déterminée à partir des spectres d'absorbance de ces composants purs à une concentration de 20mg/L dans la même solution que le milieu de dissolution. Les différentes longueurs d'onde λ_{\max} étaient de 286, 278, 220 et 376nm respectivement pour l'acide férulique, la coumarine, le tyrosol et la quercétine.

Matériel et Méthodes. Chapitre II

La courbe d'étalonnage a été réalisée grâce à une série de solutions étalons de concentration 1, 2, 4, 5, 10, 25 et 50 mg/L en antioxydants, et ceci en appliquant la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot L \cdot C \quad \text{Équation II.16}$$

Avec, L= longueur de la cuve (1 cm) ; C = concentration de la solution (mg/L) et ε = coefficient d'extinction spécifique qui dépend de la longueur d'onde. ε varie également en fonction des forces intermoléculaires et donc du solvant utilisé.

L'équation de la droite d'étalonnage ainsi obtenue pour chaque antioxydant, nous servira pour la détermination de la concentration en ces molécules lors de la cinétique de libération.

La teneur initiale en antioxydants dans le film a été déterminée expérimentalement après extraction et solubilisation complète du film (60mg comme prise d'essai) et donc de la molécule active dans une solution (100ml) d'acide acétique (à pH =4) à 50°C et sous agitation. La concentration initiale mesurée sera utilisée pour l'analyse des cinétiques de libération et le calcul des coefficients de diffusion. Pour les films contenant le tyrosol, nous avons constaté que les liaisons peptidiques au niveau de la gélatine absorbent aux mêmes longueurs d'onde que celle du tyrosol (220nm). Dans ce cas précis, un test de libération/dissolution de films sans tyrosol a été réalisé selon le même protocole. L'absorbance obtenue pour le milieu de dissolution du film témoin (sans tyrosol) a été soustraite des valeurs obtenues pour les films avec tyrosol. Lorsque l'équilibre est atteint (la concentration en antioxydants reste inchangée au cours du temps), le coefficient de partage et/ou % rétention ont été déterminés. Ce dernier correspond à la concentration restante dans le film à l'équilibre sur la concentration initiale.

Les cinétiques de libération sont présentées et analysées sur la base du rapport de la concentration (mg/L) en antioxydants dans le milieu de dissolution au cours du temps (C_t) sur la concentration à l'équilibre C_∞ (mg/L).

Le transfert de matière mis en jeu lors des cinétiques de libération peut être décrit par la loi de Fick appliquée au régime transitoire. Il s'agit ici du transfert d'une molécule à partir d'une membrane d'épaisseur L, ayant une distribution initiale uniforme, et des concentrations aux surfaces différentes. Le coefficient de diffusion (D) apparent de l'antioxydant dans film a donc été déterminé à partir de la cinétique de libération en appliquant la 2ème loi de Fick (Équation II.17) .

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{Équation II.17}$$

Où C désigne la concentration d'antioxydant à l'intérieur du film au temps t, x est l'épaisseur du film et D est le coefficient de diffusion apparent. La concentration en antioxydant dans le film est supposée maximale et uniforme en tout point au temps zéro. La concentration dans le milieu de dilution est considérée comme uniforme en tout point à chaque instant et est nulle au temps initial. La méthode expérimentale choisie correspond au cas d'une diffusion à partir d'un film dans une solution parfaitement agitée (pas d'effet de couches limites), dont le volume est fini Crank (1975). Nous considérons que la diffusion est unidirectionnelle et que le coefficient de diffusion de la

molécule active dans le film ne dépend pas de la concentration ni du temps. Le gonflement du film lors de son immersion dans le milieu de dissolution est considéré comme nul et donc l'épaisseur supposée constante tout au long de la cinétique de libération.

Le coefficient de diffusion est déterminé en utilisant la solution analytique suivante, proposée par (Crank, 1975):

$$\frac{C_t}{C_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(1 + \alpha)}{1 + \alpha + \alpha^2 q_n^2} \exp\left(-\frac{Dq_n^2 t}{l^2}\right) \quad \text{Équation II.18}$$

Avec C_t est la concentration en antioxydant déterminée dans le milieu de dissolution au cours du temps, comme détaillé précédemment; C_∞ est la concentration maximale en antioxydant déterminée dans le milieu de dissolution à l'équilibre; $\alpha = V_s/(K \times V_f)$ avec V_s le volume de la solution (m^3), V_f le volume de film (m^3) et K le coefficient de partage entre de la molécule active entre le film et le milieu de libération; q_n sont les racines non-nulles positives de $\tan(q_n) = -\alpha q_n$, avec une valeur de n comprise entre 1 et 6; D est le coefficient de diffusion apparent ($m^2.s^{-1}$) et, l est la demi-épaisseur du film (m).

Ce modèle a été appliqué aux cinétiques de libération en appliquant une minimisation de la somme des carrés des écarts entre les valeurs mesurées et prédites. Pour se faire, nous avons utilisé le logiciel Matlab (The Mathworks, Natick, MA) en nous basant sur l'analyse algorithmique de Levenberg-Marquardt et en prenant D comme unique paramètre ajustable.

II.2.5. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel SPSS 13.0 (Stat-Packets Statistical analysis Software, SPSS Inc., Chicago, IL). À l'aide de ce logiciel, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée afin de déterminer l'existence des différences significatives à travers une comparaison multiple des moyennes. Le test de comparaison des moyennes utilisé est le LSD (Least Significant Difference) au seuil de signification de 95%. Le test de t-Student au seuil de 5% a été aussi utilisé mais dans le cas où le nombre de groupes à comparer est réduit à deux. Une analyse en composante principale (ACP) a été aussi appliquée en utilisant le logiciel XLSTAT (XLSTAT 2014.5, Statistical analysis Software) afin de déterminer les interactions entre les facteurs 'dose d'irradiation' et 'antioxydants incorporés'. Les caractéristiques intrinsèques de chaque antioxydant étaient considérées comme des facteurs dans l'ACP.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre III. Propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des films à base de mélanges de chitosan et gélatine

Chapitre III. Propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des films à base de mélanges de chitosan et gélatine

Publication n°1

Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin/chitosan blend films related to biopolymer interactions

Benbettaïeb, N., Kurek, M., Bornaz, S. & Debeaufort, F

J. Sci. Food Agric., 2014, 94: 2409–2419

Abstract

Casting method was used to develop edible plasticized film from chitosan and gelatin. Aiming to develop a blend film with enhanced properties, the effects of mixing chitosan (CS) and gelatin (G) in different proportions (CS:G, 75:25, 50:50, 25:75, v:v) have been studied. The effect of film thicknesses and relative humidity gradient on water vapour permeability of chitosan-gelatin blend films (25:75, v:v, CS:G) was done. Results showed that mean film thickness increases linearly ($R^2 = 0.999$) with surface density of the film forming solution. But, for the same thickness, blend films showed higher water vapour permeability when RH gradient was higher. An enhancement of mechanical properties by increasing the tensile strength (38.7 ± 11 MPa for pure chitosan and 76.8 ± 9 MPa for pure gelatin film) was also observed. When the gelatin content in blend films was increased an improvement of both water vapour barrier properties ($(4 \pm 0.3) \times 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ for pure chitosan and $(2.5 \pm 0.14) \times 10^{-10} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ for pure gelatin, at 70% RH gradient) and oxygen barrier properties ($(822.62 \pm 90.24) \times 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ for blend film CS:G (25:75 v:v) and $(296.67 \pm 18.76) \times 10^{-12} \text{ g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ for pure gelatin) was observed. This is agreement with the microstructural changes observed by ESEM micrographs after gelatin incorporation in the chitosan film. The Fourier Transform Infra-Red spectra of blend films showed the characteristic peaks of chitosan and gelatin in proportion to the ratio between both components with a shifting in peak position related to the amide groups (amide I and amide III) indicating interactions between biopolymers.

III.1. Introduction

Many developing countries face serious problems in managing and minimizing the quantity of solid waste. The annual waste generation increases in proportion with the rise in population and urbanization. Most of solid waste is from plastic packaging. The increased use of synthetic packaging films has led to a high ecological problem due to their total non-biodegradability. Thus, there is a vital need to develop renewable and environmentally friendly bio-based polymeric materials (Khwaldia et al, 2010). In the last decade, the use of natural biodegradable polymers was extensive as they offer many advantages over synthetic or non-biodegradable polymers for topical coating applications on foodstuff. Biopolymer-based packaging materials originated from naturally renewable resources such as polysaccharides, proteins, and lipids have become one of the main preoccupations of research teams (Kokoszka et al, 2010). While their biodegradability and environmental compatibility are guaranteed, edible biopolymers offer the best opportunities supplementing the nutritional value of foods (Debeaufort et al, 1998). A number of polysaccharides, including alginate, carrageenan, chitosan, cellulose derivatives, plant gum, starch, and pectin, have been used as the key ingredient for the preparation of edible films (Sriamornsak et al, 2006; Di Pierro et al, 2007). In general, they form reasonably resistant films, and their barrier properties against oxygen and organic vapours are good under low relative humidity (RH) conditions (<50%) (Garcia et al, 2000). Films and coatings made from polysaccharide polymers have good gas barrier properties and are more and more envisaged for applications in the biomedical (Mahammed et al, 2011) and food fields. Chitosan is a natural polymer obtained by the deacetylation of chitin, which is the principal component of the protective cuticles of crustaceans, such as crabs, shrimp and lobsters. At relatively low pH values, it is positively charged and tends to be soluble in aqueous solutions (Zinoviadou et al, 2012).

The chitosan molecule is a copolymer of N-acetyl-D- glucosamine and D-glucosamine. The sugar backbone consists of β -1, 4-linked D-glucosamine with a high degree of N-acetylation. The structure is very similar to that of cellulose, except that the acetamino group replaces the hydroxyl group on the C-2 position. Compared to other polysaccharides, chitosan has numerous advantages such as biocompatibility, biodegradability and non-toxicity, whereas it also has two important functional properties as bacteriostatic and fungistatic (Dutta et al, 2009). It is used in prevention of water pollution, as an antimicrobial agent, in medicine against hypertension and because of its hypocholesterolemic activity, for flavour encapsulation, as seed coating and for controlled release of food ingredients (Lazaridou et al, 2002). Chitosan-based materials may be used as edible films or coatings due to their interesting properties such as an excellent film-forming capacity, good mechanical properties and lower gas transfer. Therefore, it's appropriate material for designing packaging structures (Aider et al, 2010; Martins et al, 2012).

However, due to the large number of hydrogen bonds existing in chitosan, its water vapour permeability is relative humidity or water activity dependent. Butler et al. (1996), and Thawien and Manjeet. (2008) reported that chitosan films are highly impermeable to oxygen.

Thereby, one of the effective methods to improve physical, functional and barrier properties of chitosan films is to blend them with another polysaccharide or protein. Generally, mechanical and barrier properties of protein-based films are better than those of polysaccharide-based films. Gontard et al. (1996), Park. (1999) and Cuq et al. (1995) indicated that proteins (e.g. zein, wheat

gluten, albumin, keratin and gelatin) are better gas barriers than polysaccharides (e.g. pectin, methyl cellulose, hydroxypropylcellulose or starch). It is due to their compact structure which confers a wider range of potential functional properties, especially high intermolecular binding potentiality. Gelatin that is obtained by a partial degradation of collagen has been extensively studied. It is biodegradable, relatively low cost material and has excellent functional and filmogenic properties (Rivero et al, 2009; Arvanitoyannis et al 1997). Gelatin films can be used as superficial covering to protect food against light and oxygen. In addition, it was also one of the first materials used as a carrier of bioactive components (Gennadios et al, 1994).

From an extensive literature overview it was noticed that there is are several limits when each one of the two polymers are used. Since gelatin and chitosan are hydrophilic biopolymers with good affinity and compatibility; newer studies interest to blend chitosan and gelatin to obtain a film with improved properties (Arvanitoyannis et al, 1998). According to Taravel and Domard.(1995), the interactions between gelatin and chitosan are made by both electrostatic and hydrogen bonding. Blend films have compact structure with new physical properties. Therefore, combining these biopolymers seems to be a promising way to enhance properties of the resulting materials and new applications can be envisaged.

The objective of this study is to demonstrate the preparation and the characterization of blend films made from chitosan and bovine gelatin. Initially the effect of film thicknesses and relative humidity gradient on water vapour permeability of chitosan-gelatin blend films (25chitosan:75gelatin) (w:w) was studied. Moreover, mechanical, gas and water barrier properties of blend films have been considered. The possible molecular miscibility/interactions between both biopolymers have also been investigated by FTIR-ATR analysis.

III.2. Materials and methods

See Chapter II

III.3. Results and discussion

III.3.1. Colour measurements

The film appearance was studied by colour measurements. This measurement gives information for the targeted application and not for the chemical reactivity. The film transparency is a key issue to good film acceptance by end-users particularly if the film is to be used for coating a food surface or for improving product appearance. In the present study, after drying at 25 °C and 45% RH, homogeneous and flexible films were obtained. The colour attributes of all the films are given in **Table III.1**. The main difference observed among all the samples was that pure chitosan films and blends with a higher content of chitosan had higher **b** values than gelatin films. Indeed, it was previously reported that for pure chitosan films, the **b** value is the parameter that describes the natural colour of chitosan and in previous studies it was the chromatic coordinate that influenced the total colour difference (Kurek et al., 2012a). When gelatin was added to chitosan, **b** value significantly decreased ($p < 0.05$) from 4.37 (pure CS film) to -0.44 (pure G film) and it indicated the yellowness of CS films. According to Pereda *et al.* (2011), the yellowish coloration of chitosan is due to the presence of β -1-4 linked 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose repeated units also observed by Pranoto *et al.* (2005). In pure films, **a** was significantly higher for gelatin than for chitosan (**Table III.1**). Thus, in blend films by increasing the gelatin proportion, **a** value was consequently significantly increasing from -0.31 for 75CS:25G blend to -0.04 for 25CS:75G blend. The negative values of **a** parameter suggest that films had a green tint which was highly marked in the control chitosan film or in the blend film with low proportion of gelatin. A similar trend was also observed for **L** value. Then, the pure gelatin film was lighter (90.21 ± 0.07) than the chitosan film (88.55 ± 0.26). This was in the same range (88.37) as previously reported by Kurek et al. (2012a). Furthermore, in blend films, the lightness did not change significantly regardless of the different proportions of each film forming polymer.

Table III.1. Colour parameters of control and blend CS-G films equilibrated at 50% RH and measured at room temperature.

CS:G film (% v:v)	(% w:w)	L	a	b	ΔE
100:0	100:0	88.55±0.26 a	-1.05±0.25 a	4.37±0.93 a	9.73±0.44 a
75:25	50:50	89.66±0.37 b	-0.31±0.18 b	1.12±0.60 b	8.46±0.20 b
50:50	25:75	89.77±0.09 b,c	-0.55±0.05 b	1.70±0.18 b	8.29±0.08 b
25:75	10:90	90.10±0.10 d,c	-0.04±0.038 c	-0.13±0.12 c	8.23±0.06 b
0:100	0:100	90.21±0.07 d	0.05±0.04 c	-0.44±0.11 c	8.19±0.10 b

Values are mean \pm standard deviation. Means with the same letter in the same column are not significantly different at $P < 0.05$.

ΔE , as an indicator of global colour changes, was calculated from other colour parameters. It is generally known that when ΔE is less than 3–4, that means that the colour change cannot be detected by naked human eyes (Oguzlu et al., 2010). In the present study, this parameter was relatively higher for all films. However, the statistical analysis indicated that no significant changes were detected between control gelatin and blends CS-G with different proportion. The highest ΔE was observed for pure chitosan film and it was followed by other film formulations (**Table III.1**).

III.3.2. Film thickness related to formulation/process

The volume or thickness of the liquid film-forming dispersion poured in Petri dishes directly affects the drying duration and then kinetic, as expected, but could generate film with different structures (Debeaufort and Voilley, 1995). Therefore, controlling this parameter has a key role for physical and barrier properties of the dried films. **Figure III.1** displays the film thickness as a function of the amount of film forming solution (25CS: 75G, v:v) poured in the Petri dish.

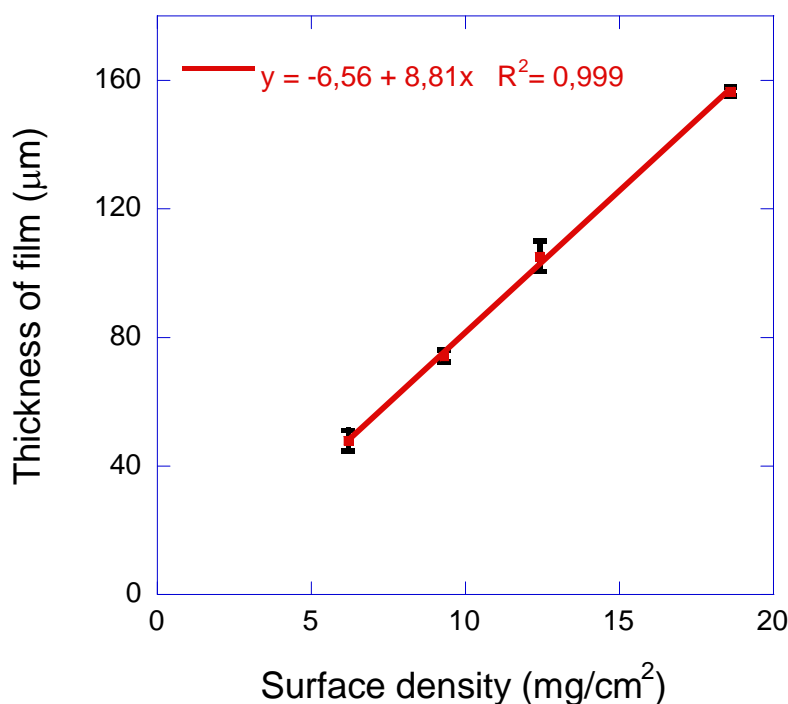


Figure III.1. Film thickness as a function of surface density (dry matter of film forming-solution normalized by casting surface area (mg.cm⁻²)) for blend film (25CS:75G, v:v)

Due to the evaporation of the solvent, the volume of the spread film forming solution was significantly reduced during drying. It can be clearly seen that the mean film thickness increases linearly with the amount of poured FFS ($R^2 = 0.999$). Thus, when the amount of FFS increased from 6 to 18 mg of dry matter/cm², film thickness increased from 47 to 157 µm, respectively. This linear behaviour suggests a very homogeneous structure not influenced by the amount of removed water or by the drying time. Moreover, this indicates that the retraction (shrinkage or densification) of the film-forming gel during drying is non-thickness, non-concentration, and non-time dependent

suggesting an ideal (Fickian) diffusion of water in the gelatin/chitosan gel and then in film during the drying step. Bertuzzi et al.(2007) analysed the behaviour of the corn amylose starch gel conditioned at different relative humidities (from 11% to 100%) during 72 h. These authors noticed that the increase of the final film thickness with the amount of initially poured gel is more pronounced when the RH was higher, but if RH is below 60%, thickness values are independent of relative humidity conditioning. Similarly, according to Phan et al.(2009a), the difference in dried edible film thickness is mostly due to the concentration of the dry matter of FFS and to the retractibility/shrinkage of the film network during drying. The same authors showed that the main factor controlling the final thickness is the dry matter content/area ratio. However, the retractibility during drying also strongly depends on the initial casting thickness (initial amount of solvent to eliminate) because it affects the drying time. Thus, the linear relationship between dry matter content/cm² and final thickness of the dry film can explain an identical retractibility and drying kinetics of all the film solutions which may also explain no differences in the film structure.

III.3.3. Water vapour permeability

III.3.3.1. Effect of film thickness

Food packaging usually aims to control (decrease as much as possible) the moisture transfers between food and surroundings. Thus WVP should be as low as possible (Gontard et al., 1992). On the contrary to hydrophobic synthetic polymeric materials, the WVP of films prepared from biopolymers strongly depends on their thickness. It is because of a swelling phenomenon due to the moisture content gradient settled in the film at the stationary state of the water vapour permeation process (McHugh et al., 1993; Gennadios et al., 1994). This was considered in the WVP measurements. The effect of film thickness on the water vapour permeability of blend film (25%CS: 75%G) (v:v) were presented in **Figure III.2.**

Results showed that when the thickness rose from 52 to 159 μm , WVP linearly increased. The increase of water vapour permeability was more marked for higher RH gradients. Thus, when thickness increased from 52 to 159 μm , for three ΔRH gradients of 70%, 54% and 45%, WVP increased 61%, 52% and 32%, respectively. During the experiment, films were exposed to a high moisture environment. Due to the hydrophilic nature of gelatin and the hygroscopic nature of chitosan, films swelled and absorbed water. This was more pronounced in thicker films. Indeed, the increase of the film permeability with the thickness indicates a water affinity of the film that could be explained by the presence of hygroscopic compounds (Morillon et al., 2002). Moreover, water has been well known for its plasticizing effect in the bio-based polymer matrices. Thus, the plasticization of the matrix occurred. It is possible that it altogether changed the matrix density with more mobile chain extremities. Therefore, the diffusion of water through the film was easier and consequently WVP increased. Similarly, McHugh et al.(1993) observed that, as the film thickness increased, the film provided an increased resistance to mass transfer across it. Consequently, the equilibrium water vapor partial pressure at the inner film surface increased. An increase of the permeability due to the higher RH gradient between the film and the environment was observed. Similar relationships between WVP and thickness in hydrophilic film systems have already been reported for high amylose

corn starch (Bertuzzi et al., 2007), cellulose derivative films (Hagenmaier and Shaw, 1990) protein and other edible films (Gennadios et al., 1994; Longares et al., 2004; McHugh et al., 1993; Cuq et al., 1996; Sobral et al., 2001; Mali et al., 2004). The increase is more important when RH gradient is higher. When the quantity of water content is lower, the plasticizing effect of water is less marked thus the ability of the film to swelling is weaker and consequently the water vapour transfer is lower. A previous work showed that the water vapour transfer rate of some protein-based edible films varies linearly when the thickness ranges between 50 to 100 μm^2 . A similar behaviour was also observed for some polysaccharide based edible films (Gennadios, 2002). Quezada Gallo et al. (2000) showed that WVTR of methylcellulose, used as the film-forming substance, and lipid mixtures exponentially decreased when the thickness increased between 0 and 90 μm , but WVP was independent of the thickness. Biquet and Labuza. (1988) observed a decrease of WVTR and permeability through film whose thickness varied from 60 to 90 μm . However, for a higher thickness (between 90 and 120 μm) WVTR still decreased but permeability increased.

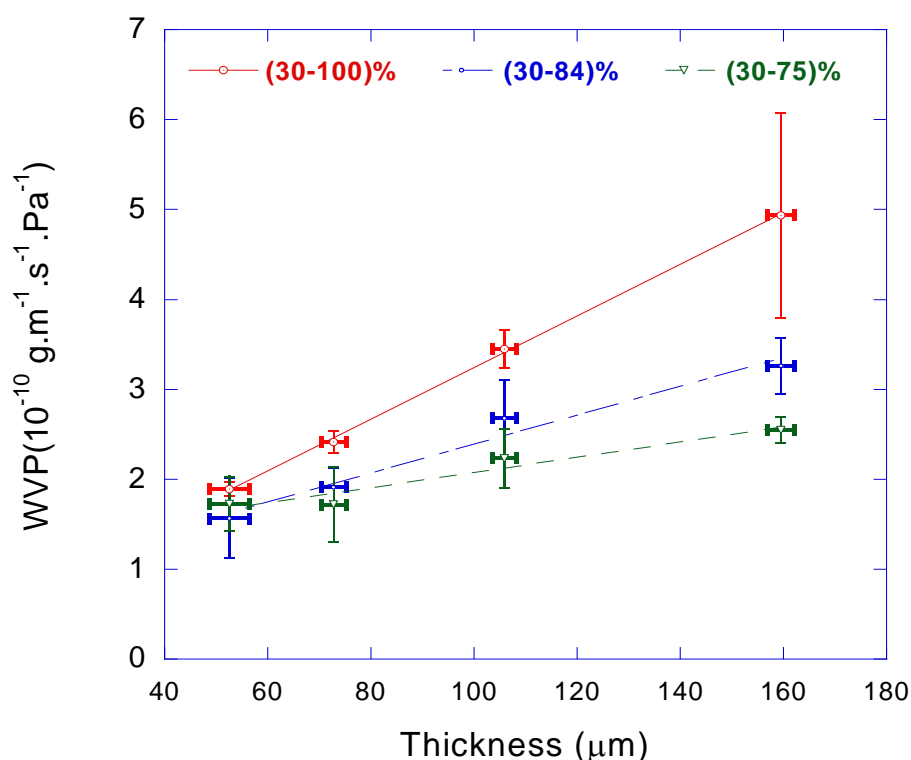


Figure III.2. Effect of film thickness on water vapour permeability for chitosan/gelatin blend films (25CS:75G, v:v) at 25 °C for 3 different RH differentials

In our study, only for a thickness higher than 60 μm , the WVTR decreased linearly with the thickness (data not showed in this paper) which seems to correspond to an ideal Fickian behavior of the films. The exponential decrease of the WVTR at thicknesses lower than 60 μm could be explained by defect such as micro holes. Indeed, this change of slope could not be due to a non linear swelling according to the thickness as is often observed in polysaccharide or protein based edible films. However, as the WVP increases with thickness, instead of being constant whatever the thickness. The commonly P=DS model where P is the permeability coefficient, D is the diffusion coefficient (determined from

the Fick's second law with the appropriate boundary conditions) and S is the solubility coefficient does not apply. Indeed, the $P=DS$ model implies that both the solubility and diffusivity coefficients are constant (linear isotherm, and non-concentration or time dependent diffusion) and the medium is anisotropic which never occurs with water sensitive films. The increase of the WVP with thickness is attributed to a swelling and a plasticization of the film (Bertuzzi et al., 2007). This is confirmed by the fact that the slope of WVP versus thickness increases with the RH gradient or value. This linear behavior is of great interest for developing a prediction model of water vapour transfers, and then model for the estimation of food shelf life.

As the thickness affects the WVP data, all following part have been studied for a constant thickness of $80 \pm 5 \mu\text{m}$.

III.3.3.2. Effect of relative humidity gradient

The driving force of the moisture transfer is the vapour pressure difference between the two sides of the film. However, it is well known that the WVP of hydrophilic films depends both on the RH difference and the absolute humidity values (Han Jung, 2005). The water vapour permeability of all the films was studied at three relative humidity gradients (ΔRH 70%, 54% and 45%). Results are presented in **Table III.2**.

Table III.2. Water vapour permeability (WVP) of control and blend CS:G films at 25°C under different RH gradient ((30-100) %, (30-84) % and (30-75) %)

CS:G film (v:v)	WVP ($10^{-10} \text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)		
	$\Delta\text{RH:30-100\%}$	$\Delta\text{RH:30-84\%}$	$\Delta\text{RH:30-75\%}$
100:0	4.019±0.291 a	2.627±0.159 a	2.068±0.054 a
75:25	2.808±0.145 b	2.393±0.235 a,b	1.680±0.233 b
50:50	3.298±0.205 c	2.376±0.146 b	2.073±0.133 a
25:75	2.513±0.145 d	1.632±0.794 c	1.574±0.204 b
0:100	2.498±0.147 d	1.474±0.113 c	1.300±0.080 c

Values are mean \pm standard deviation. Means with the same letter in the same column are not significantly different at $P < 0.05$.

Furthermore, from **Figure III.3**, it can be seen that for the same thickness ($80 \mu\text{m}$), the permeance of blend films (25CS:75G) (v:v) rose linearly when RH gradient increased. At high RH the moisture content of the film increases and probably the film was plasticized by water. Thus, the polymer chain mobility increases, thereby increasing moisture diffusivity (Han Jung, 2005). Kokoszka et al. (2010a,b) showed that the plasticization of the protein network in different protein based films by water influences the water vapour transport through the film and is more pronounced when the RH gradient is higher. Similar observations have been also reported for other bio-based polymer films

such as starch (Talija et al., 2008), agava-cassava starch blends and cassava starch-arabinoxylan films (Phan et al., 2009b). This indicates that, other than the effect of binary polysaccharide mixtures, the moisture barrier properties of these films are also strongly related to the environmental RH (**Figure III.3**).

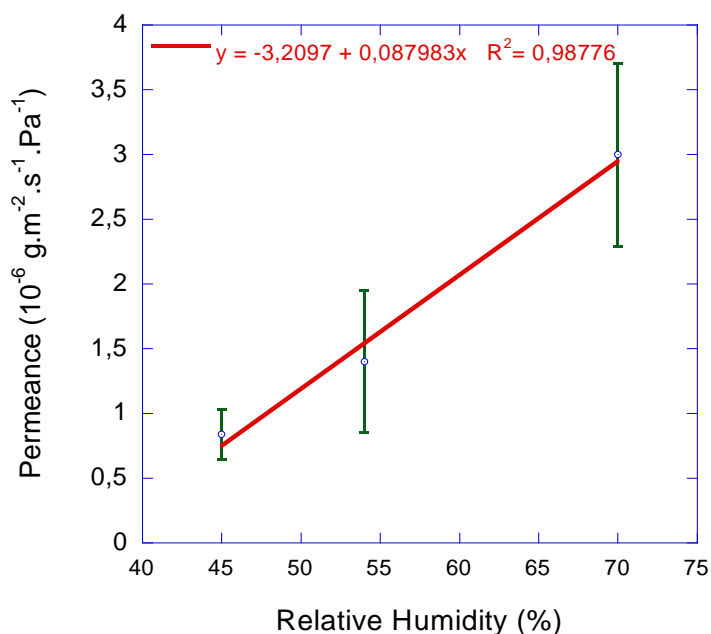


Figure III.3. Permeance as a function of RH gradient for chitosan-gelatin blend film (25CS:75G,v:v) at 25°C

III.3.3.3. Effect of composition of film on WVP and WVTR

The composition and structure of edible blend films affects the mechanism of water transfer and thus the barrier performances (Morillon et al., 2002). The WVP of all tested films at three RH gradients is given in **Table III.2**. For all the RH gradients tested, the gelatin films showed better water vapour barrier properties than chitosan films. Thus, for gelatin film for ΔRH 45% and 70%, WVP ranged from $(1.3 \pm 0.08) \times 10^{-10}$ to $(2.5 \pm 0.15) \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$. For the same ΔRH , WVP of chitosan films varied from $(2.07 \pm 0.05) \times 10^{-10}$ to $(4.02 \pm 0.29) \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$. Due to their hydrophilic nature polysaccharides are highly accessible to moisture and exhibit poor water vapour barrier properties as observed by many authors. The values obtained for the chitosan films study were comparable with those reported by Pereda et al.(2011) and Kurek et al.(2012b). Furthermore, the WVTR of chitosan film were significantly ($p < 0.05$) higher than those of gelatin film (**Figure III.4**) tested for the three RH gradients.

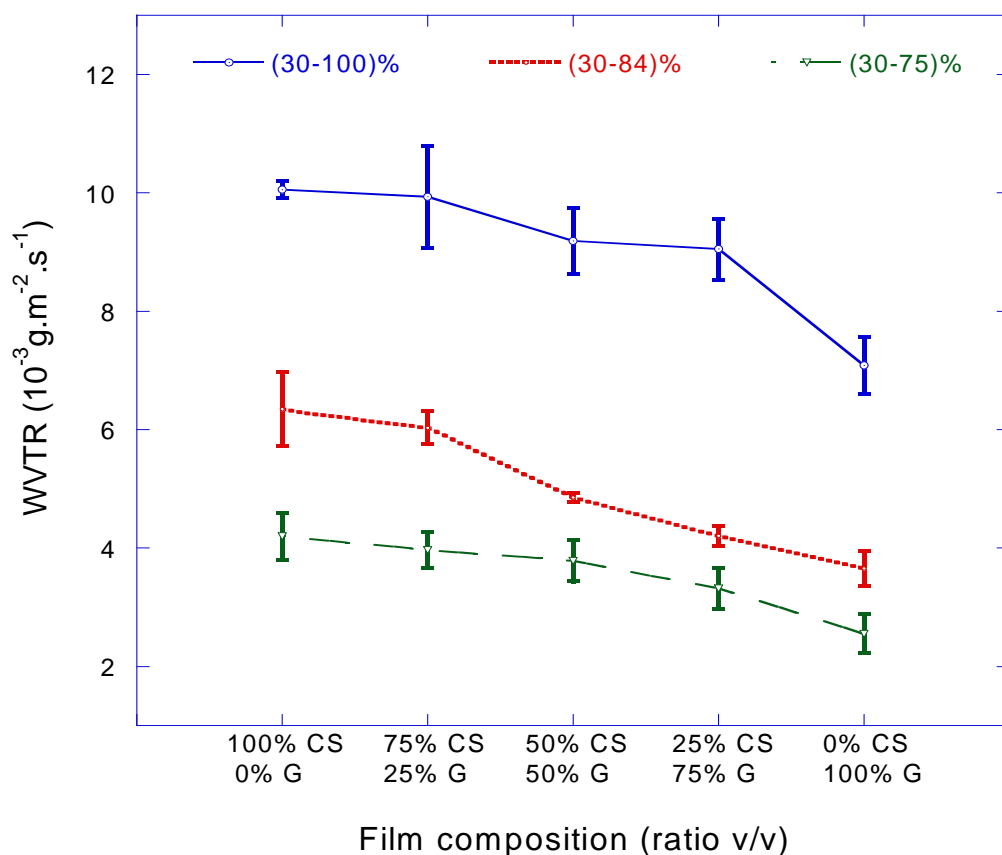


Figure III.4. Water vapour transfer rate (WVTR) of control and blend CS:G films (75CS: 25G, 50CS:50G and 25CS:75G, v:v) at 25°C under different RH gradients ((30-100) %, (30-84) % and (30-75) %).

When gelatin was added to mixtures to form blend films, WVP and WVTR of chitosan films was significantly reduced. Similar observations were reported for each RH differential. Thus, in blend films, gelatin might crosslink with chitosan by intermolecular bonding (e.g. electrostatic and hydrogen bonding). Furthermore, a decrease in the free volume or a densification of the network mesh of the polymeric matrix might occur, thus decreasing the diffusion rate of the water molecules through the films. As a result, the WVP and the WVTR of the blended films were lowered. The enhancement of the barrier permeability of chitosan by a gelatin addition was also observed by Pereda et al. (2011). Contrarily, Kolodziejaska and Piotrowska.(2007) observed a decrease of the WVP of cod skin gelatin based edible films when chitosan was added. Hambleton *et al.*(2012) reported that from iota-carrageenan and sodium alginate blended film, the decrease in WVTR could also be related to that of the free volume due to reticulation of the polymeric network. Similar results have been reported by Fabra et al.(2008) with the addition of beeswax in sodium caseinate films. As previously observed, the addition of gelatin makes the structure of blend films more homogeneous as observed by SEM (unpublished results), thus stabilizing the matrix of polymers and leading to a reduction of free spaces in the final network and consequently enhancing barrier properties. The effect of RH on the water vapour permeability of control and blend films was also considered. As can be seen in **Table III.2**, the water vapour permeability of CS, G and CS-G blend film increases with the relative

humidity. The increase was very weak at higher RH gradient studied (70% RH). Similar results were found for chitosan-layered silicate nanocomposite films (Paranto et al., 2005) and alginate films (Olivas and Barbosa-Canvas, 2008). In our study, for all film, WVTR increases with RH gradient (**Figure III.4**). In previous works, the same behaviour was observed for i-carrageenan films (Hambleton et al., 2008). The authors have shown that when the relative humidity increases the polysaccharide-based films are more permeable due to swelling and/or plasticization. Hambleton et al.(2012) showed that the water acts as a plasticizer more efficiently than polyols usually used in hydrophilic coatings (e.g. polysaccharide and protein) and that the density or local viscosity decreases enhancing the mobility diffusion of molecules through the film.

III.3.4. Oxygen permeability

Since the oxygen permeability of food packaging materials is of great importance for food preservation, particularly against lipid oxidation, various ideas in the production of bio-based films and blends are used to ameliorate gas barrier properties. Generally, in dry conditions, chitosan films are expected to be a good gas barrier (Kurek et al., 2012b). However, their barrier efficiency is significantly influenced by the environmental humidity. In the present study, to investigate the ability of protein in enhancing barrier properties of polysaccharides films bovine gelatin was added to chitosan. As most of the fresh food products have a high water activity and thus the humidity inside the packaging is higher than 50%, the oxygen permeability in this study was tested at 57% RH. Results are given in **Table III.3**. The blends with content higher than 50% of gelatin had improved the oxygen barrier properties. Indeed, PO₂ decreased from 943.21 to $296.67 \times 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ when the gelatin proportion increased from 50% to 100%. Addition of gelatin to chitosan increased the polymer network density and changed the oxygen solubility in the network. Zhong and Xia.(2008) showed that gas barrier properties of chitosan/cassava starch and gelatin blend increased with the increase of cassava starch and gelatin content. This was attributed to the formation of intermolecular hydrogen bonds between (NH₃⁺) of chitosan and gelatin backbone/OH- group of cassava starch. Thus, this molecular interaction resulted in blend films with a more compact structure and consequently lower permeability. In summary, the oxygen barrier properties of chitosan films can be improved by the addition of gelatin to the polysaccharide polymer matrix to form a blend film with a better gas barrier at relative humidity lower than 50%.

III.3.5. Mechanical properties

The mechanical properties of edible films are of great importance due to their influence on product performance, which is currently being investigated by various researchers (Pereda et al., 2011). Stress (s) - strain (σ) curves obtained from tensile tests for all tested films are given in **Figure III.5**. These curves exhibited the typical deformation behaviour that could be related to T_g (glass transition temperature) of films according to Ashby and Gibson.(1988).At low strains (lower than 8%), the stress increased rapidly with an increase in the strain and the slopes were in the elastic region defining the Young's modulus. At strains >8%, the stress increased slowly until failure occurred.

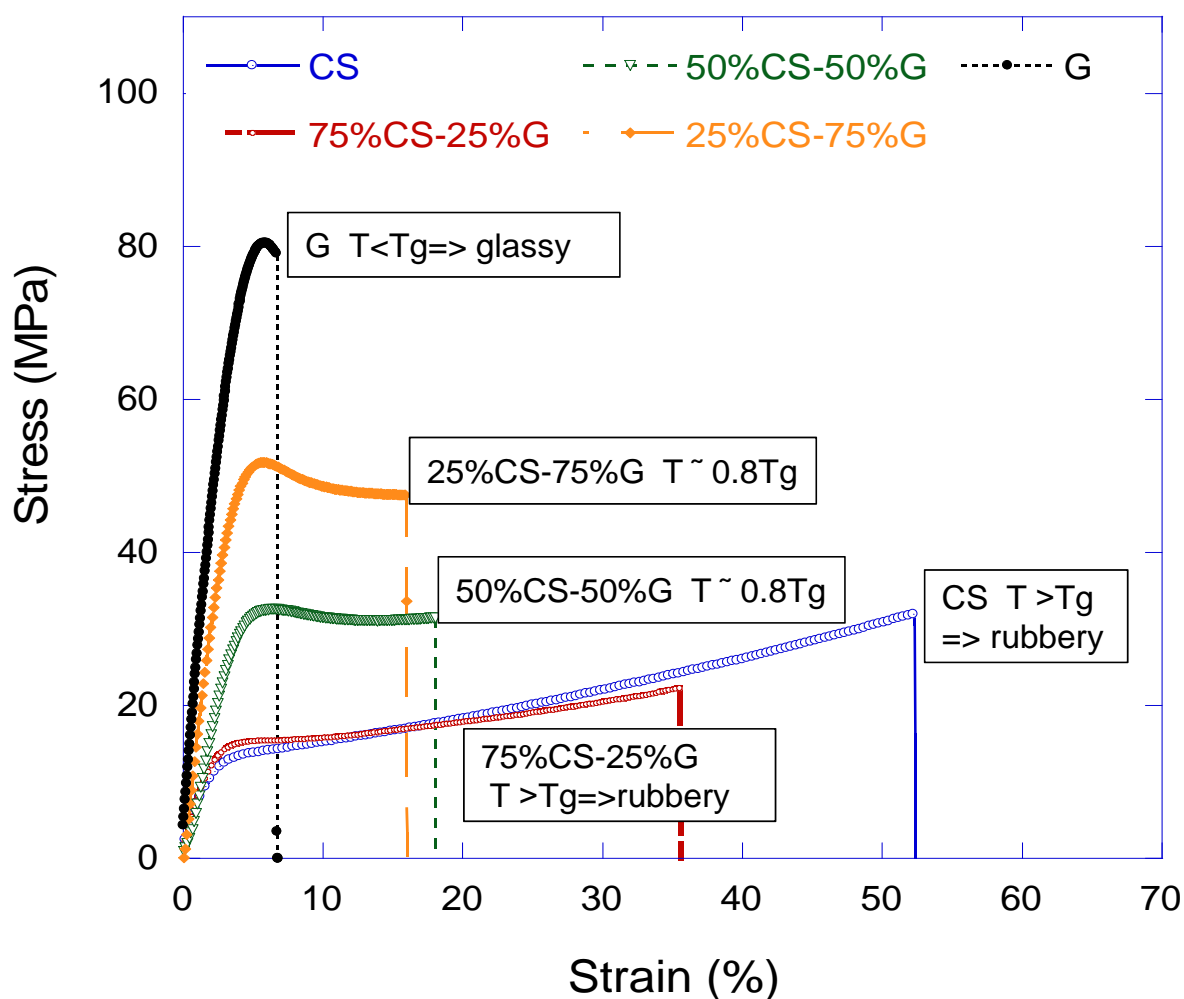


Figure III.5. Typical stress–strain curves from tensile test of control (CS and G) films and their blended ones (75CS:25G, 50CS:50G and 25CS:75G, v:v) equilibrated at 50% RH and 25°C. T is the temperature of mechanical measurements (20°C) and T_g is the theoretical glass temperature from DSC analysis.

The chitosan film was more deformable than the gelatin film. Blending chitosan and gelatin enhanced the stiffness. Hosseini et al.(2013) showed that the addition of CS to gelatin films produced more flexible films suggesting that CS takes part in the weakening or reduction of the number of hydrogen bonds, acting as a plasticiser. These results were opposite of those reported by other authors (Pereda et al., 2011). They indicated that chitosan film was tough and hard whereas gelatin-chitosan films were softer and more flexible. The mechanical parameters, tensile strength (TS), Young’s modulus (Y) and elongation at break (E) are summarized in **Table III.3**.

Résultats et discussion. Chapitre III

Table III.3. Mechanical properties, water solubility and oxygen permeability of control and blend CS-G films. TS, YM and % E were measured at 25°C and 50% RH. FS was determined after immersion in water for 24 h. PO₂ was measured at 25°C and 57% RH.

CS:G film (v:v)	TS (MPa)	YM (MPa)	E (%)	Solubility (%)	PO ₂ (10 ⁻¹² g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
100:0	38.734±11.29 a.b	5.00±0.75 a	65.0±17.2 a	33.97±0.86 a	ND
75:25	28.066±6.855 a	5.68±0.28 a	41.0±7.7 b	33.09±1.19 a	822.62±90.24 a
50:50	43.188±3.507 b	7.69±0.58 b	49.8±4.7 b	37.15±1.84 b	943.21±50.51 b
25:75	43.306±10.902 b	12.97±1.17 c	12.7±6.6 c	37.84±0.77 b	486.21±18.45 c
0:100	76.794±9.913 c	18.82±1.50 d	5.9±2.2 c	51.64±1.79 c	296.67±18.76 d

Values are mean ± standard deviation. Means with the same letter in the same column are not significantly different at P < 0.05. **ND not determined**

TS, YM and E of chitosan films were 38.73±11.00 MPa, 5.00±0.75 MPa and 65.00±17.20%, respectively. These values are higher than those reported by Pereda et al.(2012) (TS=8.41 MPa and E= 19.55%), but TS is in the same range as reported by Oguzlu and Tihminlioglu.(2010). Mechanical properties of chitosan or composite films containing chitosan depend on numerous parameters: the molecular mass of the polymer, the pH of the FFS, the deacetylation degree of the chitosan, the drying conditions, the solubilisation method, and the water content (Klodziejska and Piotrowska, 2007; Butler et al., 1996; Caner et al., 1998; Rivero et al., 2009). Thus, the comparison with the literature data for tensile tests gives opposite interpretations.

In contrast to chitosan, gelatin film showed significantly higher (p < 0.05) TS value (76.79±9.91 MPa) and YM (18.82±1.50 MPa), but reduced E (5.9±2.2%). Thus, gelatin films were mechanically stronger but less deformable than chitosan. Indeed, authors Park.(1999) and Cuq et al.(1995b) showed that the mechanical properties of protein-based films are generally better than those of polysaccharide-based films. In blend film formulations, the addition of gelatin significantly (p < 0.05) increased TS and YM, whereas E substantially decreased (**Table III.3**). This can be explained by the antiplasticization effect of added gelatin. Film exhibited very high YM, high TS and lower E at room temperature that are typical properties of glassy materials (Lazaridou and Biliaderis, 2002). The enhancing of the strength with increasing the gelatin proportion in blend CS-G film might be explained by the formation of a denser matrix. Therefore, a more stable network due to the attractive interactions between CS and G in blend films could have been formed. The loss in E that was observed for films with higher gelatin content means that the stretchability of blend films could be affected when a sufficient amount of G is added. These results were not in accordance with the work of Pereda et al.(2011) who reported that chitosan films showed substantially higher TS and a reduced E values, when compared with gelatin films. However there are some examples where opposite behaviour was reported for chitosan/bovine gelatin blend (Hosseini et al., 2013) and gelatin/chitosan blend (Cheng et al., 2003). From the shape of stress-strain curves, in chitosan

containing films a large extension to failure was observed (**Figure III.5**). This film behaviour was attributed to the fact that with a high proportion of chitosan in blend films, the polymer deforms homogeneously by a viscous process that gives a large extension to failure. Cheng et al.(2003) showed that the mechanical properties of chitosan were improved by blending it with gelatin. This is due to the interactions between gelatin and chitosan produced by both electrostatic and hydrogen bonding. Therefore, increment in TS value could be linked to the formation of a more stable network due to attractive interactions between CS and G in blend film. However these are only assumption and these authors did not displayed or measured interactions really involved in their systems. Pranoto et al.(2007) reported that there was an optimum level for the interaction between polysaccharides and gelatin where gelatin present the major and dominant phase in the film system they used. The rise of the mechanical strength with an increasing gelatin proportion may be an important advantage for blend films in some applications.

III.3.6. Film solubility

The film solubility in water is an important property of edible films or biodegradable films. Their potential applications may require a low water solubility to enhance both product integrity and water resistance (Turhan and Sahbaz, 2004). Generally, a higher solubility would indicate lower water resistance (Bourtoom et Chinnan, 2008). In this study, the solubility of chitosan films in water is 34% (**Table III.3**). This is in accordance with the values reported by Hosseini et al. (2013). Pure bovine gelatin films showed significantly higher solubility values (52%) than chitosan films. This was considerably lower than those reported by Hosseini et al.(2013) for fish gelatin films (around 64%). Furthermore, in previous works reported by Pereda et al. (2011), Gennadios.(2002) and Martucci and Ruseckaite.(2009), it was found that plasticized-gelatin films were completely soluble in water. On the contrary, plasticized-chitosan films were slightly soluble in water (e.g. about 16.2% after 24 h). Blended CS-G films were significantly less soluble than gelatin but slightly more soluble than chitosan film ($P < 0.05$). This indicated that the obtained values did not respond to a simple mixture but could result from interactions between both biopolymers, such as electrostatic forces and hydrogen bonding as expected by Taravel and Domard (1995). But the effect of gelatin on the solubility of blend films is effective since 50% (v/v) proportion of gelatin content. In blend films when the proportion of gelatin is greater than 50%, the solubility was significantly increased. These results pointed out that there is a lower molecular miscibility between the two biopolymers for higher amounts of gelatin or it is only due to the higher solubility of gelatine.

III.3.7. FTIR spectroscopy of chitosan–gelatin blend films

Table III.4 and **Figure III.6** show FTIR spectra of G, CS and CS:G blend films. The position of relevant peaks in the spectrum of CS films was similar to those described by other authors (Pereda et al., 2011; Yin et al., 2002; Abugoch et al., 2011; Kurek et al., 2012c). The characteristic bands appeared at 1636 cm^{-1} (amide I band of the acetyl group), 1570 cm^{-1} (NH_3^+ absorption band, partially over imposed with amide II band) and the broad absorption band at $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ due N-H and

hydrogen bonded O-H stretch vibrations. Peaks between 900 and 1150 cm^{-1} were assigned to the C₂ position of pyranose rings and amino groups, respectively (Lima et al., 2006).

The spectrum of gelatin films displayed relevant peaks arisen from an amide C=O stretching/hydrogen bonding (around 3000 cm^{-1}) coupled with COO at 1636 cm^{-1} (amide I), bending vibration of N-H groups and stretching vibrations of C-N groups at 1550 cm^{-1} (amide II) and the in-plane vibrations of C-N and N-H groups of bound amide or vibrations of CH₂ groups of glycine at 1239 cm^{-1} (amide III) (Gennadios, 2002; Yin et al., 2005; Nur Hanani et al., 2013; Tongnuanchan et al., 2012). The same absorption peaks were reported by Liu et al. (2012) for gelatin films made using tilapia fish skin.

The spectra of the blend films exhibited the characteristic peaks of both G and CS. The intensity of characteristic peaks changed depending on the blend formulation. However, only shifts in the peak position of the amide I (ν_{CO}) and amide III ($\delta_{\text{CN}}, \delta_{\text{NH}}$) groups were observed. Thus it indicated that the obtained spectra result from the molecular interactions between the biopolymers, and do not correspond to a simple mixture or just a position of these networks in the blend structure (Table III.4).

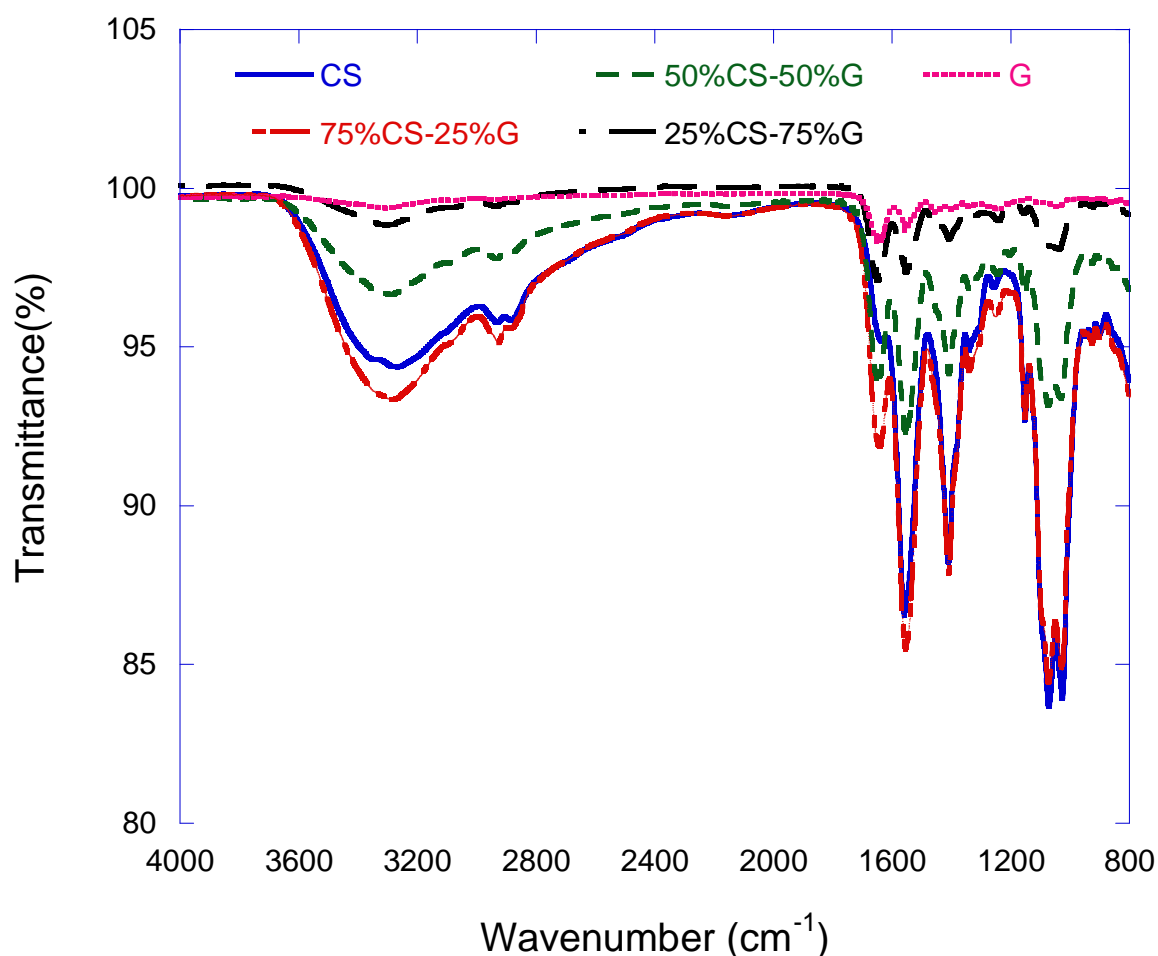


Figure III.6. FTIR spectra of chitosan, gelatin and their different blends films (volume ratio) equilibrated at 50% RH

Table III.4. Specific spectra band and their attributed functions from FTIR analysis for control and blend CS-G films (volume ratio)

Frequency (cm ⁻¹)	groups	CS	75CS:25G	50CS:50G	25CS:75G	G
3100-3600	ν_{OH} ν_{NH} Amide A and free water	3267	3300	3298	3299	3315
2850-2960	ν_{CH} Amide B	2930	2931	2931	2938	2938
1630-1660	ν_{CO} Amide I	1636	1642	1653	1653	1646
1540-1570	δ_{NH} Amide II	1559	1559	1559	1559	1558
1325-1410	δ_{OH} , δ_{CH} and δ_{CH_3}	1410	1409	1408	1407	1403
1204-1310	δ_{CN} , δ_{NH} Amide III	1257	1246	1244	1241	1240
1167-1033	Pyranose cycle bond	1152	1152	1152	1153	1043
900-1150	Pyranose ring and amino groups	927	927	925	923	922

In bold, shifted peaks. Measurements are given as a mean of 3 scans

The absorbance of amide-II and amide-III bands increases slightly while increasing the proportion of chitosan. According to Hoseini et al.(2013) this might be related to amino and carbonyl moieties. Authors suggested that these groups interact mainly through electrostatic interactions confirming the formation of a soluble polyelectrolyte complex. Liu et al. (2012) noticed that decrease in vibrational wavelength (1649 cm⁻¹, 1542 cm⁻¹, and 1234 cm⁻¹ associated to amide-I, amide-II and amide-III peaks respectively) and a broadening of the OH and NH vibration bands are indicative of an hydrogen bonding interaction between both biopolymers forming final film. In previous work, Cheng et al.(2003) also found that incorporation of gelatin generated a small modifications in the spectrum of chitosan, suggesting that in the polyelectrolyte complex formation hydrogen bonding occurs between chitosan and gelatin molecules. In general, the simple analysis of specific spectra is confirmed not be a good mean to determine molecular interactions between these biopolymers. But, Sionkowska et al.(2004), Yin et al. (2005) and Liu et al.(2012) developed an easy and pertinent way to make up the presence of specific molecular interactions consisting in comparison of the predicted FTIR spectrum as the weighted sum of the experimental spectra of the individual G and CS films.

III.3.8. Supplementary data: Film microstructure

To display microstructural changes in the films, environmental scanning electron microscopy (ESEM) was conducted to visualize cross-section topography of different films prepared from chitosan (CS) and/or bovine gelatin (G), at different ratios (v:v, 75%CS:25%G, 50%CS:50%G, 25%CS:75%G) (**Figure III.7**). Chitosan and gelatin films showed very different structures that could be related to mechanical and barrier behaviours. Chitosan film surfaces and cross sections appear as smooth, whereas gelatin films present a fibrous structure which is characteristic of collagen fibrils.

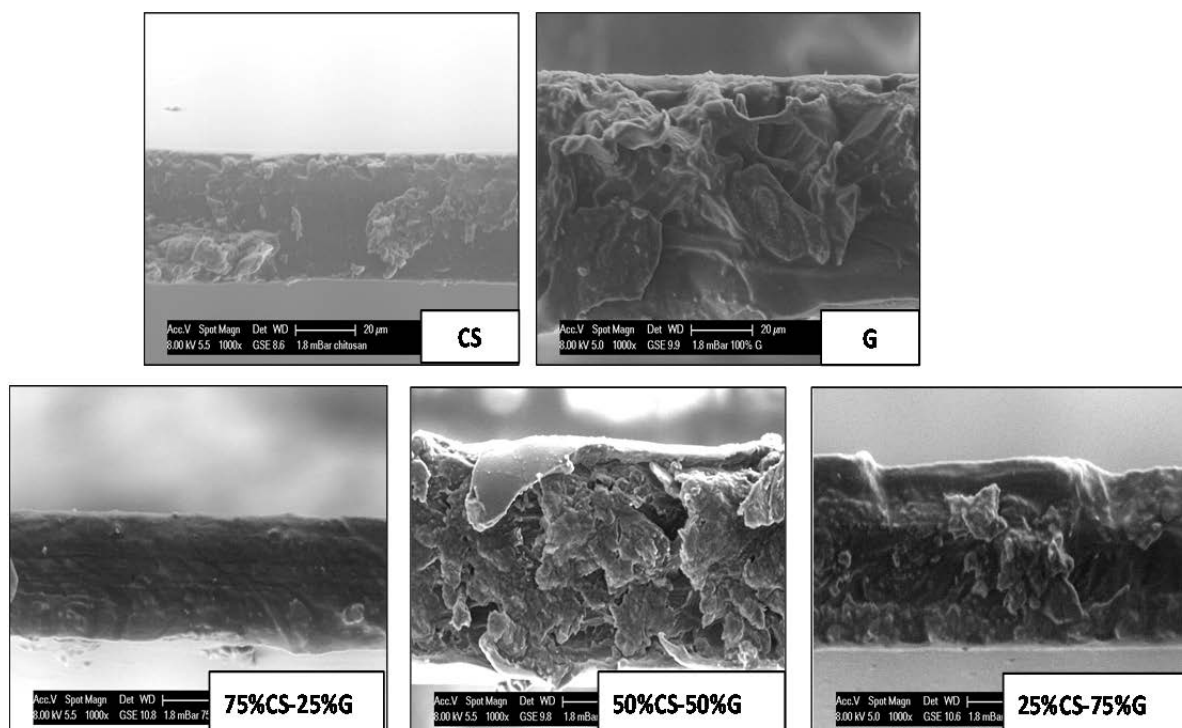


Figure III.7. Cross sections ESEM micrographs of chitosan (CS), gelatin (G) and their respective blend films (75%CS:25%G, 50%CS:50%G and 25%CS:75%G, v:v), (magnification $\times 1000$).

Electron micrographs of blend films showed a compact and homogenous structure without any large pores. These results indicated that the chitosan and gelatin were completely miscible at different levels. Moreover, the formation of the polyelectrolyte complexes between gelatin and chitosan may play an important role in the cross-linking network and probably conducted to an interpenetrated network. With the addition of chitosan, the gelatin underwent cross-linking via covalent and non-covalent bonding, resulting in greater intermolecular aggregation in the three-dimensional network (Liu et al., 2012). Jiridi et al. (2014), in the case of composite chitosan-fish gelatin film showed that, the microstructures of gelatin films were governed by interactions within the film network. The compact and dense structure of blend film is responsible for the lower elongation and higher tensile strength obtained in the films after gelatin incorporation, as previously described (**Table III.3 and Figure III.5**).

Conclusions

In this study, the effect of the film thicknesses and the RH gradient on the water permeability of blend films (25CS:75G, v:v) was studied. Results showed that the mean film thickness increases linearly with the amount of solids of the film forming solution poured ($R^2 = 0.999$). In blend films for the same film thickness, the higher relative humidity leads to the higher water vapour permeation. The improvement of chitosan film properties was investigated by its association with bovine gelatin. Therefore, the attempt to develop composite/blended edible films using polysaccharide and protein mixtures showed that gelatin could be an advantageous component that contributes to the improvement of the barrier and the mechanical properties of chitosan films. Gelatin can interact with chitosan via strong intermolecular bonds during film formation resulting in a compact structure that enhances mechanical and barrier properties of the blended films. The gelatin incorporation of different proportions to chitosan film-forming solution increased TS and Young's modulus, and decreased the oxygen and water vapour permeability of the final films. This is in agreement with the more compact structure (displayed by the ESEM micrographs) when gelatin proportion increased on the blend films. From FTIR analysis, the obtained spectra showed a shifting in peak position of the amide I and amide III groups indicating some hydrogen interactions between both biopolymers. Increasing the water solubility with a gelatin addition is considered a disadvantageous and critical factor in some applications of food packaging. In spite of this, the adequate mixture of blend films referred to the film 25CS:75G (v:v) with good mechanical and barrier properties as well as fairly weak solubility. This can give a promising utility and great advantage for their use in packaging or coating to improve food quality. Further investigation on foodstuff is needed to check the advantage of produced coatings when applied on real food. In addition, these films could be used for the incorporation of antimicrobial agents for the creation of controlled release systems for food preservation.

In aims to valorise by-products from marine industries, the bovine gelatin used in this chapter was substitute by a fish gelatin which the bloom is similar. Preliminary trials with fish gelatin displayed the best compromise of film properties are obtained with a weight ratio of 50%-50% (w:w) chitosan-gelatin which corresponds to the 75%-25% volume ratio. So in the next chapters, only this proportion of chitosan-fish gelatin is chosen.

Chapitre IV. Influence des traitements d'irradiation sur les propriétés physico- chimiques et fonctionnelles des films

Chapitre IV. Influence des traitements d'irradiation sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des films

IV.1. Effet des irradiations sur les propriétés des films de gélatine

Publication n° 2

Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties

Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.H. & Debeaufort, F

J. Food Chem., 2015, DOI: [10.1016/j.foodchem.2015.03.034](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.034)

Abstract

The objective of this work was to display the effect of electron beam accelerator doses on properties of plasticized fish gelatin film. Electron spin resonance indicates free radical formation during irradiation, which might induce intermolecular cross-linking. Tensile strength for gelatin film significantly increases after irradiation (improved by 30% for 60 kGy). The vapour permeability is weakly affected by irradiation. Surface tension and its polar component increase significantly and are in accordance with the increase of wettability. So, irradiation may change the orientation of polar groups of gelatin at the film surface and crosslink the hydrophobic amino acids. No modification of the crystallinity of the film is observed. These findings suggest that if structure changes, it only occurs in the amorphous phase of the gelatin matrix. It is also observed that irradiation enhances the thermal stability of the gelatin film, by increasing the glass transition temperature and the degradation temperature.

IV.1.1. Introduction

Synthetic polymer materials have been widely used in every field of human activity during the last century. Most of solid wastes (38 wt%) come from plastic packaging. Consequently, the environmental impact of non-biodegradable plastic polymers is a serious and major concern. In order to reduce pollution caused by traditional plastic films, biodegradable films which are made out of renewable resources have shown a promising potential. Currently, they represent less than 10% of the use of polymers as films. These biosourced polymers are usually obtained from (a) chemical synthesis of bio-derived monomers, such as polylactate; (b) polymers naturally produced by microorganisms, such as polyhydroxybutyrate; and/or (c) extracted from biomass like plants (starch, cellulose) or coproducts from food industries (gelatin, whey protein, chitosan). Among the biosourced polymer-based films, protein-based films offer good mechanical and gas barrier properties (Jo et al, 2005). Indeed, the specific structure of proteins and their ability to form strong intermolecular covalent, ionic and hydrogen bonds allow to easily create linkages and then cohesive networks.

Gelatin, a natural polymer also considered as a by-product of food industry has a great potential for edible/biodegradable film applications. The rising interest in putting by-products from the fish industry to good use is one of the reasons why the industrial production of fish gelatin has been growing in recent years (Gomez-Guillen et al., 2002). Moreover, socio-culturally, marine gelatins are regarded as an alternative to terrestrial mammalian (bovine and porcine) gelatins, since pork consumption is forbidden by Judaism and Islam religions. Fish gelatin is abundant, biodegradable, has excellent film-forming properties, good barrier against oxygen and aromas at low water content, and is of relatively low cost. As a rule, the physical properties of gelatin films depend chiefly on the properties of the raw materials extracted from the different animal species and on the processing conditions of gelatin manufacturing which affect physicochemical properties of film. Avena-Bustillos et al. (2006) reported the water vapour permeability (WVP) of cold-water fish-gelatin films to be significantly lower than that of films made from warm water fish gelatin or mammalian gelatin and explained the tendency of fish-gelatin films to exhibit lower WVP values than land animal-gelatin films in terms of the amino acid composition, since fish gelatins, especially cold-water fish gelatins, are known to contain higher amounts of hydrophobic amino acids and lower amounts of hydroxyproline. Similarly, using equivalent procedures and plasticizing conditions (sorbitol or glycerol, 25 at 30% of gelatin content), the WVP of halibut-skin gelatin films (Carvalho et al., 2008) and tuna-skin gelatin films (Gomez-Guillen et al., 2007) was also reported to be lower than that of mammalian-gelatin films (Sobral & Habitante, 2001). For this reason we have interested to use fish as source of gelatin based film. However, the main limitation of gelatin films lies in its high sensitivity to water and then it is necessary to improve the barrier and physical properties of this biopolymer. Various methods to enhance the physical properties of protein films have been considered. One of the most common solutions consist in blending gelatin with another polymer in order to improve the final network properties (Benbettaieb et al., 2014). The addition of hydrophobic substances can also enhance the gas barrier properties but depends if added as emulsion-based structures or as laminates (multilayer films). Indeed, Apostolov et al. (2002) showed substantial increases of Young's modulus and tensile strength in comparison to neat gelatin (not laminated) by a factor of 2–3 and 4–5, respectively, for both linen- and silk-reinforced gelatin laminates. This can be due to establishment

of chemical links between the matrix and the reinforcing agent (silk and linen). In the same way, Martucci and Ruseckaite (2009) showed that the association of gelatin based layers subjected to different technological treatments such as cross-linking, compounding with clay and heat-compression molding can provide a new multilayer material with modulated biodegradability under soil burial conditions. The same authors, Martucci and Ruseckaite (2010) founded that multilayer film derived from bovine gelatin film have lower water vapour permeability and total soluble matter but higher tensile strength and elastic modulus compared to the single layers. Another solution consists in making a bilayer structure with another polymer. Irissin-Mangata et al. (2000) found that bilayer polymer films from wheat gluten and UV-curable resins have reduced water vapour permeability by more than 50% compared to the monolayer film. Crosslinking of proteins is another solution that can lead to stiffer and less permeable films. Several studies have investigated the improvement of functional properties via cross-linking induced by heat and chemicals agents (Micard et al., 2000), or enzymes (Carvalho & Grosso, 2004). However, most of these agents are costly and may induce toxicity or lead to other undesirable effects. Physical treatment using high energy irradiation can provide a cost-lowering and environmentally alternatives to change the physical, chemical and/or biological characteristics of a product. Irradiation treatment also requires limited sample preparation. Moreover, it is fast and does not require any catalyst or temperature increase (Woods & Pikaev, 1994). The irradiation of polymeric materials with ionizing radiation (essentially high frequency ultraviolet (UV), gamma and electron beam) can lead to the formation of very reactive intermediates, free radicals, ions and excited states. These intermediates follow several quick reaction pathways that result in disproportionation, hydrogen abstraction, arrangements and/or the formation of new bonds within polymer chains which therefore modifies the final structure of the network (Chmielewski et al., 2005). Ouattara et al. (2002) displayed that gamma-irradiation produced free-standing cross-linked milk proteins and therefore improved water vapour permeability and chemical stability. Gamma-irradiation also induced a substantial increase of high molecular weight protein components in film forming solutions. Lacroix et al. (2002) and Lee et al. (2005) demonstrated that γ -irradiation was effective in inducing crosslinking in casein and soy proteins by the aggregation of polypeptide chains, resulting in a film with enhanced water barrier and mechanical properties. The exposure of proteins to ionizing radiation can cause conformational changes, oxidations of amino acids, ruptures of covalent bonds (biopolymer degradation), formation of protein free radicals, recombination or polymerization reactions. This process can thus improve the structural and mechanical properties of protein films. In the same way, Lee et al. (2005) reported that water vapor permeability of gluten films was reduced by 29% after irradiation. Jo et al. (2005) found that gamma irradiation is also effective to crosslink proteins and to improve both gas barrier and mechanical properties. Similar result was shown by Inamura et al. (2013) in the case of composite gelatin-nut shell fiber after a 40 kGy irradiation dose. They found that thermal stability was improved after electron beam irradiation by the formation of a denser network via arrangement of chains. From Bhat and Karim (2009), the crosslinking appears to dominate over the effect of chain degradation as manifested by the increase in gel strength after UV irradiated fish gelatin. More generally, most food proteins undergo irradiation-induced cross-linking, which can be used to subsequently improve the film functional properties.

Among the previously described irradiation processes, very few studies are related to the effect of electron beam technology on functional properties of packaging film derived from natural

biosourced polymers. The present work focuses on the effect of electron beam irradiation on fish gelatin films. The main objectives are to assess the effects of the irradiation doses on moisture transfer and water wettability in relation with the structural and thermal properties of fish gelatin film.

IV.1.2. Materials and methods

See Chapter II

IV.1.3. Results and discussion

IV.1.3.1. Free radical generation induced by irradiation of gelatin films

The ESR spectra of control (non-irradiated films) and irradiated gelatin films, measured after 60 days of irradiation, are given in **Figure IV.1.1**. Gelatin film presents a main peak at 3497G. Results showed that the peak observed around 3500G one hour after irradiation decays very fastly in the 24h after irradiation process and then remains unchanged up to at least 3 months. Based in this information we expected the presence of some peak in gelatin films after irradiation (60kGy). This peak shows a marked increase only for the irradiated films at the highest irradiation dose (60kGy).

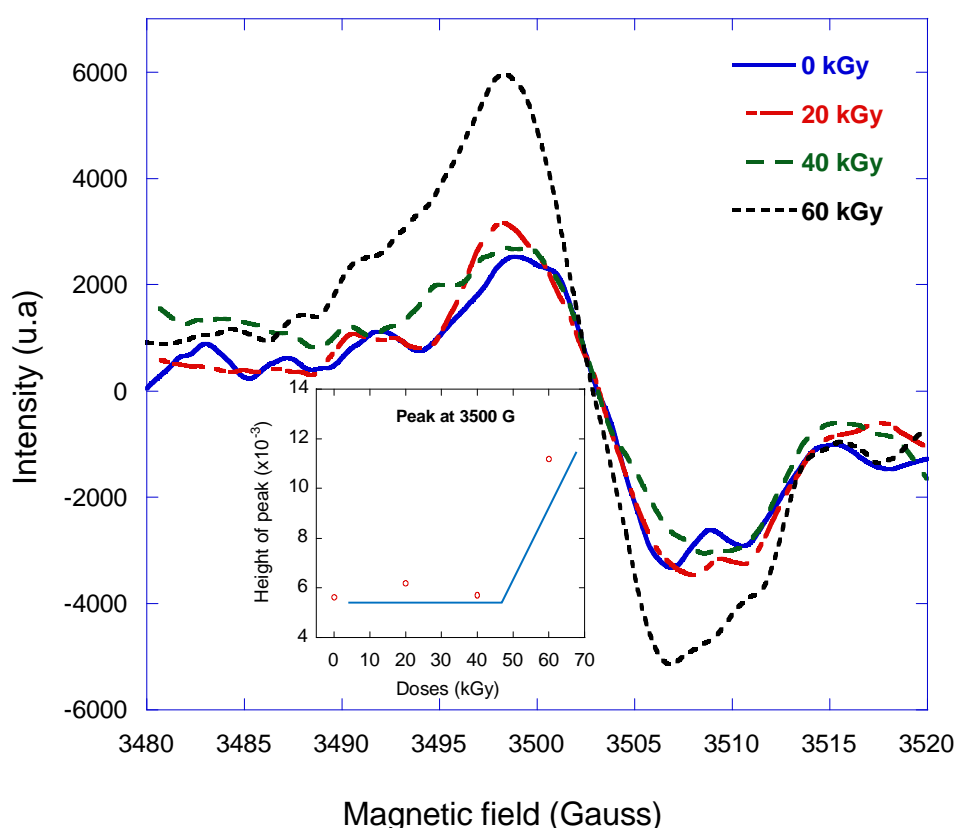


Figure IV.1.1. Typical ESR spectra of fish gelatin films after different irradiation doses at the dose rate 300Gy/sec. Measurement was taken at 25°C and 50% RH, 60 days after irradiation.

Electrons generated by accelerator induce free radicals in the form of unpaired electrons in polymer chains. It may be assumed that the generated free radicals in the adjacent chains are close enough to each other and then could react. However, the knowledge of radiation-induced changes in gelatin film is not satisfactory. Only a few papers reported data on the underlying mechanisms. Proteins are known to undergo a conformational change with radiation treatment, such as oxidation of some amino acyl residues (tyrosin, lysin and cystein), rupture of covalent bonds, recombination and polymerization reactions via protein free radicals formation. Thus molecular degradation or cross

linking can occur in solid state. Rhim et al. (1999a) found that UV radiation is absorbed by double bonds and aromatic rings, which causes free radical formation in amino acyls (such as tyrosine and phenylalanine). These instable products can react together and lead to the formation of intermolecular covalent bonds, which can further enhance physical properties of protein films. From the study of Bhat and Karim (2009), the increase in gel strength after the UV irradiation of fish gelatin gels could be attributed to the crosslinking reaction occurring between the polymers chains. Ultraviolet irradiation produces radicals in the form of unpaired electrons located predominately in the nuclei of the aromatic amino-acyl residues such as tyrosine and phenylalanine and then favoured crosslinking (Vaz et al., 2003). Crosslinks are induced by bonding between these radicals (Forbes and Sullivan, 1966). In the present case, it is noteworthy that free radical were formed after electron beam treatment and remained in the films even 60 days after irradiation. The following mechanism of gelatin crosslinking after generation of water free radicals upon radiation exposure can be hypothesized:

- First, water radiolysis and formation of hydroxyl and hydrogen radicals are supposed.
- These generated free radicals are highly reactive. They could recombine with themselves or with gelatin backbone and lead to an instable oxidative form.
- Finally, polymerization reaction can occur between two chains of gelatin (from two unpaired electrons in the carbon atoms in two opposite chains) to form a more stable network.

The basis of this hypothesized tends to explain the enhancement of tensile strength (TS), the decrease of the elongation at break, the rise of the glass transition temperature (Tg) and the improvement of the thermal stability as displayed in the next parts of the results and discussion section.

IV.1.3.2. Effect on the film structural properties

The surface pictures (**Figure IV.1.2**) obtained from environmental scanning electron microscopy (ESEM) revealed a smooth surface for both films. However, the gelatin film cross-section, shows the presence of cracks randomly distributed along the film thickness, which seems to be less numerous after irradiation treatment. This behaviour could result of the presence of new bonds which stabilize the protein network. Lacroix et al. (2002) used size exclusion chromatography to prove the increase in molecular weight and enhancement of protein density network after gamma irradiation.

Looking at the X-ray diffractograms before and after EB irradiation, as displayed in **Figure IV.1.3**, we can see that the film essentially remained amorphous after irradiation treatment. Initial gelatin film display a low crystallinity with three diffraction peaks around $2\theta = 8.1^\circ$, attributed to the triple-helical crystalline structure of collagen denatured in gelatin during drying, $2\theta = 20.5^\circ$ and $2\theta = 31.5^\circ$.

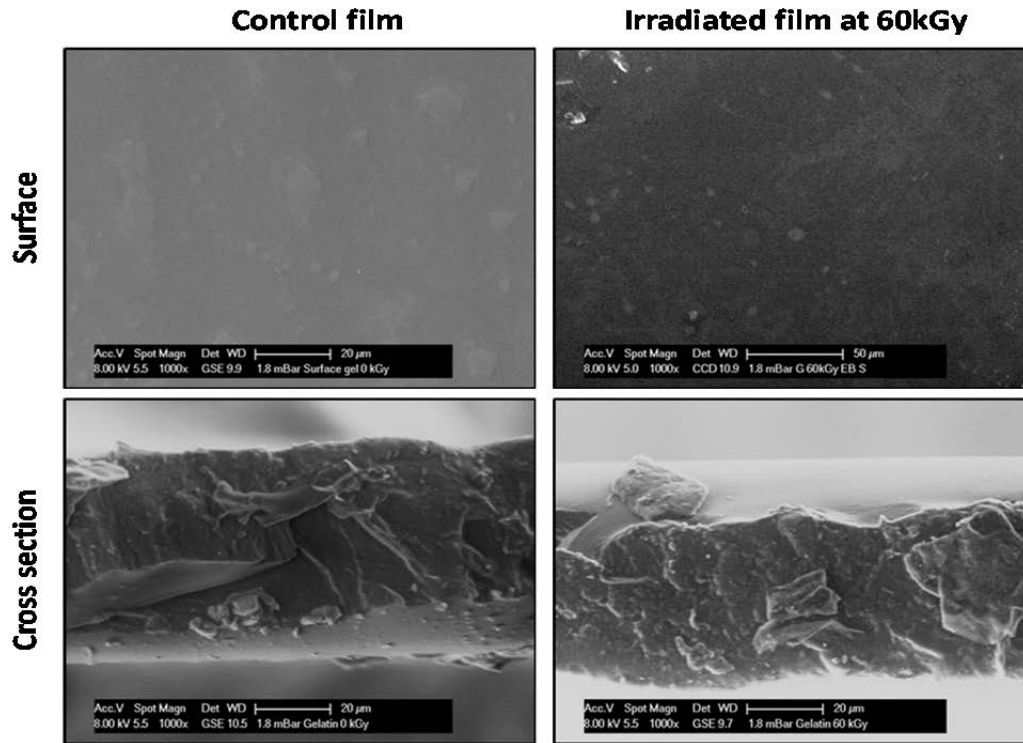


Figure IV.1.2. Micrographs of surface and cross sections of control and irradiated fish gelatin films (magnification $\times 1000$).

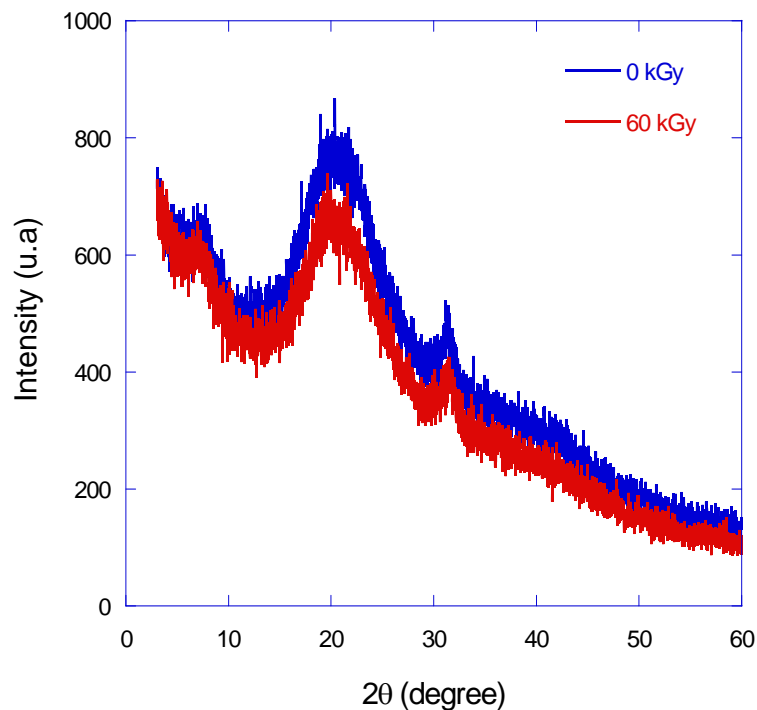


Figure IV.1.3. X-Ray diffractograms of control and irradiated (60kGy) fish gelatin films equilibrated at 25°C and 50% RH.

The peak around $2\theta = 20.5^\circ$ can be attributed to the amorphous halo of proteins (Bigi et al, 2000; Grevellec et al, 2001). Inamura et al. (2013) in the case of biocomposite prepared with gelatin and Brazil nut wastes as fiber source showed that irradiated composite present very small peak intensity in the 2θ around 23° , in a dispersed scattering characteristic of amorphous phase. As it can be seen, the position and intensity of those diffraction peaks do not change after irradiation. Therefore, no modification of the crystallinity of the film was observed after irradiation. These findings suggest that if structure was changed due to either crosslinking or degradation, it occurred in the only amorphous phase of the gelatin matrix. On the contrary, Le Tien et al. (2000) showed that X-ray peak became sharper with the increase of the irradiation dose of whey protein films. They suggest that cross-linking by gamma irradiation seems to modify the conformation of proteins, which became more ordered and more stable. Similarly, Lacroix et al. (2002) observed that increasing gamma-irradiation dose from 48 to 64 kGy induced a change in the X-ray diffraction profiles of whey casein and soy proteins, with a sharpening of diffraction peaks, which also correlates with the degree of the cross-linking. Gamma irradiation provoked chains cross-linking and a new structure, more ordered and more stable. However, these authors irradiated the film-forming solutions prior film making (casting and drying) and not the already formed film as we did. In the other way round, a structural change from semi crystalline to amorphous was observed by Saion and Teridi.(2006) in the case of solid polyvinyl acetate after irradiation.

IV.1.3.3. Effect on thermal properties

DSC analysis was used to evidence the effect of the electron beam irradiation on the glass transition temperature of the amorphous phase of gelatin-based films. From DSC thermograms, the glass transition temperature (T_g), its onset and offset temperatures for non-irradiated and irradiated (at 60kGy) gelatin films were determined (**Table IV.1.1**). The experimental T_g values of control film was 61°C . Perkasa et al. (2013) was founded the same values of T_g in the case of barramundi fish species gelatin films (59.23°C). After irradiation, T_g significantly increased from 61°C to 79°C . This can be due to new bonds in the gelatin network which limit the string mobility. Usually when the cross-linking occurs in polymers, the T_g increases because of the reduced mobility of chain segments. Crosslinking also changes the local molecular packing and leads to a decrease in free volume. Perkasa et al. (2013) founded also an increase of T_g of fish gelatin film after 50kGy irradiation dose and they explain this increase by increases of crosslinking density. Peña et al. (2010) found similar results in the case of gelatin film modified by tannic acid. They showed new hydrogen interactions between hydroxyl groups of the tannin molecule and polar groups of gelatin (amide carbonyl of the peptide backbone) and hydrophobic interactions that could impede the mobility of gelatin. Hydrogen bonding and/or hydrophobic interactions between gelatin and tannin molecules can also induce changes in the formation of triple helices in gelatin. Contrarily, Piotrowska et al.(2008) using gelatin and casein based film crosslinked with 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) demonstrated that the use of this cross-linking agent decrease the T_g of the final network because of partial miscibility (absence of strong interactions between the two proteins and EDC) leading to an increase in the mobility of the polymeric chains. Sabato et al. (2007) evaluated the mechanical and thermal properties of films made with Tilapia fish proteins by applying electron-beam radiations (doses from 25 to 200 kGy). They reported a slight improvement of the tensile strength at the

Résultats et discussion. Chapitre IV

radiation dose of 100 kGy, most probably attributed to the radiation-induced cross-linking of proteins but without confirmation by the thermal analysis by DSC.

The TGA thermograms, given in **Figure IV.1.4**, display the thermal stability/degradation behavior of control and irradiated gelatin films. The corresponding degradation temperatures (T_d , T_{max} and T_f) and weight loss (Δw) are given in **Table IV.1.1**. Decomposition profiles of control (non-irradiated) and irradiated films (60kGy) are characterized by two main transformation steps. The first stage is a 6 to 11 % weight loss is observed at a temperature (T_{d1}) of 52°C to 220°C. This is related to the loss of water sorbed in the film. Present results are in agreement with Inamura et al. (2013), who observed similar behavior from biocomposite prepared with gelatin and nut wastes as fiber source (46-140°C). Barreto et al. (2003) and Pena et al. (2010) also showed similar results in the case of gelatin film, for this first stage, up to 200°C and from 25 to 150°C, respectively. The second stage, which is attributed to the gelatin degradation It starts from about 250°C up to 420°C, and corresponds to the greatest weight loss, between 65 and 67%, depending on the radiation dose.

Table IV.1.1. Glass transition temperature (T_g) from DSC analysis and weight loss (Δw) according to degradation temperature from TGA analysis (T_d : Onset degradation temperature; T_{max} : Temperature of maximum degradation rate and T_f : End degradation temperature) of control and irradiated (60kGy) fish gelatin films.

Technique/properties	Parameters	0 kGy dose	60 kGy dose	
DSC	Onset T (°C)	58.4	77.0	
	Offset T (°C)	63.8	84.1	
	T_g (°C)	61.1	79.5	
TGA		Δw (%)	11	6
	1st transformation region	T_d (°C)	52	64
		T_{max} (°C)	131	142
		T_f (°C)	200	220
		Δw (%)	67	65
	2 nd transformation region	T_d (°C)	250	250
		T_{max} (°C)	326	335
		T_f (°C)	425	440
		Residue (%)	18	20

Values are mean \pm standard deviation. Means with the same letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$.

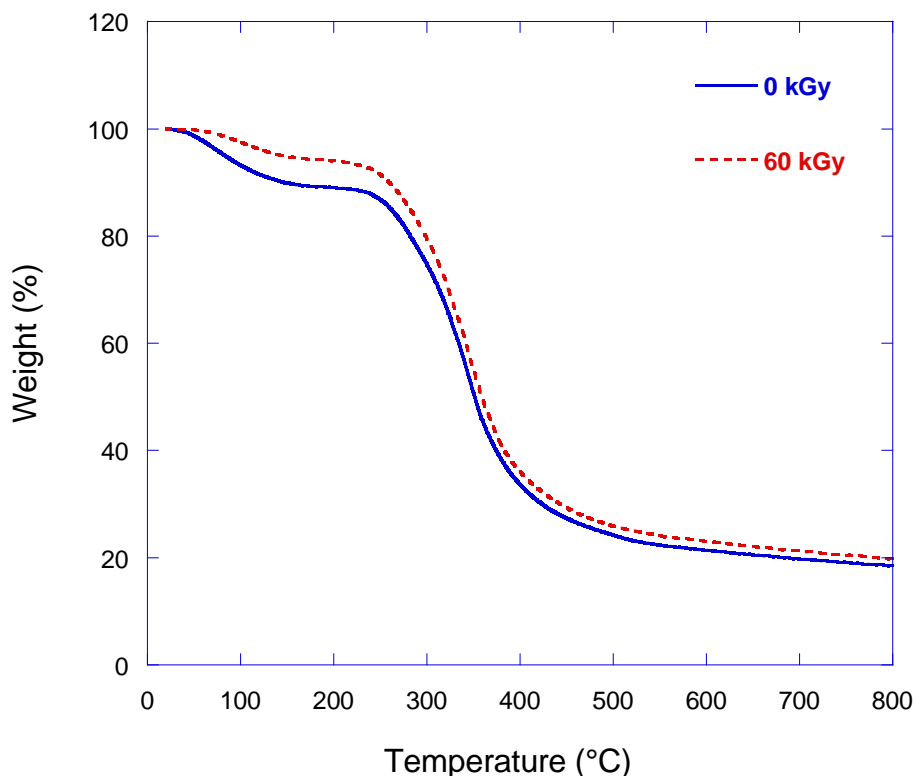


Figure IV.1.4. TGA thermograms of control and irradiated (60kGy) fish gelatin film equilibrated at 25°C and 50% RH.

Barreto et al. (2003) found that the degradation of milk protein and gelatin film begins at temperatures between 296 and 329°C, and is associated with the protein chain breakage (helical structure) and peptide bonds rupture. They suggest that the different primary and secondary structures of the proteins do not significantly affect the thermal degradation process in nitrogen atmosphere. Pena et al. (2010) found very similar results as ours for gelatin film with a 250-400°C temperature range and a 66% same weight loss. The residual mass (18-20 wt %) (**Table IV.1.1**) is also in agreement with previous works (Barreto et al., 2003). More interestingly is the fact that the control film displays lower thermal degradation temperatures as well for T_{max1} as for T_{max2} and a higher weight loss for $\Delta w1$ and $\Delta w2$, as compared to the irradiated film (**Table IV.1.1**). This result suggests a higher thermal stability provided by the irradiation process. This may be due to a higher amount of bonding between protein chains, which yields to a stiffer film network after irradiation. Amino acyl radicals generated within a peptide chain by hydrogen and hydroxyl abstraction during irradiation may have cross-linked with an amino-acyl radical from another peptide chain. Therefore, films were stiffer after irradiation and thermal stability was improved. Similar result was found by Inamura et al. (2013) in the case of composite gelatin-nut shell fiber after a 40 kGy irradiation using electron beam at a dose rate equal to 2.8 kGy/s. Pena et al. (2010) also showed an increase of the degradation temperature and a decrease of the weight loss of gelatin film cross-linked with tannin.

IV.1.3.4. Effect on water vapour permeability

The water vapour permeability (for a 30-84% RH gradient) of gelatin films before and after irradiation are given in **Figure IV.1.5** and **Table IV.1.2**. There is no significant change of the WVP after irradiation. As the RH differential is relatively high (30-84%), leading to a high water content of films, plasticization by both water and glycerol may hide the effect of irradiation. This finding is in accordance with that obtained by Olivas and Barbosa-Canovas. (2008) who found that the change in water vapour barrier properties occurs only at RH higher than 80% or for very small gradient at low RH. Ouattara et al. (2002) worked on the effect of gamma irradiation (in absence of oxygen) on the permeability of milk protein films and they also demonstrated that γ -irradiation produced significant reduction of WVP for a 100% RH gradient for all film formulations, based on casein or whey protein isolate. Rhim et al. (1999a) found a decrease in WVP of some protein films after UV-treatment. Lee et al. (2005) also showed that gamma-irradiation treatment decreased the WVP of gluten film by 29% at 50kGy. They assumed that the formation of a higher molecular weight protein network, aggregated from cleaved polypeptide chains by gamma-irradiation in controlled atmosphere, may contribute to the reduction in WVP.

IV.1.3.5. Effect on mechanical properties

Mechanical properties of irradiated and control films are shown in **Figure IV.1.5** and **Table IV.1.2**. Tensile strength (TS) and elongation at break (E) of control film are 60.5 ± 12.4 MPa and $4.7 \pm 2.6\%$, respectively. Chiou et al. (2008) displayed a slight decrease of the TS (50 ± 4 MPa) for the fish gelatin film but %E remained the same ($3.6 \pm 0.3\%$). Contrarily, Perkasa et al. (2013) founded both higher TS (72 MPa) and elongation at break (E=10%) values in the case of fish gelatin film. This difference can be related to the film preparation and plasticizer content.

Table IV.1.2. Water vapour permeability (WVP), mechanical (TS and E) and surface properties (γ_S , γ_S^d and γ_S^p) parameters of control and irradiated (60kGy) fish gelatin films.

Technique/properties	Parameters	0 kGy dose	60 kGy dose
Water Vapour Permeability (10^{-10}g/m.s.Pa)		1.41 \pm 0.07 ^a	1.60 \pm 0.15 ^b
Mechanical properties	TS (MPa)	60.53 \pm 12.36 ^a	78.23 \pm 6.77 ^b
	E (%)	4.76 \pm 2.61 ^a	3.70 \pm 0.50 ^a
Contact angle Θ (°) at t=20s		54.25 \pm 4.99 ^a	51.25 \pm 2.87 ^a
Surface properties	γ_S (mNm⁻¹)	38.79 \pm 2.81 ^a	44.57 \pm 1.43 ^b
	γ_S^d (mNm⁻¹)	20.98 \pm 2.36 ^a	18.66 \pm 0.34 ^a
	γ_S^p (mNm⁻¹)	17.8 \pm 5.17 ^a	26.33 \pm 1.68 ^b

Values are mean \pm standard deviation. Means with the same letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$.

After irradiation, E was not affected as usually observed for glassy materials. But, the increase in TS suggests that some cross-linking occurred as a result of electron beam treatment. The same tendency was observed by Perkasa et al. (2013) in the case of fish gelatin films irradiated at 50kGy in the solid state. On the other hand the cross-linkage sites can also act as rigid nodes, leading to restricted motions of the adjacent chain segments. Such results were previously reported for gluten films irradiated at 50kGy (Lee et al., 2005) and for whey, casein and soy proteins films irradiated under an inert gas, between 48 and 64kGy (Lacroix et al., 2002). Ressousany et al. (1998) also showed similar results in the case of caseinate protein film. They indicated that maximum puncture strength was obtained for all the films at an irradiation dose of 64 kGy, which an optimal irradiation dose is yielding to the highest number of crosslinks without inducing protein degradation.

A slight improvement in tensile strength of Tilapia fish proteins at electron beam dose of 100 kGy is attributed to the cross-linking of protein chains (Sabato et al., 2007). Furthermore, Micard et al. (2000) reported that gamma irradiated (in inert atmosphere) gluten films in the solid state displayed an increased tensile strength and a decreased elongation at 10 kGy, while higher radiation doses (20 and 40 kGy) reduced the observed effect due to the polymer degradation.

IV.1.3.6. Effect on the wettability and surface properties

The equilibrium state of the water drop on the film surface is taken as an indication of the wettability of the surface by water. However, for hydrophilic polymers or hygroscopic surfaces, equilibrium is never reached. So, contact angle was considered at time 20 s, which corresponds to a metastable equilibrium when fast (1-5 sec) absorption or wetting or swelling already happened. The water contact angle at 20 sec for fish gelatin films untreated or treated by 60kGy irradiation dose is displayed in **Figure IV.1.5** and in **Table IV.1.2**. Control film exhibits a hydrophilic surface with small contact angle ($54.3 \pm 4.9^\circ$). After irradiation, contact angle tends to slightly decrease down to $51.3 \pm 2.9^\circ$, but this is not significant. Irradiation can cause a charged hydrophilic amino acid group in film surface, hence reducing the observed contact angle. Irradiation can induce new bonds between polymer chains and then increases the number of polar groups on the film surface. Larré et al. (2000) observed a decrease in surface hydrophobicity with the transglutaminase treatment of films prepared from deamidated gluten. To better understand the effect of electron beam irradiation on film surface properties, the surface tension, with its polar and dispersive components, of untreated and treated films were determined (**Figure IV.1.5** and **Table IV.1.2**). The values of the dispersive and polar components of the surface tension of the control film are 21.0 ± 2.4 and 17.8 ± 5.2 mN/m, respectively (**Table IV.1.2**). These values are in the same range to that found by Sitthphong.(2010) for composite shellac/gelatin films, with a dispersive component of 24-28 mN/m and a polar component of 13-16 mN/m.

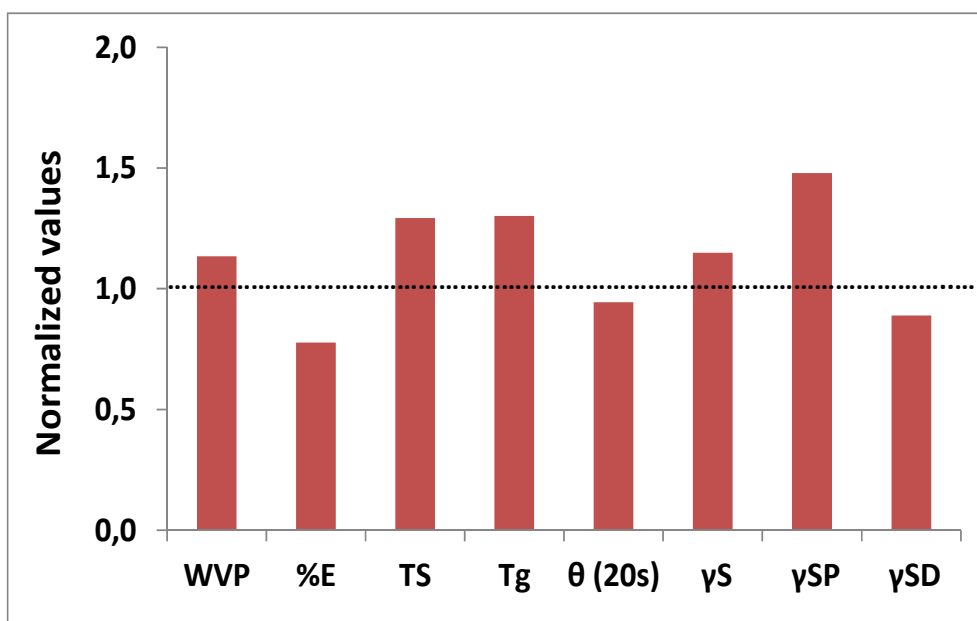


Figure IV.1.5. Change in water transfer, mechanical, thermal and surface properties of fish gelatin film upon irradiation. WVP measurements were performed at 25°C with a 30-85 % RH gradient.. Tensile strength (TS) and elongation at break (E %) were measured at 25°C and 50% RH. Glass transition temperature (Tg) from DSC was measured at room temperature (~20°C) and 50% RH. Water contact angle at 20s, and surface tension (γ_S) with dispersive (γ_S^d) and polar component (γ_S^p) were measured at room temperature (~20°C). All of these values correspond to the data obtained after irradiation treatment at 60 kGy and normalized to the initial values for the non-irradiated film.

After irradiation at 60kGy, the surface tension and its polar component significantly increase respectively from 38.8 ± 2.8 mN/m to 44.6 ± 1.4 mN/m and from 17.8 ± 5.2 mN/m to 26.3 ± 1.7 mN/m. However, the dispersive component does not significantly change. This increase in the polar component of gelatin film surface tension after irradiation is related to the decrease in surface hydrophobicity, as also previously characterized from the water contact angle measurements. This could be due to a reorganisation of hydrophilic groups at the film surface or to generation of charged groups at the film surface.

Conclusions

This work gives a better understanding of the effect of irradiation on functional properties of fish gelatin film. As observed from ESR, electron beam irradiation produced free radicals in the form of unpaired electrons. The ESR peak displays a marked increase only at the highest irradiation dose of 60kGy. It also indicates that the free radicals, formed after electron beam treatment, are still present in the films even 60 days after irradiation. Results from microstructural, mechanical, and thermal properties were in favour of the presence of new linkage after irradiation. The increase in the TS suggests that a cross-linking occurred as a result of electron beam. From X- ray diffraction, no modification of the crystallinity of the film was observed after irradiation. These findings suggest that if structure was changed after irradiation process, it only occurred in the amorphous phase of the gelatin matrix. Increase in Tg and enhancement of thermal degradation temperature from thermal analysis after irradiation suggest a higher amount of bonding between protein chains, yielding to a stiffer film network after irradiation, and therefore to a higher heat resistance of the resulting film. From the surface properties analysis, irradiation treatment results in a more hydrophilic character of the surface. After irradiation it is worthy to note a decrease in the water contact angle as well as an increase in the polar component of the surface tension. This increase in the surface hydrophilicity could explain the weaker increase in the WVP. So, irradiation may change orientation of polar groups of gelatin at the film surface and hide or crosslink the hydrophobic amino acids.

IV.2. Effet des irradiations sur les propriétés des films mélange chitosan-gélatine

Publication n° 3

Spectroscopic analyses of the influence of electron beam irradiation doses on mechanical, transport properties and microstructure of chitosan-fish gelatin blend films

Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Bornaz, S. & Debeaufort, F

J. Food Hydrocoll., 2015, 46: 37-51

Abstract

The objective of this work was to better display the effect of electron beam accelerator doses (0, 20, 40 and 60 kGy) on structural, mechanical and barrier properties of edible lightly plasticized chitosan-fish gelatin blend film. From Electron Spin Resonance (ESR), signal at 3500 G for blend film was identified as free radical formation during irradiation, which might introduce intermolecular cross-linking into the polymer matrix, thus affecting structural properties. Tensile Strength (TS) for gelatin film significantly increased with growing irradiation doses (improved by 30% for 60 kGy), but the TS of chitosan and blend films were not significantly affected. On the contrary, irradiation significantly reduced elongation at break (%E) for chitosan and blend film up to 50% whereas it twice increased the Young modulus. Moisture barrier efficiency (30-84% RH gradient) of blend films was slightly improved after irradiation. Oxygen permeability also decreased after 60 kGy irradiation treatment, for both chitosan and blend films. Surface hydrophobicity tended to decrease after irradiation. From Fourier Transform Infra-Red (FTIR) spectra, some noticeable differences were observed after irradiation, in the relative intensity and position of bands in the region between 3600 and 2800 cm^{-1} and between 1700 and 1500 cm^{-1} . UV-vis analysis shows that all films displayed an absorbance peak between 280 and 385 nm. These peaks are shifted toward higher wavelengths after irradiation. This clearly showed some modifications in the interactions (hydrogen bonds, amide groups) between polymer chains induced by the irradiation.

IV.2.1. Introduction

The waste generation increases with the population and the urbanization. Most of solid wastes (38%) come from plastic packaging (Duval, 2004). Consequently, the environmental impact of non-biodegradable plastic material wastes is a serious and major concern. Biodegradable films made from renewable biopolymers are a good alternative to produce environmental friendly packaging, thereby reducing plastic wastes (Hoque et al., 2010; Tharanathan, 2003). In the last decade, there has been a marked increase in interest in the use of biodegradable materials for packaging, agriculture, medicine and other areas. In particular, biodegradable polymeric films for packaging are of main attention (Akter et al., 2012) as they offer many advantages over synthetic or non-biodegradable polymers for film or coating applications on foodstuff. Films prepared with polysaccharides are reasonably resistant films but exhibit poor water vapor barrier due to their hydrophilic nature (Guilbert, 1986), whereas protein-based films show better mechanical and oxygen barrier properties (Khwaldia et al., 2004), but are less effective barrier to carbon dioxide (Nisperos-Carriedo, 1994). For that reason, film performances may be enhanced by producing composite and blend systems, where hydrocolloids (mixtures of proteins or/and polysaccharides) form a continuous and more consistent network (Porta et al., 2011). On the one hand, chitosan, a cationic polysaccharide obtained from the deacetylation of chitin, is currently used in a wide range of applications in the food, drug and pharmaceutical fields owing to its non-toxicity, biodegradability and biocompatibility (Fan et al., 2014). This polymer also displays an intrinsic antibacteriostatic and fungistatic activity (Dutta et al., 2009; Shahidi and Arachchi, 1999). The term "cationic" polymer rises from the positive charge in acidic to neutral solution due to the protonation amino group (pKa value of around 6.5). On the other hand, gelatin, obtained by partial degradation of collagen has been one of the first polymers used for edible films (Rivero et al., 2009). Gelatin is relatively low cost and displays noteworthy filmogenic properties (Eastoe and Leach, 1997, Arvanitoyannis et al., 1997, Cao et al., 2007a). Gelatin has an isoelectric point between pH 5 and pH 9, depending upon the source and method of production. Chitosan and gelatin blend films have been shown to be homogenous due to the good miscibility between both biopolymers by electrostatic and hydrogen bonding when chitosan is positively charged and gelatin is negatively charged under appropriate conditions of pH and good choice of the initial polymer characteristic (example: percentage of deacetylation for chitosan, pI for gelatin...). This is particularly important to improve the final network properties as compared to those obtained from the pure polymers (Pereda et al., 2011).

One of the promising ways to overcome the poor mechanical properties is to modify the physical properties of the films by inducing both intermolecular and intramolecular chemical bonding through chemical, enzymatic or physical means (Rhim et al., 1999a). These treatments can be applied to modify the polymer network through a cross-linking of the polymer chains to improve film functionality. Chemical treatments include the use of crosslinking agents such as glutaraldehyde in order to improve the functionalities of polysaccharide films (Mathew and Abraham, 2008). Cross-linking has also been used to improve the mechanical strength and barrier properties of protein films (Wihodo and Moraru, 2013). Chemical agents used for covalent cross-linking of proteins include among others glutaraldehyde, glycerinaldehyde, formaldehyde and glyoxal (Hernandez-Munoz, Villalobos, & Chiralt, 2004; Orliac, Rouilly, Silvestre, & Rigal, 2002). However, most of these agents can often induce toxicity or lead to other undesirable effects. As they lose their edibility, the addition of

such crosslinking agents in edible films packaging is obviously not recommended (Chambi and Grosso, 2006). Therefore, the possibility of using enzymatic methods to prepare polymeric films with good properties has been the object of recent extensive studies (Kumar et al., 2000). In previous works, it has been demonstrated that the enzymatic treatment with transglutaminase was efficient in lowering the WVP of gelatin films, but produced no change in the tensile strength of the modified film (Carvalho & Grosso, 2004). Porta et al. (2011) showed that chitosan and soy flour or whey proteins based films form a covalent crosslinking by using transglutaminase, with promising result to improve their mechanical resistance. Crosslinked proteins inside the network seem to reduce the intermolecular chain mobility of the proteins matrix. This consequently increases the tensile strength and reduces the extensibility of the modified films. But the high cost of some enzymes limits their use for further applications in the field of packaging (Cao et al., 2007b). Thus other types of treatments had to be found in order to replace chemical and enzymatic ways of crosslinking. Physical methods including thermal, UV, γ and electron beam irradiation have been found to be effective enough to crosslink proteins and polysaccharides and to improve both barrier and mechanical properties (Ryshkova et al., 2011; Wihodo and Moraru, 2013 and Jo et al., 2005). Irradiation can provide a cost-lowering and environment-friendly alternative to change the physical, chemical and/or biological characteristics of a product (De Kerf, 2001). Irradiation treatment also requires limited sample preparation. Moreover, it is fast and does not require catalysts or any increase in temperature (Woods & Pikaev, 1994). It is worthy to note that the irradiated foods are confirmed to be healthy, nutritionally adequate and safe for human consumption (FAO/IAEA/WHO, 1999). The use of electron beam or γ radiation offers many advantages over the use of UV radiation like continuous operation, minimum time requirement and less atmospheric pollution than chemical methods (Ghoshal et al., 2009). The irradiation of polymeric materials with ionizing radiation (essentially γ and electron beam) leads to the formation of very reactive intermediates, free radicals, ions and excited states. These intermediates can follow several quick reaction pathways that result in disproportionation, hydrogen abstraction, arrangements and/or the formation of new bonds through the polymers chains (Chmielewski et al., 2005) which modified the final structure of the network. Lacroix et al. (2002) and Lee et al. (2004) demonstrated that γ -irradiation was effective in inducing crosslinking in casein and soy proteins by the aggregation of polypeptide chains, resulting in a film with enhanced water barrier and mechanical properties. The exposure of proteins to ionizing radiation can cause conformational changes, oxidations of amino acids, ruptures of covalent bonds, formation of protein free radicals, recombination and polymerization reactions. This can be used to improve the structure and mechanical properties of protein films (Wihodo and Moraru, 2013). Ressouany et al. (1998) demonstrated that maximum puncture strength was obtained for caseinate films at an irradiation dose of 64 kGy. Furthermore, Micard et al. (2000) showed that γ -irradiated gluten films had increased tensile strength, and decreased elongation at 10 kGy, whereas higher radiation dose (20 and 40 kGy) reduced both the observed effect. Similarly, Lee et al.(2005) working on gluten films, reported that water vapor permeability was reduced by 29% after irradiation. They also, showed a 1.5 fold increase in tensile strength (at 50kGy) but the elongation at break was decreased. The irradiation of polysaccharides can also lead to cross-linked materials, some of which exhibiting antibacterial properties as like as of chitin and chitosan, which are used as biodegradable hydrogels with potential applications such as drug delivery systems or wound dressing (Pekel, et al., 2004 and Zhao et al., 2003).

Very little work exists on the film-forming ability of such combinations of gelatin and chitosan components and their modifications by electron beam irradiation. The present study aims to better understand the effect of electron beam irradiation doses by analyzing the microstructural, mechanical, transfer barrier and structural properties of chitosan-fish gelatin-based edible films.

IV.2.2. Materials and methods

See Chapter II

IV.2.3. Results and discussion

IV.2.3.1. Effect of electron beam irradiation doses on appearance and microstructure properties

The film transparency is a key issue for a good film acceptance by end-users, particularly if the film is to be used for coating a food surface or improving product appearance. In the present study, after drying at 25°C and 45% RH, the resulting homogeneous and flexible films were then irradiated at different doses by an electron beam accelerator. The colour attributes L, a, b and ΔE values for all films are given in **Table IV.2.1**. Lower L value (lightness) and higher b value (yellowness) were obtained for chitosan films, whereas CS-G blend film or to pure gelatin film were clearer. As previously reported for pure chitosan films, the b value is the parameter that describes the natural colour of chitosan (Kurek et al., 2012a). This chromatic coordinate mostly influences the total colour difference. According to Pereda et al. (2011) as well as to Pranoto et al. (2005), the yellowish coloration of chitosan is due to the presence of β -1-4 linked 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose repeated units. When comparing the color of initial film and that of irradiated films, it was found that the b values significantly increase with the irradiation doses: from 4.08 to 19.35 for chitosan and from -0.35 to 6.32 for chitosan-gelatin blend films. However, no significant change was noticed for gelatin films. ΔE also increases significantly after irradiation for all film compositions, but the irradiation dose had no effect. On the contrary, L and a values decrease significantly with increasing the irradiation dose for pure chitosan and blend chitosan-gelatin films. Jo et al. (2005) already observed noticeable change in the film transparency (decrease in L and a values, increase in b value) in the case of irradiated pectin and gelatin based films. Yi et al. (2006) reported that the microbial transglutaminase (MTGase) reaction changed the crystallinity and the molecular structure of the gelatin matrix, leading to a different response to light. Decrease in L values and increase in b and ΔE values for plasticized chitosan and chitosan-gelatin blend films may be due to oxidative reaction during the irradiation process. These films tend to have a dark and yellowish coloration. Rivero et al. (2010) showed that the addition of both tannic acid (as crosslinking agent) and plasticizer in chitosan film led to major color changes also due to oxidative reactions, yielding to brownish films.

Table IV.2.1. Color parameters of irradiated and non-irradiated (control) fish gelatin films (G), chitosan films (CS), and 50%CS-50%G blend films (equilibrated at 50% RH and room temperature).

Color parameters	Film\irradiation doses	0kGy	20kGy	40kGy	60kGy
L	CS	90.75±0.15 α,a	89.20±0.34 α,b	88.97±0.37 α,b	88±0.29 α,c
	CS-G (50%-50%: w/w)	91.33±0.30 β,a	90.51±0.18 β,b	90.36±0.04 β,b,c	90.05±0.21 β,c
	G	91.37±0.04 β,a	91.33±0.08 γ,a	91.15±0.01 γ,a	91.33±0.20 γ,a
a	CS	-0.15±0.30 α,a	-1.86±0.36 α,b	-2.13±0.50 α,b	-3.45±0.12 α,c
	CS-G (50%-50%: w/w)	1.07±0.13 β,a	0.41±0.18 β,b	-0.34±0.10 β,c	-1.08±0.28 β,d
	G	1.73±0.06 γ,a	1.9±0.10 γ,a,b	1.55±0.22 γ,c,a	1.84±0.18 γ,a,b,c
b	CS	4.08±0.91 α,a	11.97±1.61 α,b	12.96±2.29 α,b	19.35±1.26 α,c
	CS-G (50%-50%: w/w)	-0.35±0.06 β,a	2.12±0.81 β,b	4.5±0.31 β,c	6.32±1.38 β,d
	G	-2.26±0.22 γ,a	-2.4±0.49 γ,a	-1.5±0.84 γ,a	-2.55±0.57 γ,a
ΔE	CS	57.87±0.26 α,a	80.41±0.14 α,b	80.39±0.014 α,b	80.63±0.01 α,b
	CS-G (50%-50%: w/w)	57.59±0.09 α,β,a	81.08±0.18 β,b	80.94±0.08 β,b,c	80.84±0.09 α,c
	G	57.32±0.02 β,a	82±0.02 γ,b	81.79±0.1 γ,b	82.01±0.23 β,b

Values are mean \pm standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$ (effect of irradiation dose). Means with the same Greek letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$ (effect of film composition).

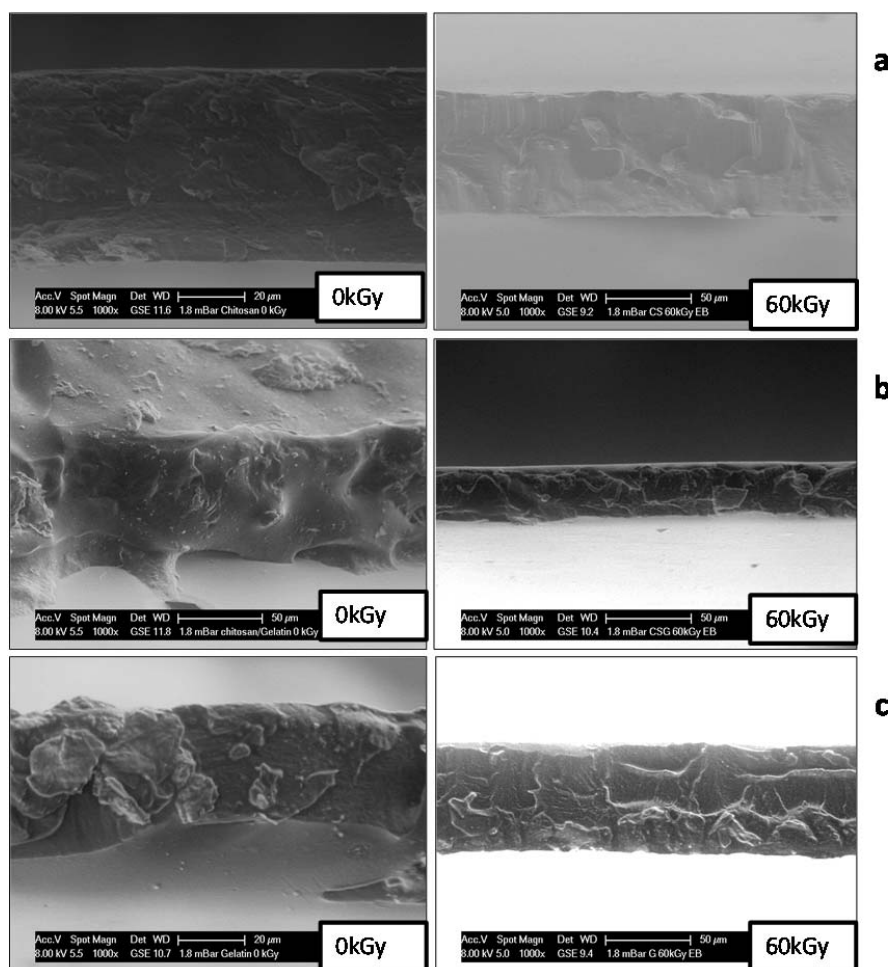


Figure IV.2.1. Micrographs of cross sections of a) chitosan films (CS) b) blend films (50%CS-50%G) and c) fish gelatin films (G) before and after irradiation at 60kGy, (magnification $\times 1000$).

The surface pictures obtained from environmental scanning electron microscopy (ESEM) revealed smooth structured films for both control and irradiated films (data not shown). ESEM micrographs of the cross-sections are displayed in **Figure IV.2.1**.

Chitosan and gelatin films showed very different structures that could be related to mechanical and barrier behaviours. Chitosan appears as a smooth film (**Figure IV.2.1a**), whereas gelatin film (**Figure IV.2.1c**) presents a fibrous structure which is characteristic of collagen fibrils. Chitosan-gelatin blend film (**Figure IV.2.1b**) appears to have a denser structure from the surface observation (more similar to the gelatin film), showing also a higher roughness in comparison to chitosan films. After irradiation at 60kGy, the morphologic characteristics were visually different. The micrograph of the chitosan film cross-section (**Figure IV.2.1a**) displays a denser structure. A greater smoothness was observed for the gelatin and chitosan-gelatin blend film cross-section after irradiation (**Figure IV.2.1b** and **Figure IV.2.1c**).

The observed differences could be associated with the different behavior in terms of intermolecular bond created during irradiation. We can then supposed that for the chitosan-gelatin blend films and

pure gelatin films, the polymeric matrix presented an orientation in the form of fibers. Thus, the presence of cracks formed discontinuous zones randomly distributed along the length of the network. After irradiation this discontinuous space decreased and alignment of the gelatin strand was observed. This behavior could result of the presence of new bonds which stabilized the protein network. Tuhin et al. (2012) illustrated that the irradiated chitosan-starch blend film showed uniform distribution of components in the matrix, which is an indicator of the structural integrity of the film network. Lacroix et al. (2002) used the size exclusion chromatography technique to prove the increase of inter-molecular bonds and enhancement of protein density network after gamma irradiation. Cao et al. (2007a) obtained similar results after crosslinking of gelatin by ferulic and tannin acid and they mentioned. Using ferulic acid as crosslinking agent, Mathew and Abraham.(2008) demonstrated that blend chitosan-starch films had certain discontinuous zones and small pores while the crosslinking blend films were more compact due to the networking introduced by ferulic acid treatment. Jo et al. (2005) indicated that the interlayer space of pectin/gelatin-based film decrease after gamma irradiation. Finally, Bigi et al. (1998) reported that the thickness and interlayer space in the gelatin film decreased dramatically when the cross-linking with glutaraldehyde.

IV.2.3.2. Effect of electron beam irradiation doses on mechanical properties

The mechanical properties of edible films are of great importance due to their influence on product performance. The primary output from a tensile test is the stress (σ) - strain (ϵ) curves. At low strain (lower than 8%), the stress rapidly increased with an increase in strain. At strain > 8%, the stress then slowly increased until failure occurred. These curves exhibited the typical behavior that could be related to T and T_g (corresponding respectively to the temperature of strength test analysis and the glass temperature) of films according to Ashby and Gibson (1988). At the same RH and water content conditions, Benbettaieb et al. (2014) showed that bovine gelatin film is typical of glassy materials (T < T_g) with tough and hard structure whereas chitosan films were softer, more flexible and presented a large extension to failure indicating a typical rubbery materials (T > T_g). Chitosan-gelatin blend films (50%:50%, w/w) displayed an intermediate behavior (T ~ 0.8T_g). The same behaviours have been observed for fish gelatin as for bovine gelatin, in the same RH conditions and for gelatin having similar bloom. **Figure IV.2.2** presents the mechanical parameters (tensile strength (TS), Young's Modulus (YM) and Elongation at break (E) of irradiated and control films. TS, YM and E of control chitosan films were 30.2 ± 2.4 MPa, 361 ± 69 MPa and 53.3 ± 2.1%, respectively. These values are higher than those reported by Pereda et al. (2012) (TS = 8.4 MPa and E = 19.6%), but TS is in the same range as those reported by Oguzlu and Tihminlioglu. (2010). In contrast to chitosan, gelatin film showed significantly higher TS (60.5 ± 12.4 MPa) and YM (1955 ± 163 MPa) values, but lower E (4.7 ± 2.6%). Thus, gelatin films were mechanically stronger but less deformable than chitosan films. Several authors showed that the mechanical properties of protein-based films are generally better than those of polysaccharide-based films (Gontard et al., 1996, Park, 1999; and Cuq et al., 1995b).

Résultats et discussion. Chapitre IV

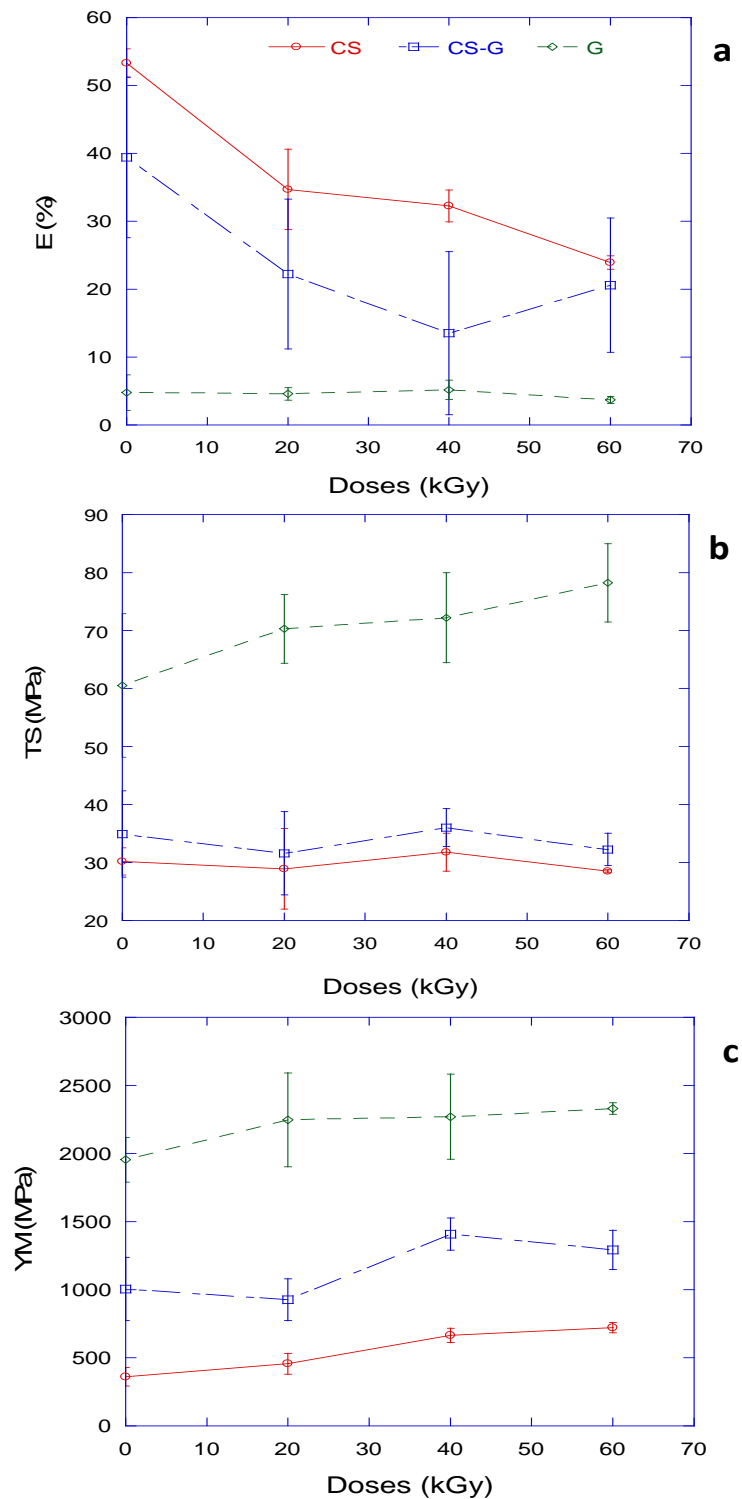


Figure IV.2.2. Tensile Strength (TS), Young's modulus (YM) and Elongation at break (E %) of irradiated gelatin films (G), chitosan films (CS) and blend CS-G films measured at 25°C and 50% RH.

Résultats et discussion. Chapitre IV

Chitosan-gelatin blend film showed higher TS (34.9 ± 7.4) and YM (1005 ± 232) but lower E (39.4 ± 11.8) than chitosan film. In a previous work, we already reported some enhancement in the strength when the proportion of gelatin increased in blend film (Benbettaieb et al., 2014). A more stable network due to the attractive interactions between CS and G in blend films could be formed. Cheng et al. (2003) also showed that the mechanical properties of chitosan were improved by blending it with gelatin. This may be due to additional interactions between gelatin and chitosan both by electrostatic and hydrogen bonding. Tensile strength, Young's modulus and elongation at break were also investigated for initial and irradiated films. When irradiation were applied, the TS of gelatin film significantly increased with increasing irradiation doses. It was improved by 30% after 60kGy irradiation when compared to the unirradiated film (**Figure IV.2.2c**). On the contrary, the TS of chitosan and chitosan-gelatin blend films were not significantly affected. YM of the chitosan films was doubled and that of blend films increased by 28% after 60kGy irradiation dose. Inversely, elongation at break E significantly decreased for chitosan and blend films when increasing irradiation doses (**Figure IV.2.2a**). E values were $53.3\pm 2.08\%$ for initial chitosan film and $23.93\pm 0.98\%$ after 60kGy treatment. For gelatin films, E was unaffected by irradiation, as generally observed for glassy materials.

Increasing of YM and TS and decreasing of E indicates either antiplasticization or new linking between polymers occurred after irradiation. The higher value of the TS and YM and the lower value of E for blend chitosan-gelatin film observed at 40kGy might be due to cross-linking reaction between two polymers after irradiation: theory of rubber-like elasticity, except for a degree of cross-linking, corresponding to a glass-like structure. This more compact structure was also confirmed from ESEM micrographs as previously mentioned.

The increase in the TS of gelatin films suggests that a cross-linking occurred as a result of irradiation treatment. Similar results were previously reported in gluten (Lee et al., 2005) and milk protein (Lacroix et al., 2002) films. Amino acid radicals formed within a peptide chain by hydrogen and hydroxyl abstraction after electron beam irradiation could cross-link with an amino acid radical in another peptide chain leading to cross-linking of proteins. Ressouany et al. (1998) also showed similar results for caseins. They indicated that maximum puncture strength was obtained for all the films at an irradiation dose of 64 kGy. They determined the optimal irradiation dose yielding to the highest number of crosslinks without inducing protein degradation. Le Tien et al. (2000) indicated the formation of new covalent intermolecular bridges in whey proteins after gamma irradiation. Furthermore, Micard et al. (2000) reported that gamma irradiated gluten films increased tensile strength and decreased elongation at 10 kGy, while higher irradiation doses (20 and 40 kGy) reduced the observed effect. Galus et al. (2013) studied the effect of oxidized potato starch on physicochemical properties of soy protein and indicated that the increase in tensile strength suggested the occurrence of cross-linking between soy proteins and oxidized starch. Moreover, the increase of the tensile strength was observed by Cao et al. (2007a) for gelatin-soy protein films and for soy protein films modified with the addition of ferulic acid (Ou et al, 2005) or transglutaminase (Tang et al., 2005). In pure gelatin films, Taylor et al. (2005) reported that the increasing amount of a cross-linking agent (transglutaminase) increased the tensile strength of the films when the proportion of transglutaminase becomes higher than that of protein. Contrarily to our study, Alam et al. (2008) showed that the strength of the chitosan films can be improved up to 5 kGy dose due

Résultats et discussion. Chapitre IV

to cross-linking then decreased because of degradation of chitosan chain. Similar behavior was observed by Tuhin et al. (2012) in blend chitosan-starch films after irradiation in the presence of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). With the increase in the irradiation dose, some radicals were generated in chitosan. These radicals tend to react with HEMA and lead to the formation of a compact copolymer between chitosan and starch-HEMA. As a result, the TS increased.

Sabato, Nakamurakare, and Sobral (2007) evaluated the mechanical and thermal properties of films made with Tilapia proteins by applying electron-beam irradiations doses from 25 to 200 kGy. They reported a slight improvement in tensile strength at irradiation dose of 100 kGy, attributed to the cross-linking of proteins. Kim et al. (2008) observed an increase in tensile strength by 27% for starch and locust bean gum blend films at an irradiation dose of 3 kGy. For pectin-based films, an increase in tensile strength of about 31% at a dose of 10 kGy was observed though it decreased at higher doses (Jo et al., 2005). Improved tensile strength due to irradiation in previous studies was attributed to irradiation induced cross-linking of polymers, while reduction in tensile strength at higher doses was due to degradation of polymers during irradiation (Byun et al., 2008). Although the results of many studies indicate some improvement in the mechanical properties of protein films, they are still not comparable to those of synthetic films (Wihodo and Moraru, 2013). Nevertheless it is a promising potential way in further improving the mechanical and barrier properties of protein films.

IV.2.3.3. Effect of electron beam irradiation doses on transfer properties

The Water Vapour Permeability (WVP) of non-irradiated and irradiated films for a 30-84% RH gradient are given in **Table IV.2.2**. The gelatin films showed slightly better water vapour barrier properties than chitosan films, 1.41×10^{-10} against $2.41 \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ respectively. Due to their hydrophilic nature, polysaccharides are highly sensitive to moisture and exhibit poor water vapour barrier properties, as noticed by many authors.

The results of the oxygen permeability (PO_2) tested at 53%RH are also given in **Table IV.2.2**. The chitosan-gelatin blend films tend to display better oxygen barrier properties compared to pure chitosan film. Blending gelatin and chitosan films seems to enhance water as well as oxygen barrier properties. Thus, in blend films, gelatin might crosslink with chitosan by intermolecular bonding (ie. electrostatic and hydrogen bonding). Furthermore, a decrease in the free volume or a densification of the network of the polymeric matrix might occur. As a result, the WVP and PO_2 of the blend films were weakly lowered. Improvement of barrier properties after irradiation is in agreement with the film microstructure as observed by ESEM and also with the enhancement of mechanical parameter as described previously.

Table IV.2.2. Water vapour permeability (WVP), oxygen permeability (PO₂), contact angle at 20s of non-irradiated and irradiated films. Water vapour permeability was measured at 25°C with a 30-85 % RH gradient. Oxygen permeability (PO₂) was measured at 25°C and 53% RH. Contact angle at 20s was measured at room temperature (~20°C).

	Film\irradiation doses	0kGy	20kGy	40kGy	60kGy
WVP (10⁻¹⁰ g.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹) ΔRH=30-84%	CS	2.41±0.31 a,α	2.37±0.19 a,α	2.55±0.17 a,α	2.56±0.06 a,α
	CS-G (50%-50%: w/w)	2.31±0.17 a,α	1.96±0.10 b,β	1.97±0.10 b,β	1.92±0.08 b,β
	G	1.41±0.07 a,β	1.6±0.12 b,γ	1.56±0.07 a,b,γ	1.6±0.15 b,γ
PO₂ (10⁻¹¹ g.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹) RH=53%	CS	2.45±0.36 a,α	n.m.	n.m.	1.61±0.53 a,α
	CS-G (50%-50%: w/w)	1.74±1.38 a,α	n.m.	n.m.	0.884±0.49 a,α
	G	n.d.	n.m.	n.m.	n.d.
Contact angle (°) at 20 s	CS	93.25±8.99 a,α	n.m.	n.m.	81.75±2.98 a,α
	CS-G (50%-50%: w/w)	114.75±8.99 a,β	n.m.	n.m.	85±8.44 b,α
	G	54.25±4.99 a,γ	n.m.	n.m.	51.25±2.87 a,β

Values are mean ± standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at p<0.05. Means with the same Greek letter in the same column are not significantly different at p<0.05.

n.d. not determined, n.m. not measured

Résultats et discussion. Chapitre IV

Benbettaieb et al. (2014) and Pereda et al. (2011) showed an improvement of the gas and water barrier properties of chitosan by gelatin addition. WVP (studied at 57% RH median) decrease by 16% for blend film after irradiation but remains unchanged for chitosan films. . Decrease in WVP might be explained by the effect of free radicals generated after irradiation which can cause a crosslinking of polymers. It can however not be enough for significantly reducing the molecular mobility of small molecules. Moreover, for WVP, the water acts as a plasticizer which probably hides the gain due to crosslinking as observed for oxygen permeability. The cross-linking restricts the movement of molecules by the formation of a tighter structure leading to a reduction of free spaces in the final network. This consequently enhances barrier properties by a diffusivity decrease of the gases when no plasticization by water occurs. Gennadios et al. (1998) and Rhim et al. (1999a) found a decrease in WVP of wheat gluten, corn zein, egg albumin, sodium caseinate and soy protein isolate (SPI) films after UV-treatment. Lee et al. (2005) showed that gamma-irradiation treatment decreased the WVP of gluten film by 29% at 50kGy. They assumed that the formation of higher molecular weight proteins, aggregated from cleaved polypeptide chains induced by gamma-irradiation, may be responsible for the reduction in WVP. A decrease in WVP was also noticed by Rivero et al. (2010) after addition of tannic acid to chitosan films. Orliac et al. (2002), working on thermo-molded films made from sunflower protein isolates and modified with formaldehyde, indicated that the addition of formaldehyde as cross-linker agent, considerably increased the water resistance of the protein films in terms of surface hydrophobicity and low levels of water uptake. However, Chambi and Grosso. (2006) observed a reverse tendency for gelatin and casein based films, cross-linked with transglutaminase. According to these authors, the WVP of the films increased as a function of the enzymatic treatment, when compared to the same mixture without enzymes. Yildirim and Hettiarachchy. (1998) obtained similar results for whey protein isolate based films treated with transglutaminase. Piotrowska et al. (2008) indicated that the water barrier properties of fish-skin gelatin were not improved by the cross-linking of the components with Transglutaminase. However, in our study, a weak increase on WVP was observed for gelatin film. It can be due to the high RH gradient (30-84%) used that induces a plasticization of film by water and can hides the effect of irradiation. Olivas and Barbosa-Canovas. (2008) found that the change in water vapor barrier properties occurs at RH higher than 80%. Ouattara et al. (2002) worked on the effect of gamma irradiation on permeability of milk protein films and they demonstrated that γ -irradiation produced significant reduction of WVP at 100% RH gradient for all film formulations. However, at 56% RH gradient, only a significant effect was observed for the pure casein films. Recently, a study was undertaken to produce caseinate based biodegradable films with improved water barrier using electron-beam irradiation doses from 20 to 60 kGy (Audic & Chaufer, 2010). These authors also compared the effectiveness of electron-beam irradiation over formaldehyde treatments on the film production.

In our study, PO_2 only tends to decrease after 60kGy irradiation treatment for chitosan and chitosan-gelatin blend film (even if it is not significant). Earlier studies showed that the incorporation of ferulic acid reduces the oxygen permeability of soy protein isolate films (Kwok & Ou, 2002). In contrast, other studies reported an increase in PO_2 (Yi et al., 2006) and suggested that new intra and intermolecular covalent bonds induced by microbial transglutaminase (MTGase) hindered the formation of the collagen helix structure (Babin & Dickinson, 2001). This resulted in an increase in the free volume of polymer

matrix, leading to an increase in the oxygen permeability of the films. However, Carvalho and Grosso. (2004) found that addition of transglutaminase, formaldehyde, and glyoxal cross-linkers to bovine gelatin films had no effect on oxygen permeability.

IV.2.3.4. Effect of irradiation on the surface properties of films

The contact angle (θ) value obtained after deposition of a water drop indicates the surface hydrophobicity of the film. In theory, the contact angle can range from 0° up to 180° , that is to say from the complete spreading of the liquid onto the solid surface up to the unrealistic limit of absolutely no wetting. Practically, a contact angle higher than 90° (or small $\cos \theta$) represents a hydrophobic surface, whereas a contact angle lower than 60° (or $\cos \theta > 0.5$) implies a hydrophilic surface (Karbowski et al., 2006). The equilibrium state of the water drop on the film surface has to be considered. However, for hydrophilic polymers or hygroscopic surfaces, equilibrium cannot be reached. So, contact angle was considered in the present study at a time of 20 s, which corresponds to a metastable equilibrium when fast (1-5 sec) absorption or wetting or swelling already happened. These values measured for pure and blend chitosan-gelatin films untreated or treated by 60kGy irradiation dose are reported in **Table IV.2.2**. Chitosan, chitosan-gelatin blend and gelatin films displays contact angles of 93.2° , 114.7° and 54.2° , respectively, with significant differences ($p < 0.05$). It appears that pure gelatin films exhibit amore hydrophilic surface. The contact angle of water significantly increased from 54° (gelatin film) to about 114° (blend films) after chitosan addition. This might be due to the possibility of linkages between hydroxyl groups of chitosan and amine group of gelatin. Ma et al. (2013) and Fan et al.(2014) also showed similar results after addition of chitosan to kidney bean protein, and they observed a contact angle increase with bipolar liquids (e.g., water), related to decrease in density of polar groups on the film surface due to the addition of chitosan. Some other works also support that the addition of chitosan results in increasing the water contact angle for chitosan/protein composite films, such as chitosan/whey protein composite films or chitosan/soy protein blended membranes (Ferreira et al., 2009; Silva et al., 2007).

Irradiation at 60 kGy decrease the contact angle value for all films but this change was significant only for the blend films (**Table IV.2.2**). Larré et al. (2000) observed a decrease in surface hydrophobicity, evaluated from the contact angle, with the transglutaminase treatment of films prepared from deamidated gluten. These authors suggested that the linkages between the deamidated gluten and the diamines could have affected the orientation of the proteins in the film and increased the proportion of hydrophilic protein segments on the film surface. Kim et al. (2008) concluded that irradiation treatment of biological materials may result in more compact and denser structure by a crosslinking reaction and could help natural polymers to overcome and to hold their hydrophilic character. To better understand the effect of electron beam irradiation doses on functional film properties, the critical surface tension was also determined. The results are given in **Figure IV.2.3**. A significantly higher critical surface tension was measured for blend and pure gelatin film than for pure chitosan film. This is in agreement with the results obtained by Kurek et al. (2013) for chitosan films prepared with hydroalcoholic acid solution

Résultats et discussion. Chapitre IV

(31.90 mN/m). It is noteworthy to emphasize the differences between the values obtained between gelatin and chitosan film. Such differences are presumably due to the differences in nature and structure between the two polymers: gelatin film is a glassy material which presents a fibrous structure with roughness surface whereas chitosan film is a rubbery material with a smoothness surface.

After irradiation at 60kGy, the critical surface tension of gelatin film significantly decreases from 35.8mN/m to 28.0mN/m, but no significant change was noticeable for chitosan and blend film. Decrease in the critical surface tension of gelatin after irradiation can be explained by a decrease in surface hydrophobicity, evaluated also from the contact angle measurement. This could be due to the reorganisation of hydrophilic groups on the film surface or by the creation of new bonds. This finding was previously observed by Larré et al. (2000) in the case of gluten film crosslinked by transglutaminase, which affects the orientation of protein and increases the hydrophilic protein segments on the surface of the film.

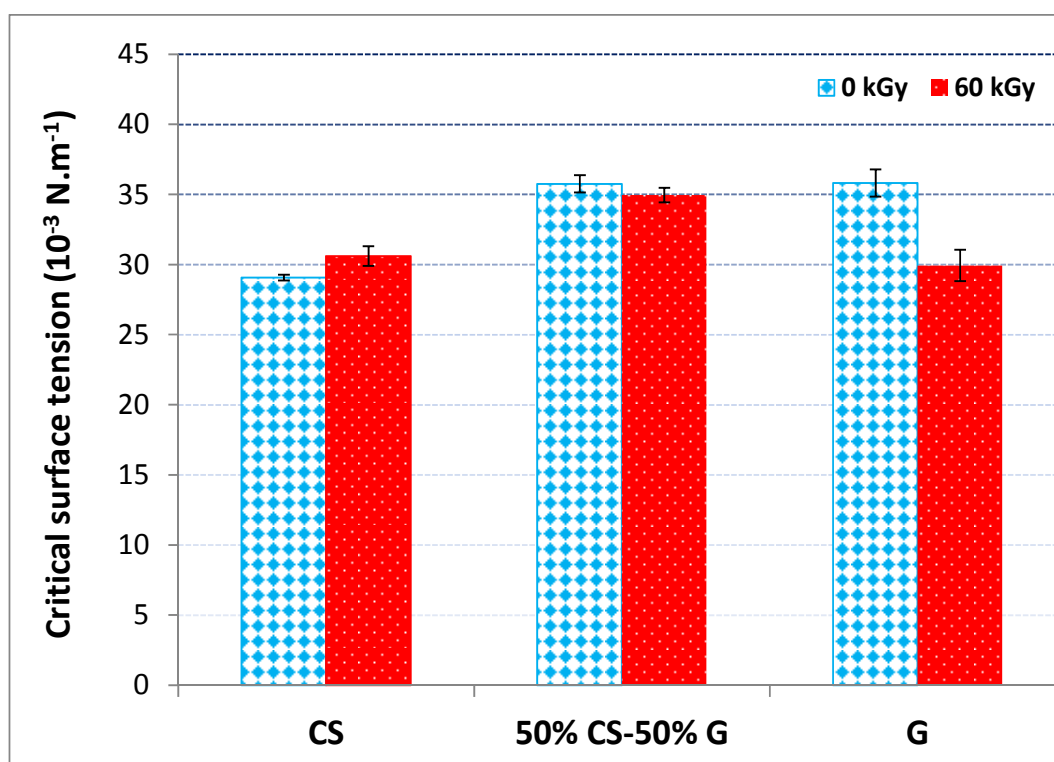


Figure IV.2.3. Critical surface tension of a) chitosan films (CS), b) blend films (50%CS-50%G) and c) fish gelatin films (G) irradiated at 60kGy with the dose rate of 300Gy/sec (25°C, 50%RH).

IV.2.3.5. Effect of electron beam irradiation doses on molecular properties: a spectroscopic investigation

IV.2.3.5.1. FTIR spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used in our study to assess interactions between chitosan and fish-gelatin films before and after electron beam irradiation. FTIR spectra of irradiated and control G, CS and CS-G blend films are displayed in **Figure IV.2.4 (a, b)**, and band assignment from these spectra are listed in **Table IV.2.3**. The position of relevant peaks in the spectrum of CS films was similar to those previously described by other authors (Abugoch et al., 2011; Kurek et al., 2012c and Benbettaieb et al., 2014). The characteristic bands appeared at 1638 cm^{-1} (amide I band of the acetyl group), 1555 cm^{-1} (NH_3^+ band, partially super-imposed with amide II band) and the broad absorption band at $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ due N-H and O-H stretching vibrations. Peaks between 900 and 1150 cm^{-1} were assigned to the C2 carbon of pyranose ring and amino group, respectively (Lima et al., 2006 and Benbettaieb et al., 2014). The spectrum of gelatin film displayed relevant peaks ascribed to amide A νNH stretching and νOH stretching (around 3300 cm^{-1}) coupled with CO at 1653 cm^{-1} (amide I), bending vibration of N-H groups and stretching vibrations of C-N groups at 1546 cm^{-1} (amide II) and the in-plane vibrations of C-N and N-H groups of bound amide or vibrations of CH_2 groups of glycine at 1240 cm^{-1} corresponding to the amide III (Nur Hanani et al., 2013, Tongnuanchan et al., 2012). The same absorption peaks were identified by Liu et al. (2012) for gelatin films based on tilapia fish skin and by Pranoto et al. (2007) for fish gelatin films, where amide-I, amide-II and amide-III peaks were found at the wavenumbers of 1656 , 1550 and 1240 cm^{-1} , respectively.

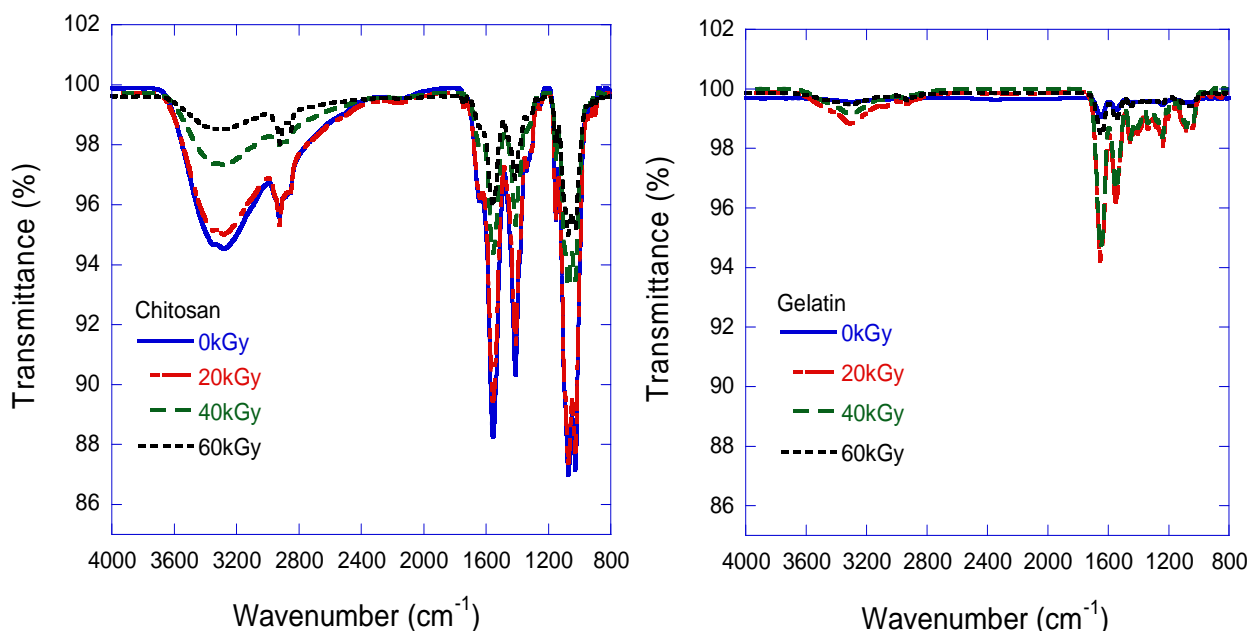


Figure IV.2.4(a). FTIR spectra of chitosan and fish gelatin films irradiated at different doses and equilibrated at 50%RH and 25°C.

Résultats et discussion. Chapitre IV

The spectra of the blend films exhibited the characteristic peaks of both G and CS. However, compared chitosan films, some shifts in the peak position of Amide A (ν_{OH} , ν_{NH}), Amide I (ν_{CO}) (to higher wavelength) and Amide II (δ_{NH}) groups (to lower wavelength) were observed. These modifications could result from molecular interactions between the two polymers. Amino and carbonyl moieties interact mainly through electrostatic interactions to form a poly-electrolyte-complex at appropriate pH.

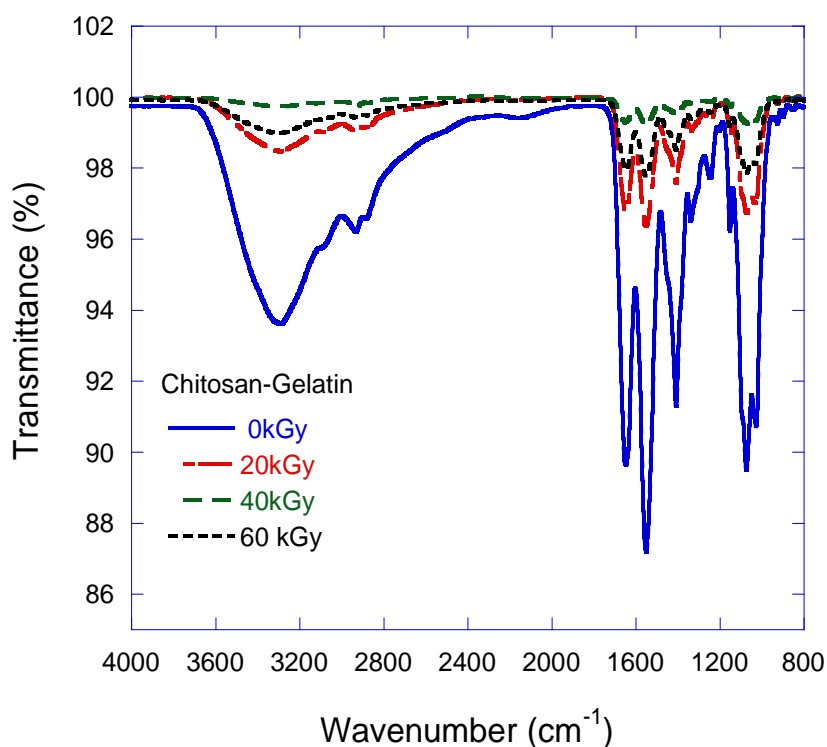


Figure IV.2.4(b). FTIR spectra blend films (50%CS-50%G)(w/w) irradiated at different doses and equilibrated at 50%RH and 25°C.

After irradiation doses from 20 to 60kGy, some noticeable differences were observed in the relative intensity and position of bands in the region between 3600 and 2800 cm⁻¹ (assigned to the ν_{OH} , ν_{NH} and ν_{CH} group) and between 1700 and 1500cm⁻¹ (assigned to the ν_{CO} and δ_{NH} group) for all formulation (**Table IV.2.3**). This clearly shows some modifications in the interactions between polymer chains induced by irradiation.

Table IV.2.3. Mean specific shifted bands from FTIR spectra for films before and after irradiation.

Frequency (cm ⁻¹)	groups	Film\doses	0kGy	20kGy	40kGy	60kGy
3100-3600	ν _{NH} ν _{OH} Amide A and free water	CS	3285	3282	3275	3285
		CS-G (50%-50%: w/w)	3299	3292/3287	3286	3285
		G	3303	3310	3312	3318
2850-2960	ν _{CH} , Amide B	CS	2926	2923	2924	2920
		CS-G (50%-50%: w/w)	2933	2927/2923	2924	2925
		G	n.i.	n.i.	2925	2923
1630-1660	ν _{CO} Amide I	CS	1638	1635	1636	n.i.
		CS-G (50%-50%: w/w)	1648	1654	1654	1653
		G	1653	1654/1648	1649	1648
1540-1570	δ _{NH} Amide II	CS	1555	1555	1555	1560
		CS-G (50%-50%: w/w)	1551	1559	1555	1551
		G	1546	1550	1550	1545

n.i. not identified

Résultats et discussion. Chapitre IV

In the first region, between 3600 and 2800 cm^{-1} , the absorption bands at 3299 cm^{-1} of CS-G films decreased in intensity and moved by 14 cm^{-1} to lower wavenumbers, whereas the absorption bands of fish gelatin film at 3303 cm^{-1} decreased in intensity and shifted to higher wavenumbers by 15 cm^{-1} after 60kGy irradiation dose for both films. These effects are more pronounced as the irradiation dose increases. Chitosan film exhibited a decrease in intensity but no shift was observed in the band of 3285 cm^{-1} . Similar results were observed by Jiang et al. (2006) who reported that some absorptive peaks of gelatin membrane are shifted towards higher wavenumbers, such as 3300 and 1544 cm^{-1} , whereas corresponding peaks of non-irradiated sample is at 3287 and 1539 cm^{-1} . The analysis of FTIR spectra indicates the presence of chemical bonding changes in irradiated gelatin. This is in favour of crosslinking between protein chains that occurred consecutively to irradiation. In the same way and according to Muyonga et al. (2004), the amide I absorption band between 1600 and 1700 cm^{-1} is a useful peak for the IR analysis of the secondary structure of protein like gelatin. Slight shifts in some of the bands were also observed from the spectra before and after UV irradiation treatment (Bhat and Karim, 2009). They suggested a possible crosslinking occurring in gelatin granules, after time exposure (30 and 60 min) to UV irradiation. In the second region from 1700 to 1500 cm^{-1} , a shift occurs for bands from 1648 to 1653 cm^{-1} and from 1555 to 1560 cm^{-1} respectively for CS-G and chitosan film after irradiation at the same dose (60kGy). Shift in these bands (carbonyl and amino groups) after irradiation might indicate a new linkage within chitosan and gelatin strings in pure polymer films or between the two polymers in blends. Electron beam irradiation can create free radicals. This can induce some new linkage between chains. Similar results were found by Tuhin et al. (2012) for chitosan-starch film modified with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) using gamma radiation. Usually electron beam deliver a much higher dose rate than gamma-rays. The longer residence time in the case of gamma-rays generally leads to more oxidative degradation. Hence, the extent of crosslinking in chitosan can be favored when using EB compared to gamma-rays. Ramaprasad et al. (2009) found higher crosslinked fraction in chitosan grafting polyaniline in the case of EB compared to gamma rays. Recently, it has been reported by Ramnani et al. (2004) that gamma-ray can induce a crosslinking of chitosan in the powder form when in presence of CCl_4 . In the case of protein films, controversial results have been reported regarding the level of irradiation that can induce cross-linking but also degradation. It seems to depend on protein concentration, irradiation dose and water content. Rhim et al. (1999a) reported substantial degradation induced by UV radiation, occurring simultaneously with the formation of new crosslinks, thus preventing any increase in the film tensile strength. Bhat and Karim. (2009) found that crosslinking appears to dominate over the effect of chain degradation as manifested by the enhancement in gel strength of UV irradiated fish gelatin.

IV.2.3.5.2. UV-vis spectroscopy

The UV-vis absorption spectra of non-irradiated and irradiated chitosan, gelatin and blend chitosan-gelatin films are given in **Figure IV.2.5(a)**. A maximum absorption peak for chitosan films is observed at 385 nm. Gelatin films display an absorbance peak at 280 nm. A wide absorption peak for blend chitosan-gelatin films was observed between the two typical peaks respectively for chitosan and gelatin (**Figure IV.2.5b**). Thus it is in favour of the formation of a new linkage between the two polymers probably between amide and hydroxyl groups.

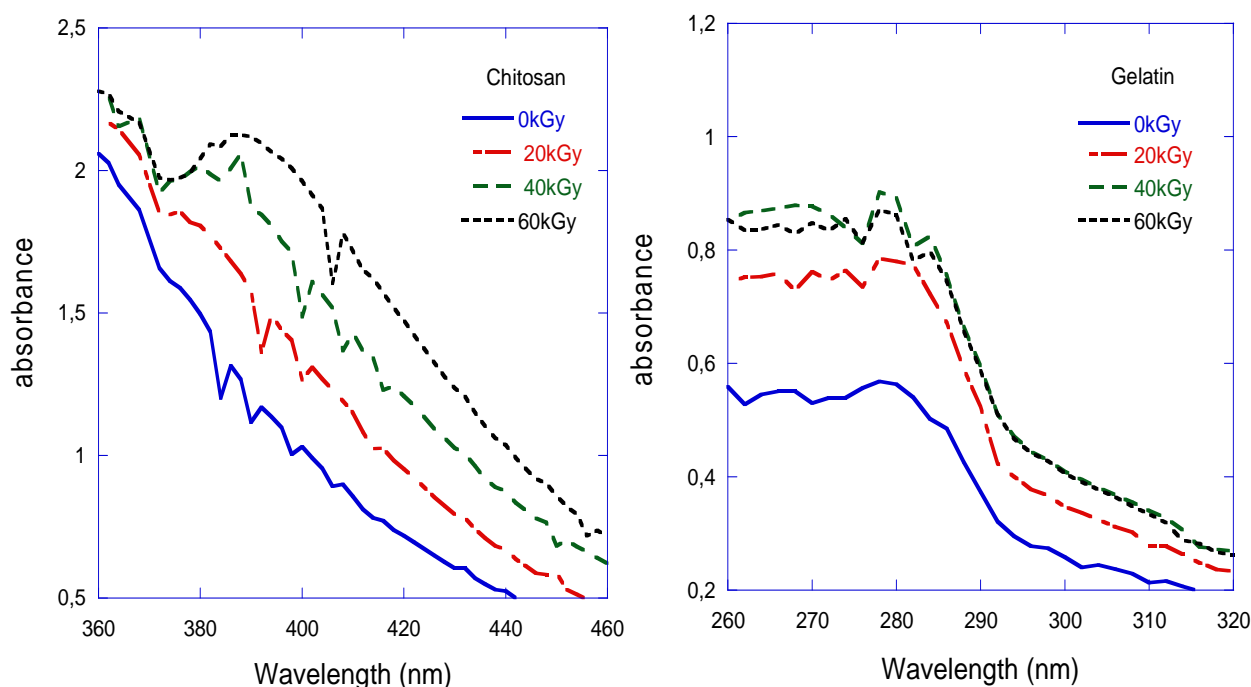


Figure IV.2.5(a). UV-visible spectra of chitosan and fish gelatin films after different irradiation doses at the dose rate 300Gy/sec (50%RH, 25°C).

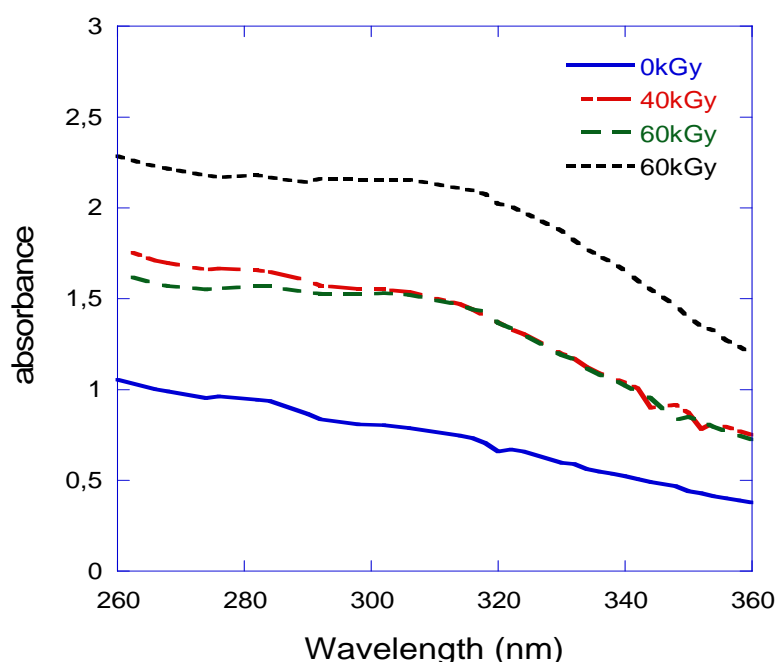


Figure IV.2.5(b). UV-visible spectra of blend chitosan and fish gelatin films (50%CS-50%G)(w/w) after different irradiation doses at the dose rate 300Gy/sec (50%RH, 25°C).

All of the above-mentioned absorption peaks are shifted toward higher wavelengths after irradiation both for chitosan and gelatin. The two absorption peaks for gelatin and chitosan films (respectively 280 and 385 nm), and the strong absorption band (280–385 nm) for blend film may be caused by the $n \rightarrow \delta^*$ transition for the amino groups of chitosan, and may also be assigned to the $n \rightarrow \pi^*$ transition for the carbonyl or carboxylic groups of gelatin. The peak centered at approximately 280 nm is potentially attributed to a convolution of absorbance by phenylalanine and tyrosine in gelatin. The increase in absorbance at 280 nm was thought to be related to the cross-linking mechanism. Because some tyrosine oxidation products absorb at around 475 nm (for example, dopachrome and aminochrome), tyrosine oxidation is supposed to be partly responsible for the potential cross-linking pathway in the gelatin films and in the gelatin-chitosan blend films. So, it was proposed that free radicals generated by electron beam irradiation introduce new bonds in the film structure, the shift in the absorbance being caused by the formed complex (Ou et al., 2005). In the following, we would make suggestions about the mechanism of crosslinking induced by irradiation of films. Similar results were found by Cao et al. (2007a) in the case of gelatin film crosslinked by ferulic and tannin acid. These authors assumed that a crosslinking mechanism can occur when hydroxyl and carboxyl groups of ferulic acid and its oxide, quinoid ferulic acid, react with amino acids (such as tyrosine, lysine and cysteine) of gelatin by hydrogen bond or esterification. Similarly, Mu et al. (2012), in the case of gelatin and dialdehyde carboxymethyl

cellulose (DCMC) films, indicated that absorbance increases at 200 nm and 280 nm when the DCMC/gelatin ratio increases. This suggests the occurrence of a crosslinking between gelatin and DCMC by Schiff base formation. It was also observed that when the irradiation dose increases, the absorption peak also increases. Thus it might be due to the increase in free radicals that induce a crosslinking within the film structure. Karakirova and Yordanov. (2010) found that the UV response of irradiated sucrose by heavy particles irradiation linearly increases with the dose. However no explanation of this phenomenon was been found up to now and it will require further investigations. Ulanski and Rosiak. (1992) found that the increase in absorbance at 247 and 290 nm is probably due to the formation of carbonyl and carboxyl groups in chitosan backbone via chains scission after irradiation. These changes are more pronounced for samples irradiated in the presence of oxygen. Similar results were also shown by El-Sawy et al. (2010) who indicated that UV spectra for treated chitosan by ammonium persulfate at different irradiation doses from 40 to 200kGy show a strong absorption band around 280–300 nm which may be caused by the $n \rightarrow \delta^*$ transition for the amino groups of chitosan and may also assigned to the $n \rightarrow \pi^*$ transition for the carbonyl or carboxylic groups. The peak intensity increased with the irradiation dose. This peak can be ascribed to carbon–oxygen double bonds (carbonyl groups) formed after the main chain scission of chitosan and hydrogen abstraction reaction followed by the ring opening (Ulanski and Rosiak, 1992). It has been reported that the depolymerization of polysaccharides by gamma irradiation led to characteristic absorption between 240 and 350 nm in UV–vis spectra because of some other chemical changes such as the formation of carbonyl, carboxyl, and double bonds (Wasikiewicz et al., 2005).

IV.2.3.5.3. Electron Spin Resonance analysis

Figure IV.2.6 shows the ESR spectra of initial and irradiated chitosan, gelatin and CS-G blend films. Chitosan films present two typical peaks at 3475 and 3500 G. The same peak was also found by El-Sawy et al. (2010). Blend film and gelatin film present essentially one peak at 3500 G. Chitosan film shows typical irradiated sucrose ESR spectra as displayed by Karakirova and Yordanov. (2010). These authors showed identical shape of ESR spectra of irradiated sucrose with various types of irradiation (carbon, nitrogen ions and gamma-rays). They suggested that generated free radicals are not influenced by the nature of the radiation. The signal intensity for chitosan films increased after irradiation dose at 20kGy and became similar for higher doses. Chitosan-gelatin blend film showed a linear increase in ESR signal as the absorbed dose increased. In the case of gelatin films, ESR peak showed a marked increase only at the highest irradiation dose (60kGy).

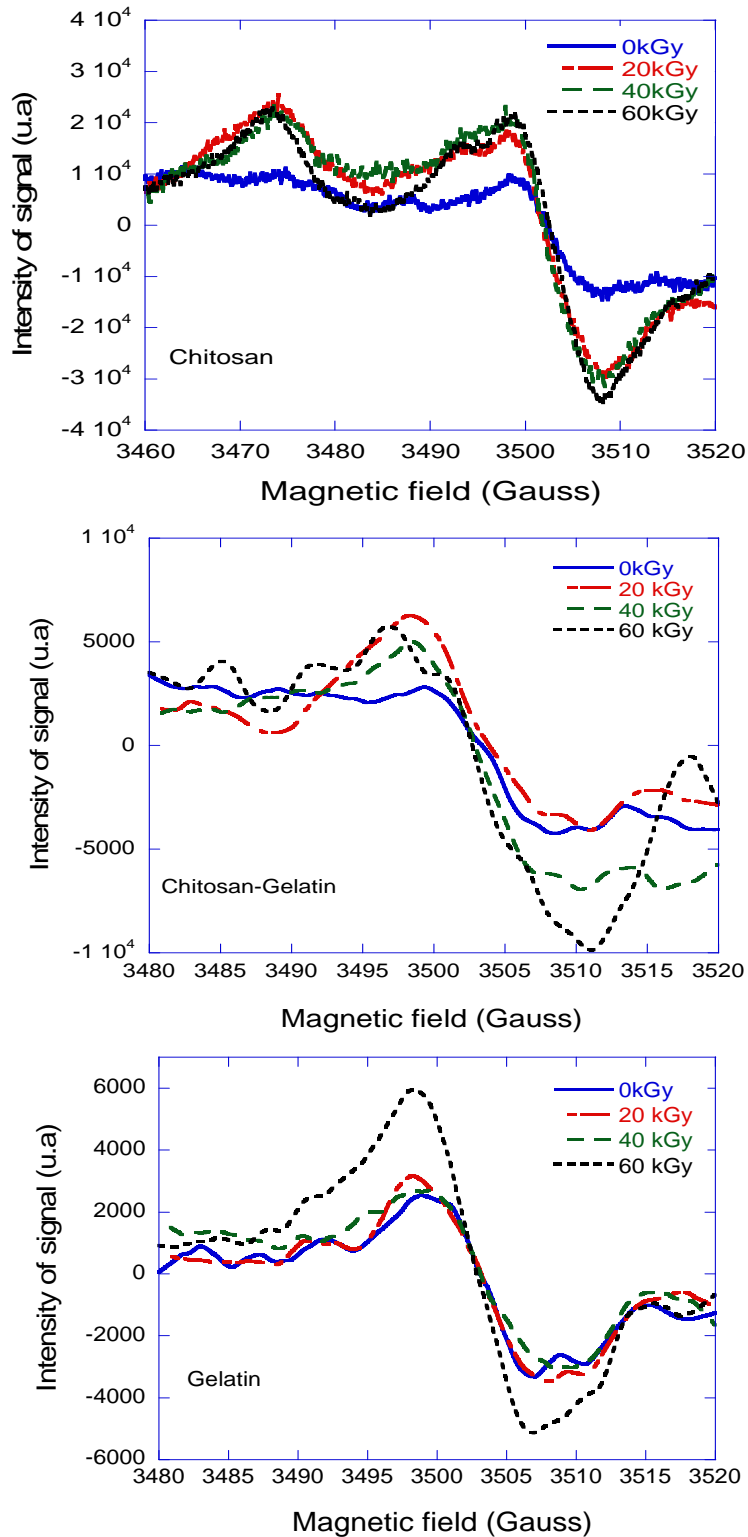


Figure IV.2.6. Typical EPR spectrum of pure chitosan and fish gelatin films and their blend (50%CS-50%G, w/w) after different irradiation doses at the dose rate 300Gy/sec. Measurement was taken after 60 days at 25°C and 50%RH.

Résultats et discussion. Chapitre IV

Karakirova and Yordanov. (2010) found a positive correlation between ESR intensity and absorbed dose for irradiated sucrose (from C, N ions and gamma rays). From the ESR spectrum of chitosan films, electrons generated by accelerator induce free electrons in polymer chains.

Electron beam irradiation produces free radicals in the form of unpaired electrons detected by the ESR signal at around 3475 and 3500 G for all films. First of all, it was important to check whether or not free radical were formed and remained in the films after irradiation. Knowledge of radiation-induced changes in polysaccharides and protein films at the solid state is not satisfactory. Only a few papers reported data on the underlying mechanisms. According to Pasanphan et al. (2010), the expansion of the chitosan chains could lead to the high possibility of depolymerization by gamma irradiation. As a result, the free radicals ($H\bullet$, $HO\bullet$, $HO_2\bullet$ etc., generated in the presence of both O_2 and H_2O) could lead to significantly increase the depolymerization of chitosan in aqueous medium. In contrast, for freeze-dried chitosan samples, the polymer chains were not able to adequately expand due to the formation of the inter- and intra-molecular hydrogen bond networks. Thus, chitosan displayed different behaviours when irradiated in the solid state (Yue, 2014). In the chitosan chain two types of reactive groups can form a potential site for crosslinking: the C2 amino groups in deacetylated units and the hydroxyl groups on C3 and C6 carbons in acetylated or deacetylated units (Alves and Mano, 2008). In acidic medium, NH_2 groups (on deacetylated units) of chitosan are involved in some interaction during irradiation (Casimiro et al., 2010). For gelatin films, it is known that proteins undergo a conformational change under irradiation treatment, such as oxidation of amino acids groups (tyrosine, lysine and cysteine), rupture of covalent bonds, recombination and polymerization reactions via protein free radicals formation. Thus molecular degradation as well as cross linking can occur in solid state. Rhim et al. (1999a) found that UV radiation is absorbed by double bonds and aromatic rings, which causes free radical formation in amino acids (such as tyrosine and phenylalanine), which can enhance physical properties of protein films by the formation of intermolecular covalent bonds. From the study of Bhat and Karim. (2009), the crosslinking appears to dominate over the effect of chain degradation as manifested by increase in gel strength after UV irradiated fish gelatin. Bessho et al. (2007) reported that insolubility of gelatin hydrogel is due to the crosslinking of gelatin chains at gamma-irradiation doses above 8 kGy. They suggested that alkyl or phenyl groups in the side chains are the crosslinking sites within gelatin hydrogels. A further evidence of the crosslinking of gelatin upon UV irradiation was evidenced by Vaz et al. (2003). They reported that the Young's modulus of UV-treated gelatin films increased by almost two times and this was attributed to the aggregation of gelatin helices. Rubin and Amer. (1968), in the case of collagen membranes, demonstrated that collagen could be crosslinked using short wavelength (254 nm) ultraviolet irradiation. Ultraviolet irradiation produces radicals in the form of unpaired electrons located predominately in the nuclei of the aromatic amino-acyl residues such as tyrosine and phenylalanine. Crosslinks are introduced by bonding between these radicals (Forbes and Sullivan, 1966). Weadock et al. (1984) showed that from the 3156 residues in the collagen molecule, 51 aromatic residues are available for this crosslinking mechanism. Upon irradiation, the generation of primary water free radicals (hydrated electron, hydrogen atom, and hydroxyl radical) reacts very efficiently with proteins. Therefore, various modifications can arise from it: dimerization, polymerization and fragmentation. It is noteworthy that most food proteins undergo irradiation-induced cross-linking and subsequent improvement in the film

Résultats et discussion. Chapitre IV

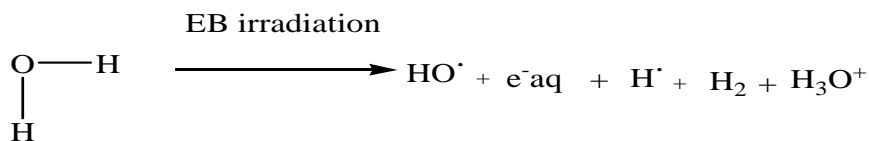
properties (Kuaaet al., 2013). These food proteins include the soy protein isolate, corn zein, wheat gluten, caseinates, whey protein, egg white, collagen, and the gelatin. Jiang et al. (2006) applied electron beam to collagen membrane. They displayed that the cross-linking density, calculated according the Flory–Rehner theory, increases with the irradiation doses.

Electrons generated by accelerator induce free electrons in the polymers chains. According to the mechanical (TS, YM and %E), the microstructural (ESEM) and the barrier (WVP and PO₂) properties improved after irradiation, it suggests that the generated free radicals in the adjacent chains were closer enough to each other to react. This led to crosslinking between the gelatin and the chitosan.

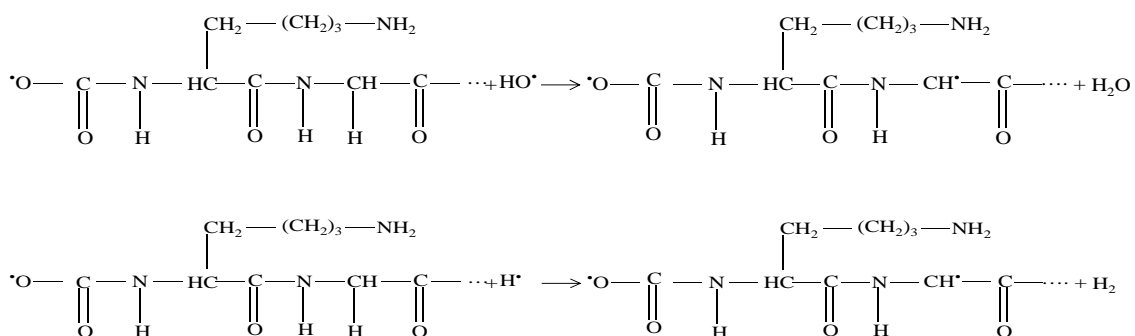
Chitosan and gelatin like cationic-anionic polymers are able to form polyelectrolyte complexes under adjusted pH or physicochemical or enzymatic treatment. **Figure IV.2.7** is a proposal of the reactional crosslinking pathway of gelatin, and chitosan-gelatin crosslinking after generation of water free radicals upon radiation exposure.

- Mechanism of gelatin crosslinking:

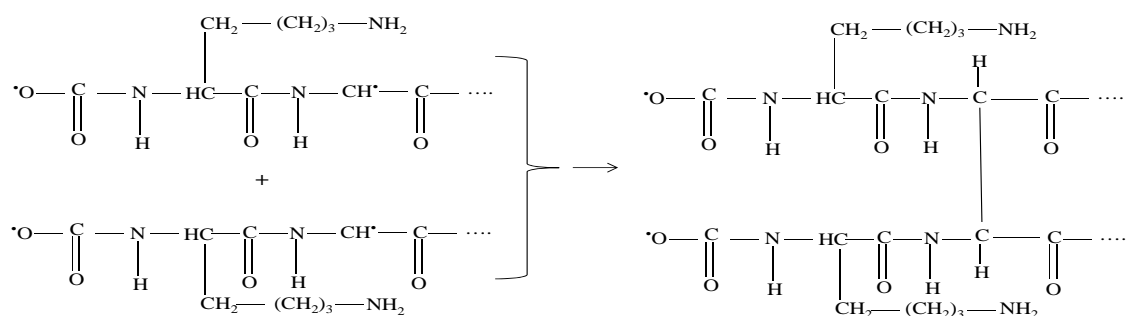
1- Water radiolysis



2-Oxidation by hydroxyl radical and hydrogen atoms on gelatin backbone structure:



3- Polymerization reaction between two chains of gelatin:



- Mechanism of chitosan-gelatin crosslinking:

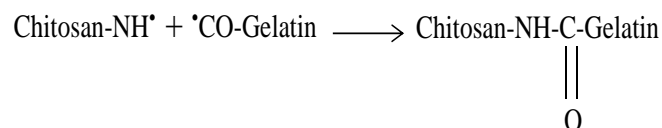
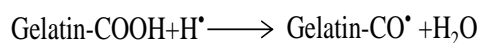
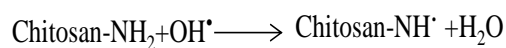


Figure IV.2.7. Possible reactional pathway during irradiation process of gelatin and chitosan-gelatin blend films.

Conclusions

This work contributed to display the effect of irradiation on functional properties of chitosan-fish gelatin blend films using microstructural, mechanical, surface and transfer properties and spectroscopic analysis as a molecular investigation of the of the interactions induced by irradiation. From ESR signal, electron beam irradiation produced free radicals in the form of unpaired electrons observed at 3475 and 3500 G. A marked increase of these ESR peaks with irradiation doses was observed for gelatin and gelatin-chitosan blend films. Results from microstructural, mechanical and barrier properties were in favour of the presence of new linkage within polymer chains or between the two polymers after irradiation. From the surface properties analysis, irradiation treatment may result in more hydrophilic character of the surface (decrease in contact angle and critical surface tension) that could explain the weaker effect of irradiation on the WVP of gelatin film. However, the increase in TS and YM and decrease in %E, as well as the denser network structure observed from ESEM micrographs and barrier properties enhancement (decrease in WVP and PO_2 for blend film) after irradiation tend to prove the settling of intermolecular linkages between the two polymers. This was been reinforced by the data from FTIR that displayed a shift in carbonyl and amino groups and from UV-vis analysis which showed an increase in absorbance at 280 nm (gelatin film) and between 280-300 nm (blend film) indicating that tyrosine oxidation was part of the potential cross-linking pathway.

IV.2.3.6. Supplementary data: Effect of irradiation doses on structural and thermal properties of chitosan and blend chitosan-gelatin film

IV.2.3.6.1. Effect on the film structural properties

X-ray diffractograms of chitosan, gelatin and chitosan-gelatin films before and after electron beam irradiation, are presented in **Figure IV.2.8**. All films displayed a low crystallinity with two diffraction peaks at $2\theta = 8.1^\circ$ and $2\theta = 20.5^\circ$. An additional peak was observed only for gelatin film at $2\theta = 31.5^\circ$.

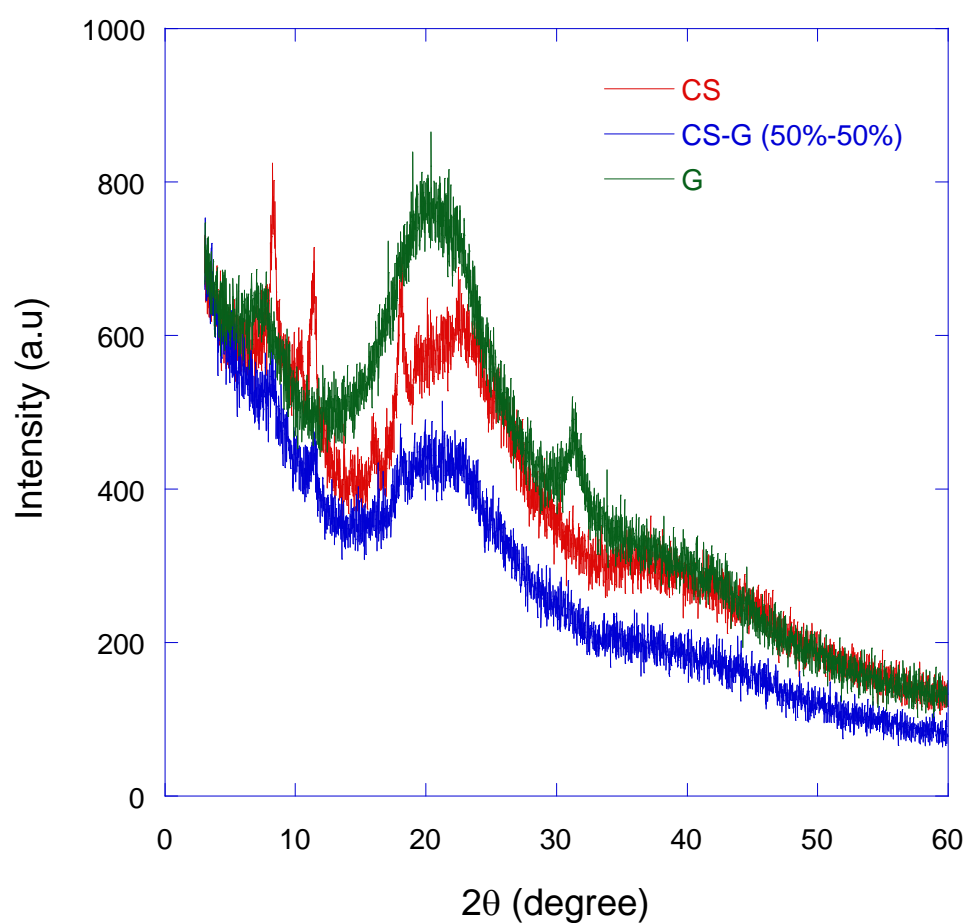


Figure IV.2.8. X-Ray diffractograms of chitosan (CS), gelatin (G) and their blend 50%CS:50%G, w:w) films. All films were equilibrated at 25°C and 50% RH.

Résultats et discussion. Chapitre IV

Nunthanid et al. (2001), in the case of chitosan film, showed that the halo diffraction pattern indicate an amorphous state of the chitosan. However, the crystalline peaks at approximately 10° (2θ) and 18° (2θ) were observed in low intensity. In the case of gelatin film, the peak around $2\theta = 20.5^\circ$ can be attributed to the amorphous halo of proteins (Bigi et al., 2000; Grevellec et al., 2001). The peak position was similar for all films. However, a high peak intensity was observed at $2\theta = 20.5^\circ$ for gelatin film as compared to chitosan and blend films. **Figure IV.2.9** presents the effect of irradiation on the crystallinity of both chitosan and blend films.

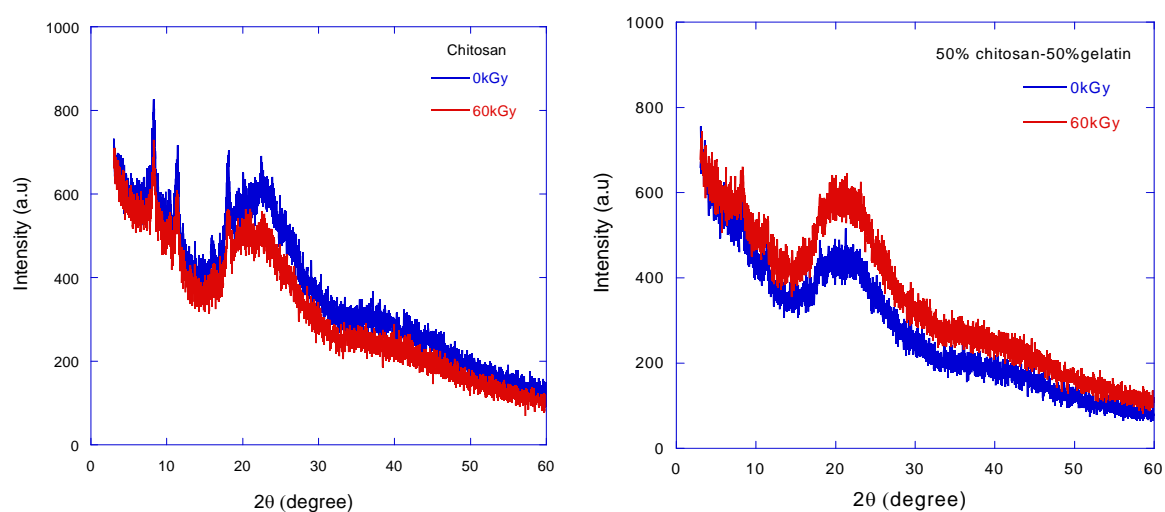


Figure IV.2.9. X-Ray diffractograms of control and irradiated (60kGy) chitosan and chitosan-gelatin films (50%:50%, w:w). Films were equilibrated at 25°C and 50% RH.

After irradiation at 60kGy, the position and intensity of the diffraction peaks did not change for both chitosan and chitosan-gelatin films. This finding suggests that if structure was changed due to either crosslinking or degradation induced by irradiation, it occurs in the only amorphous phase of the polymer matrix. However, a slightly increase in the peak at $2\theta = 20.5^\circ$ was detected in the case of blend film. In the case of milk films, Le Tien et al. (2000) and Lacroix et al. (2002) showed that X-ray peak became sharper with the increase of the irradiation dose. They suggest that cross-linking by gamma irradiation seems to modify the conformation of proteins, which became more ordered and more stable.

IV.2.3.6.2. Effect on the film thermal properties

The TGA thermograms, given in **Figure IV.2.10** show the thermal degradation behavior of chitosan films, fish gelatin films and the blend films. The effect of irradiation on the thermal stability of the films is displayed in **Figure IV.2.11**. The corresponding degradation temperatures (T_d , T_{max} and T_f) and weight loss (Δw) of all studied films are given in **Table IV.2.4**. Decomposition profiles of control (non-irradiated) and irradiated films (60kGy) are characterized by two main transformation steps. The first stage is a 10 to 15% weight loss is observed at a temperature (T_{d1} - T_{f1}) of around 45 - 200°C . It is probably associated to

Résultats et discussion. Chapitre IV

the loss by evaporation of acetic acid, free water sorbed in the film and of glycerol. The second stage, is most likely associated to the degradation of the polysaccharide and protein backbones (from about 210 up to 450°C), and of the glycerol (from 177 to 211°C, Maturana and Pagliuso, 2011) and also structurally bound water. The second stage from 214°C up to 425°C corresponds to the greatest weight loss, between 46 and 67%, depending on the irradiation dose and nature of film. For non-irradiated films, chitosan film displays lower thermal degradation temperatures as well for Tmax1 (118°C) as for Tmax2 (267) associated with higher residual mass (33%) as compared to the blend and gelatin film (**Table IV.2.4**). This later has higher thermal degradation temperature (131 and 326°C respectively for Tmax1 and Tmax2) and lower residual mass (18%). This result is in agreement with that reported by Chiono et al. (2008) in the case of chitosan film (Tmax2=277°C), blend chitosan-gelatin film (60%-40% (w/w)) (Tmax2=281°C) and for pure gelatin film (Tmax2=331°C).

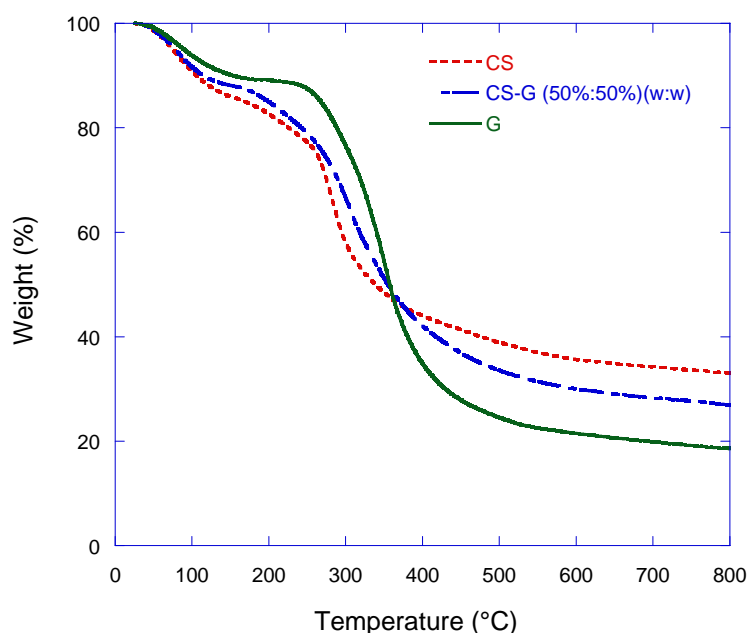


Figure IV.2.10. TGA thermograms of chitosan (CS), fish gelatin (G) and their blend film (50%CS-50%G). Films were equilibrated at 25°C and 50% RH.

Thermal stability of chitosan film was improved after gelatin addition. Similarly, Chen et al.(2008) showed that gelatin films exhibited higher thermal degradation temperature and lower residuals mass than the chitosan films. They founded also that addition of gelatin into chitosan films increased markedly the thermal degradation temperature. This result confirms the more stabilized, more compact and denser structure of gelatin films as previously observed from microstructural (ESEM) and from mechanical analysis.

After irradiation at 60kGy, we did not observe any significant modification on thermal stability of the chitosan films (**Figure IV.2.11** and **Table IV.2.4**); however a slight enhancement in thermal stability was observed in the case of blend films as observed for pure gelatin films.

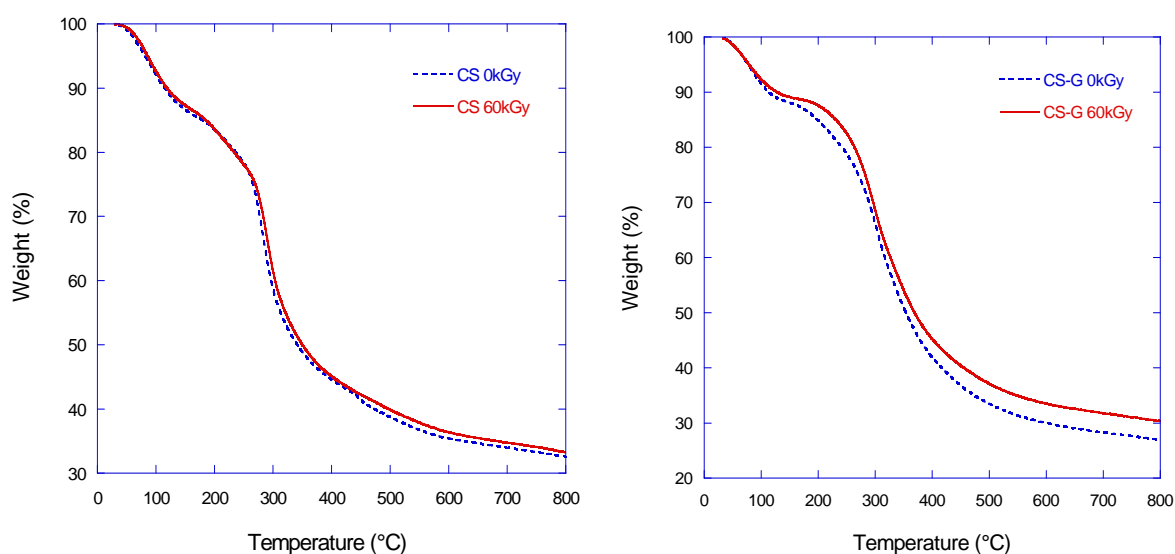


Figure IV.2.11. TGA thermograms of control and irradiated (60kGy) chitosan (CS) and blend chitosan-fish gelatin film (50%CS-50%G) (w/w). Films were equilibrated at 25°C and 50% RH.

From DSC thermograms, a transition, supposed to be the glass transition, is observed in positive range temperatures. No other phenomenon was observed, nor in positive or in negative temperature ranges, whatever the films. So, DSC analysis confirms the miscibility (no phase separation) between chitosan and gelatin in the blend film, nor crystallisations. The glass transition temperature (T_g), for non-irradiated and irradiated (60kGy) chitosan (CS) and blend chitosan-fish gelatin (50%CS-50%G) films were determined (**Table IV.2.4**). The experimental T_g values of chitosan film was 52°C, whereas that of gelatin film is higher (61°C). The glass transition temperature of the blend film (57°C) is between that of pure films. Gómez- Gomez-Estaca et al. (2011) founded that the glass transition temperatures of complex gelatin-chitosan films were intermediate between those for the respective single components (, indicating some level of blending after interaction/association between components. The T_g values they found were about 8°C for gelatine and 25°C for chitosan, but their films contained 15% of glycerol and were equilibrated at 58% RH. So films were more plasticized which explains the lower values of T_g . After irradiation, T_g significantly increased from 52 to 67°C and from 57 to 69°C respectively for chitosan and blend films. This can be due to new bonds established in the polymers network which limit the molecular mobility. Usually when the cross-linking occurs in polymers, the T_g increases because of the reduced mobility of chain segments. Crosslinking also changes the local molecular packing and leads to a decrease in free volume. This result is in accordance with the improvement of barrier and mechanical properties of chitosan and blend films under irradiation.

Table IV.2.4. Tg from DSC analysis, weight loss (Δw), transformation temperature (Td, Tmax or Tf) and % of residue from TGA analysis of non-irradiated and irradiated chitosan, and blend chitosan-fish gelatin film. Measured at 25°C and 50% RH.

Film types	DSC		TGA							
	Tg	1st transformation region				2nd transformation region				Residue (%)
		Δw (%)	Td ^a (°C)	Tmax ^b (°C)	Tf ^c (°C)	Δw (%)	Td ^a (°C)	Tmax ^b (°C)	Tf ^c (°C)	
CS 0kGy	52	15	46	118	175	48	215	267	343	33
CS 60kGy	67	14	49	120	173	46	214	267	341	33
CS-G 0kGy	57	12	49	128	191	56	230	286	401	27
CS-G 60kGy	69	10	46	131	191	53	233	291	406	31
G 0kGy	61	11	52	131	200	67	250	326	425	18

^a Onset temperature, ^b Maximum temperature, ^c End temperature.

**Chapitre V. Influence des antioxydants
(acide férulique, tyrosol et quercétine)
sur les propriétés des films de chitosan et
de gélatine avec ou sans traitement
d'irradiation**

Chapitre V. Influence des antioxydants (acide férulique, tyrosol et quercétine) sur les propriétés des films de chitosan et de gélatine avec ou sans traitement d'irradiation

V.1. Effet de l'incorporation de l'acide férulique, de tyrosol et de la quercétine sur les propriétés physico-chimiques et structurales des films

Publication n° 4

Coupling tyrosol, quercetin or ferulic acid and electron beam irradiation to cross-link chitosan-gelatin films: a structure-function approach

Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.H. & Debeaufort, F

Accepted by Eur. Polym. J., 2015

Abstract

Marine industry by-products, chitosan and fish gelatin, entrapping natural antioxidants (ferulic acid, quercetin and tyrosol) were used to prepare edible active films by casting. The films were composed of chitosan and fish gelatin (1:1 w:w) and incorporating antioxidants (~50 mg/g). After solvent evaporation (drying), the films were irradiated at 60kGy by electron beam. This treatment aims at investigating the coupled effect of irradiation with the presence of active compound on the structure and functional properties of the films. Electron Spin Resonance (ESR) unravelled free radical formation during irradiation in films containing ferulic acid or tyrosol which favoured cross-linking between biopolymers. Then, some films became stiffer, the tensile strength increased after the incorporation of antioxidants and/or after irradiation. As expected, as the tensile strength increased, the % of elongation of irradiated and antioxidant-containing films was reduced, except for the irradiated control films. The enhancement of water barrier properties, measured using a 0-30% RH gradient, was observed after ferulic acid and tyrosol additions but remained unchanged after irradiation treatment. A synergic effect of irradiation and active compounds addition was noteworthy on the oxygen barrier properties. Irradiation and antioxidants also induced a slight enhancement of the thermal stability. The surface tension and its dispersive component significantly increased after the incorporation of antioxidants. On the contrary, a significant increase of the polar component is observed for the film containing ferulic acid. Irradiation accentuated the wettability and the hydrophilicity of the film containing quercetin and tyrosol. These results clearly showed that interactions between the polymer chains and/or between the polymer chains and the antioxidants

after irradiation were favoured by both antioxidant addition and electron beam treatment. This is confirmed on a molecular scale from the peak shifts observed in amide and carbonyl groups as observed from FTIR.

V.1.1. Introduction

The modern food industry is facing new challenges one of which being related to the food packaging to extend shelf life. Currently, a great number of research works are focused on the use of edible films with good water and oxygen barrier properties to protect food (Fabra et al., 2011). Since the consumer demand has shifted to safe materials, especially from renewable agriculture by-products and food processing industry wastes (Tharanathan, 2003), natural polymers (proteins, polysaccharides) are the main components of edible films (Gontard & Guilbert, 1994). They are considered as active packaging when they can incorporate active compounds, such as antimicrobials, preservatives or antioxidants, which allow to improve food quality and safety (Han, 2002). They can be applied as active coatings onto oil-based packaging films to provide new functions such as antifog or antimicrobial (Introzzi et al., 2012). Chitosan is a natural polymer from fish industry waste obtained by the deacetylation of chitin. Chitosan has many advantages such as biocompatibility, biodegradability and lack of toxicity, while also presenting functional properties such as bacteriostatic and fungistatic effects (Dutta et al., 2009; Kumar, 2000). The cationic character of chitosan in acidic conditions offers the opportunity to establish electrostatic interactions with other negatively charged compounds. Due to these characteristics, chitosan has been widely used for the production of edible films as well as bio-compatible polymeric materials (Aider, 2010; Rivero et al., 2010). Gelatin is one of the versatile biosourced materials obtained from collagen by the controlled hydrolysis of the fibrous insoluble collagen present in the bones and skin generated as waste during animal defating and fish processing (Ahmad and Benjakul, 2011). This material is known for its excellent film forming ability and could interestingly be used for packaging applications, due to its good barrier properties to oxygen and light, for example to prevent lipid oxidation (Hoque et al., 2011). Several properties of gelatin films, such as mechanical properties, permeability, light absorption, transparency, antimicrobial activity and antioxidant ability, are influenced by the addition of active substances (Pires et al., 2011). Chitosan and gelatin have been shown to be compatible due to the establishment of electrostatic and hydrogen bonding when chitosan is positively charged and gelatin is negatively charged under appropriate conditions of pH. This is particularly important to improve the final network properties as compared to those obtained from the pure polymers (Pereda et al., 2011; Benbettaieb et al., 2014a,b). To enhance the water barrier and mechanical properties of protein-polysaccharides films, chemical cross-linking agents and enzyme including transglutaminase (Carvalho and Grosso, 2004), triacetin (Jiang et al., 2010) or glutaraldehyde have been used (Farris et al., 2010). Glutaraldehyde (GTA) can form cross-linkage with the amino pendant groups of polypeptide chains, enhancing the interaction between the gelatin protein molecules (Bigi et al., 2001). However, this cross-linking agent is synthetic and cytotoxic (Sung et al., 1999), while transglutaminase are expensive (Mathew and Abraham, 2008). Therefore, natural antioxidant agents offer an interesting alternative. The antioxidant activity of ferulic acid, a natural hydroxycinnamic acid, α -tocopherol and hydroxytyrosol, has already been well documented (Mathew & Abraham, 2008; Fabra et al., 2011). Several studies have focused on the use of these natural antioxidants in plastic films such as high-density (HDPE) or low-density (LDPE) polyethylene (Wessling et al., 2000). However, little information exists about the influence of such natural antioxidants over edible films functionality (Cao et al., 2007; Mathew & Abraham, 2008; Ou et al., 2005). Beside its use as antioxidant agent, ferulic acid is found to covalently link to polysaccharides by ester bonds (Mueller

Harvey et al., 1986), and consequently enhances various film properties. Mathew and Abraham. (2008) showed that the incorporation of ferulic acid improved the barrier properties and tensile strength of starch–chitosan blend films as well as their lipid peroxide inhibition capacity. Moreover, physical methods including dehydrothermal treatment, ultraviolet, heat and gamma irradiation (Bigi et al., 1998) help to modify the polymeric network through the cross-linking of the polymer chains and also help to improve the functionality of polysaccharide (Sabato et al., 2000) or protein (Vachon et al., 2000) based films. Indeed, irradiation treatments have been described to enhance water barrier and mechanical properties of protein-polysaccharides complexes (Lacroix et al., 2002; Lee et al., 2004; Jo et al., 2005; Inamura et al., 2013)The development of active packaging systems, particularly those exhibiting antimicrobial and antioxidant properties have been widely studied (Martins et al., 2012; Pranoto et al., 2005). However, other important features of such systems, such as the impact of the active agent on film structure and functionality, are less studied. The aim of this work is to analyze the synergic effect of the incorporation of natural antioxidants (ferulic acid, quercetin and tyrosol) and electron beam irradiation on the mechanical, thermal, barrier and structural properties of chitosan-fish gelatin edible films.

V.1.2. Materials and methods

See Chapter II

V.1.3. Results and discussion

V.1.3.1. Free radical generation

Figure V.1.1 shows the ESR spectra of chitosan-gelatin blend film containing tyrosol, ferulic acid and quercetin before and after irradiation at 60kGy.

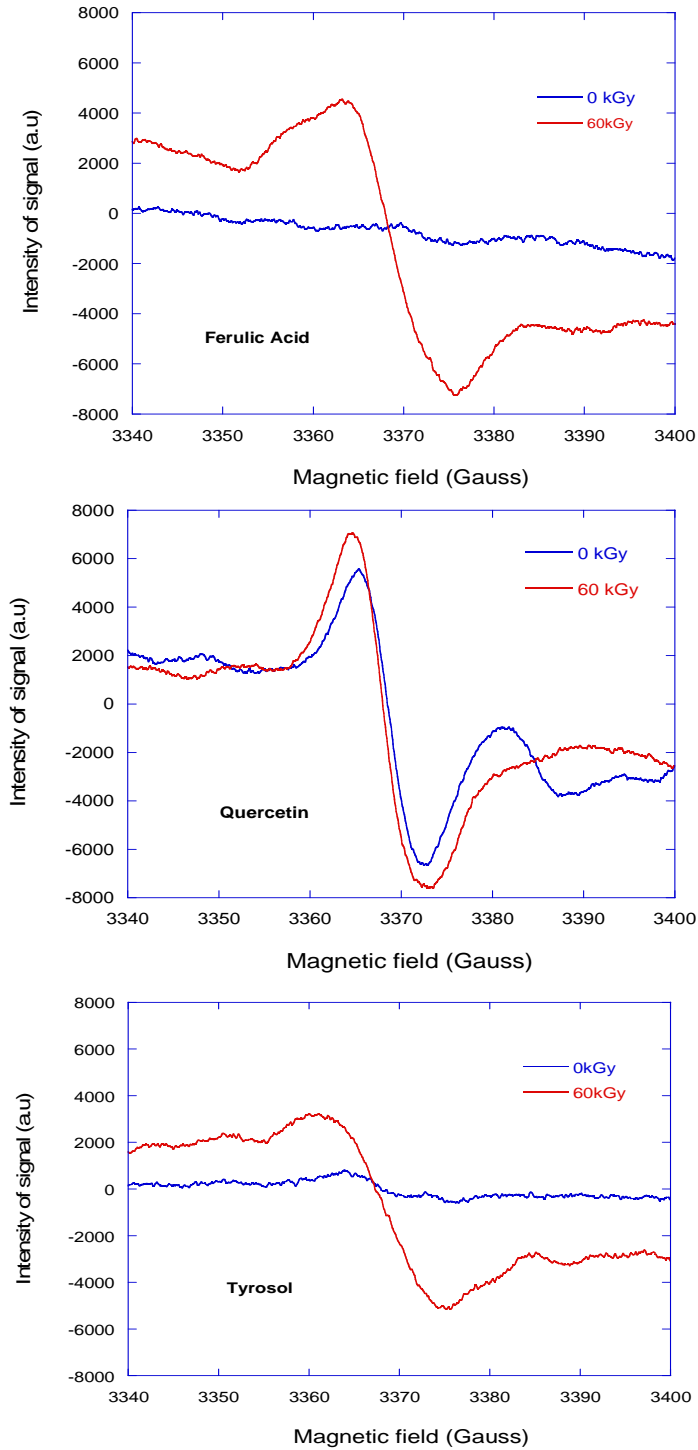


Figure V.1.1. ESR spectra of chitosan-fish gelatin films containing antioxidants and irradiated at 60kGy at the dose rate of 300Gy/sec. Measurements were performed at 25°C and 50% RH, 3 months after irradiation.

No signal is noticeable in the case of non-irradiated films containing tyrosol or ferulic acid. Contrarily, the non-irradiated films with quercetin displays an important peak, which suggests that quercetin already includes radical species. This peak intensity increases after irradiation, and it remains even after a 3 months storage. The presence of radical species before irradiation especially in the case of quercetin film was described by Sakanashi.(2008) and Horvathova et al. (2004). These authors displayed that many subclasses of flavonoids like quercetin vary by the functional group placed on heterocyclic ring. Moreover, the presence of 3-hydroxyl group along with the flavonols may affect their absorption and their ability to form natural free radicals which are very reactive. These free radicals can be connected with other free radicals and generate a more stable product and finally act as antioxidants. Similarly, all irradiated films displayed one peak at 3365 G, also noticed by Benbettaieb et al. (2014b) in the case of chitosan-gelatin blend film after electron beam irradiation. For the films containing the antioxidants, the electrons generated by accelerator induce free radicals in the system in the form of unpaired electrons. The antioxidants charged with hydroxyl groups could react with a polysaccharide and protein network. ROO[•] radicals (peroxide radicals) formed after water radiolysis may convert phenolic groups of antioxidants to quinone groups via quinone-mediated reactions. This latter could interact with nucleophilic amino group of gelatin and crosslink final network. Indeed, the interactions between protein and polyphenol can involve hydrogen bond, covalent linkage, ionic and hydrophobic bonding as displayed by Zhang et al. (2010). These authors stated that the reaction mechanism involves an initial oxidization of phenolic structures to quinones, which can readily react with nucleophiles from reactive amino acid groups in protein: sulfhydryl group in cystein, amino group of lysine and arginine, amide group from asparagine and glutamine, indole ring of tryptophane and imidazole ring from histidine.

Sahu et al. (2009) showed the efficiency of microwave irradiation for the oxidation of phenol into quinone after free radicals generation in the presence of hydrogen peroxide. Graf.(1992) found that any reactive radical colliding with ferulic acid can easily abstract a hydrogen atom to form a phenoxy radical. This radical is highly resonance stabilized since the unpaired electron may be present not only on the oxygen but it can be delocalized across the entire molecule. This is in favour of the presence of a more intense peak in the case of irradiated film containing ferulic acid. Additional stabilization of phenoxy radical is provided by the extended conjugation in the unsaturated side chain of the ferulic acid. This phenoxy radical is unable to initiate or propagate a radical chain reaction, and its most probable fate is a collision and condensation with another radical, including another ferulate radical to yield the curcumin dimer. After irradiation, ferulic acid, quercetin and tyrosol are rapidly converted into semi-quinone radicals. Because of the large excess of glycine-tyrosine initially present in the gelatin structure. The semi-quinone radicals and the glycine-tyrosine radicals could also react. Cross-linkages between the protein tyrosine and the ferulic acid moiety of the feruloylated arabinoxylan were also outlined (Oudgenoeg et al., 2001). Even if no colour measurement has been done we noticed a slight change of the colour of the film containing ferulic acid or tyrosol or quercetin. Indeed these films became yellowish after irradiation, which is the typical colour of quinone generation.

Furthermore, the amino acid residues in proteins are highly susceptible to oxidation by reactive oxidative species (ROS) that are formed during exposure to irradiation (Stadtman and Levine, 2003). Intra- or inter-protein curing reactions occur by several different mechanisms, including essentially

direct interaction of two carbon-centered radicals and two tyrosine radicals and interaction of carbonyl groups of oxidized proteins with the primary amino groups of lysine residues in the same protein or from another protein. This could induce an improvement of both mechanical properties and oxygen barrier efficiency. Gennadios et al. (1998) and Rhim et al. (1999a) also found that UV radiation is absorbed by double bonds and aromatic rings, which causes free radical formation in amino acids (such as tyrosine and phenylalanine), which can also enhance the physical properties of protein films by the formation of intermolecular covalent bonds. In the chitosan chain two types of reactive groups can form a potential site for crosslinking: the C-2 amino groups from deacetylated units and the hydroxyl groups on C-3 and C-6 carbons from acetylated or deacetylated units (Alves and Mano, 2008). In an acidic medium, NH_2 groups (from deacetylated units) of chitosan are able to be involved in some interactions (covalent binding) during irradiation (Casimiro et al., 2010). Knowing free radicals are present, we can suppose the crosslinking mechanism between polymer chains and antioxidants may occur. This would probably affect both mechanical and barrier properties of the final network.

V.1.3.2. Mechanical properties

Figure V.1.2 displays the mechanical parameters (namely tensile strength (TS), Young's Modulus (YM) and elongation at break (E)), of irradiated and non-irradiated films with or without active molecule. TS, YM and E of control film (non-irradiated, without antioxidant) were 25.9 ± 3.9 MPa, 1524 ± 267 MPa and $2.2 \pm 0.4\%$, respectively. These values are in accordance with those previously reported by Benbettaieb et al. (2014b) for chitosan-fish gelatin blend film (50:50 w/w). Jridi et al. (2014) found higher values (TS = 44.3 ± 1.2 MPa and E = $2.7 \pm 0.5\%$) for chitosan-skin fish gelatin blend film (50:50 w/w) that could be due to thickness or molar mass. Compared to the control film, TS values increased to 37.1 ± 2.1 , 29.4 ± 1.0 and 29.3 ± 3.7 MPa (which corresponds to an increase of 43.8%, 13.9% and 13.5%) with the incorporation of ferulic acid, quercetin and tyrosol, respectively. But this increase is only significant ($p < 0.05$) for ferulic acid. It could be due to the formation of a more stable network by cross-linking favored by the presence of antioxidants. Similar results were reported by Mathew and Abraham. (2008) in the case of ferulic acid incorporated in chitosan/starch blend films. They attributed the increase in TS to the redundant hydroxyl groups which may interact within the carbohydrate string and then reduce the attractive force between ferulic acid and the carbohydrate.

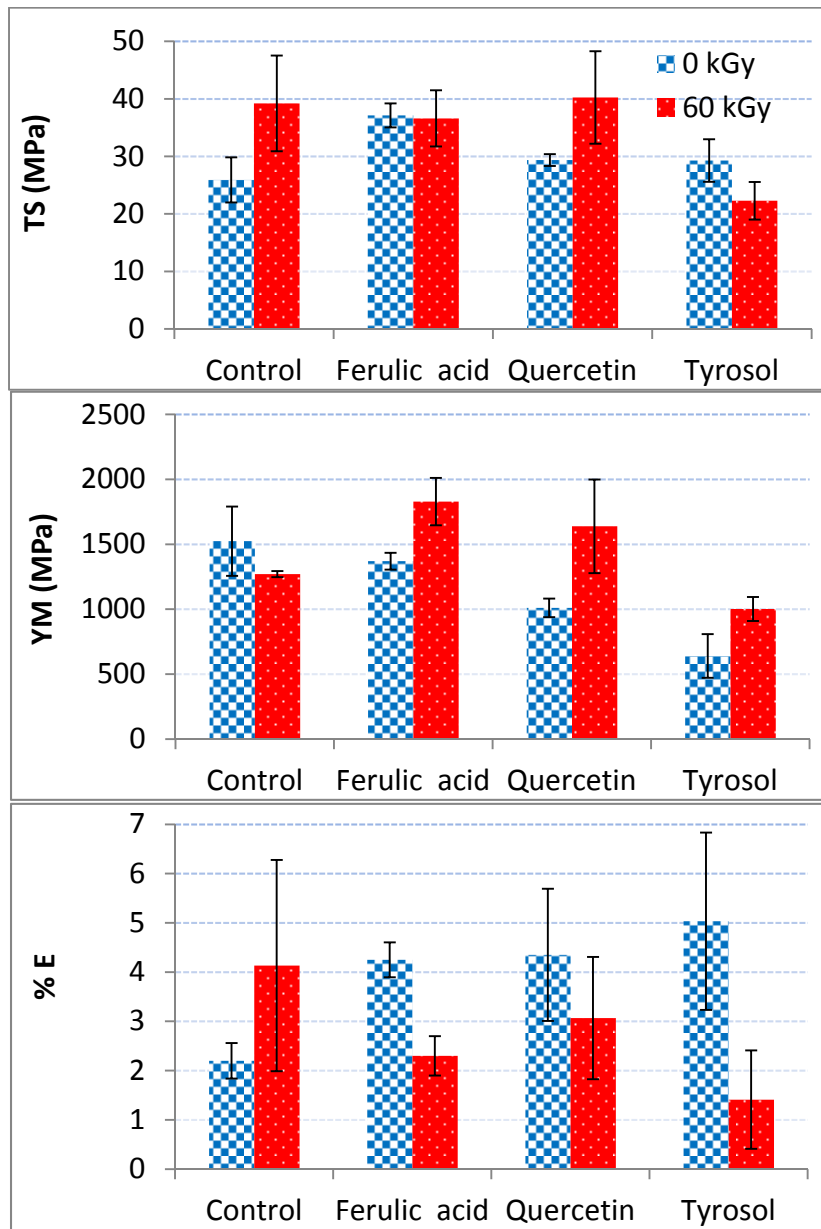


Figure V.1.2. Tensile Strength (TS), Young's Modulus (YM) and Elongation at break (E %) of irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin blend films, with and without antioxidants, at 25°C and 50% RH.

Moreover, such increase in tensile strength in the presence of ferulic acid was also observed for gelatin-soy protein films (Cao et al., 2007) and for soy protein films (Ou et al., 2005). The mechanical properties of pectin-soy flour, of gelatin/chitosan, of skin gelatin films have been improved by addition of transglutaminase, proanthocyanidin or green tea extracts respectively (Mariniello et al., 2003; Wu et al., 2013; Rattaya et al., 2009). Crosslinking could be increased via the bonding of antioxidants with tyrosine and other amino acids, through a free radical mechanism, or esterification with hydroxyl amino acids, such as serine. Ou et al. (2005) suggested a similar mechanism in the case of ferulic acid with soy protein. Ferulic acid can cross-link with protein and polysaccharides by producing a resonance-stabilized free radical intermediate (Hopkins et al., 2003; Oudgenoeg et al.,

2001). The quinone form (oxidized ferulic acid) can also react with amino and thiol groups in protein (Ou et al., 2005). Additionally, the free radical from ferulic acid reacts with tyrosine and with itself to form a diferulic acid (Oudgenoeg et al., 2001) which acts as a bridge between protein molecules. When irradiation doses were applied to the film without antioxidants, no significant modification either in TS nor in YM nor in E was observed. Inversely, Kołodziejska and Piotrowska. (2007) reported that the TS of chitosan–fish gelatin films decreased by 23% or by 37%, while E increased by 20% or by 78%, after the incorporation of transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, respectively. The YM always increased after irradiation in the case of blend film whatever the antioxidant used. It was improved respectively by 33%, 56% and 62% for films containing ferulic acid, tyrosol and quercetin after 60kGy irradiation dose. Inversely, elongation at break, E, significantly decreased after irradiation only for films containing ferulic acid and tyrosol. An increase in YM and TS and a decrease in E indicate is in favour of the establishment of new linkages between polymers or between polymers and antioxidants. This result suggests that under irradiation and in the presence of oxygen, phenolic compounds could be converted to quinone by the effect of hydrogen and hydroxyl radical derived from water radiolysis. Quinone forms could act as a protein-crosslinker by reacting with pendent nucleophilic amino group of gelatin. A similar behavior was proposed by Strauss & Gibson. (2004) in the case of gelatin gel.

V.1.3.3. Water vapour permeability

The WVP of non-irradiated and irradiated films with and without antioxidants for the two RH gradient studied (0-30 % and 30-84 %) is given in **Table V.1.1**. For the first RH gradient (0-30%), the non-irradiated film containing the active molecules displays a better water vapour barrier than the control film ($2.9 \pm 0.1 \times 10^{-12}$, $3.9 \pm 0.3 \times 10^{-12}$ and $2.8 \pm 0.2 \times 10^{-12}$ for film with ferulic acid, quercetin and tyrosol, respectively, against $5.2 \pm 0.9 \times 10^{-12} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ for the control film). This behaviour results from the cross-linking between the chitosan-gelatin network and phenolic compounds, which provides a denser structure to the film matrix. Wu et al. (2013) also noticed a decrease of 16 % in the WVP for films composed of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin containing green tea extract (0.7%). Other authors did not observe any change in the water vapor permeability when ferulic acid was added to soy protein films (Ou et al., 2005), or to caseinate based films (Fabra et al., 2011), or even to gelatin films (Cao et al., 2007). However, these authors used a greater RH gradient as well as a higher amount of plasticizer which probably concealed the effect of the addition of antioxidants. Using a higher RH gradient (30-84%) induces a rise of the WVP of all films up to 90 times according the film composition (antioxidant added) or irradiation treatment applied compared to the 0-30% RH gradient. More than the effects of the antioxidant addition, which can act as cross-linking agents, the moisture barrier properties of these films, are strongly related to the increasing environmental RH that induces a plasticization of the film by water sorption during the permeation process. Thus, due to the plasticization by absorbed humidity, the polymer chain mobility increases, thereby increasing moisture diffusivity. A similar behaviour was already observed by Benbettaieb et al. (2014) in the case of chitosan-bovine gelatin blend films. More generally, this effect has also been reported for other bio-based polymer films such as starch (Talija et al., 2008) agava–cassava starch and cassava starch–arabinoxylan blend films (Phan et al., 2009).

For the higher RH gradient (30-84%), incorporation of antioxidants significantly ($p < 0.05$) increased the WVP up to 12 times, compared to the WVP of the control film non irradiated (**Table V.1.1**). Ferulic and quercetine has many more groups (hydroxyl and carbonyl) able to interact with the biopolymers and then reducing the number of water absorption sites. Then ferulic acid and quercetin disturb the plasticization of the biopolymer by the water. The opposite position of hydroxyl groups in the tyrosol could be intercalated between two biopolymer strings as acts the glycerol. Then, tyrosol plays the role of a plasticizer itself. Moreover, as tyrosol is more soluble and less hydrophobic (log P) than the other antioxidants, it favours water absorption.

V.1.3.4. Oxygen permeability

The results of the oxygen permeability (PO_2) measured at 53%RH are given in **Table V.1.1**. It can be deduced that the protective effect of the chitosan-fish gelatin film against oxygen transfer is increasing ($p < 0.05$) when quercetin and tyrosol are used as antioxidant. Such decrease in the oxygen transfer is probably related to the cross-linking between these antioxidants and the polysaccharide-protein network, which makes the matrix tighter. Fabra et al. (2011) showed a decrease in oxygen permeability of sodium caseinate film only due to ferulic acid addition. This can be explained by the cross-linking between ferulic acid and amino acid residues of the protein which makes the matrix tighter and limited oxygen transfer.

Permeability to oxygen significantly decreases after 60kGy irradiation dose for all films, either containing or not antioxidant ($p < 0.05$), except for the film with ferulic acid. It decreased by 65%, 61%, 33% and 21% for control film and film with ferulic acid, quercetin and tyrosol, respectively. This is in agreement with the modifications of the mechanical properties after irradiation and the hypothesis of crosslinking induced.

Table V.1.1. Thickness, water vapour permeability (WVP), oxygen permeability (PO₂) of irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin film with and without antioxidants. Water vapour permeability was measured at 25°C under 0-30 % and 30-84 % RH differentials. Oxygen permeability (PO₂) was measured at 25°C and 53% RH.

	Thickness (μm)	WVP ($10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)		WVP ($10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)		PO ₂ ($10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)	
		$\Delta\text{RH}=(0-30)\%$		$\Delta\text{RH}=(30-84)\%$		at RH=53 %	
		0 kGy	60 kGy	0 kGy	60 kGy	0 kGy	60 kGy
Control	65.0±8.5 α	0.52±0.1a, α	0.56±0.03a, α	2.41±0.44a, α	23.06±0.85b, α	3.69±0.56a, α	1.28±0.20b, α
Ferulic acid	72.2±13.9 α	0.29±0.01a, β	0.3±0.01a, β	2.51±0.40a, α	18.1±0.85b α , β	4.52±2.20a α , β	1.76±0.26a, β
Quercetin	80.0±8.9 α	0.39±0.03a, α	0.37±0.04a γ	2.10±0.65a, α	19.1±2.11b α , β	1.92±0.02a, β	1.27±0.019b, α
Tyrosol	76.0±12.9 α	0.28±0.017a, β	0.28±0.01a, β	27.23±0.25a, β	16.7±2.88b, β	2.15±0.08a, β	1.68±0.17b, β

Values are given as mean \pm standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$ (for each of the three measurements displayed in this table). Means with the same Greek letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

V.1.3.5. Surface properties and wettability

The contact angle (θ) value obtained after the deposition of a water drop on the film surface indicates the surface hydrophobicity. To estimate the resistance of films to liquid water, the contact angle (that indicates surface hydrophobicity) was determined at the time of deposit (0 s) and at considered metastable equilibrium (20 s). Results are given in **Table V.1.2** for irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin films with and without antioxidants. For untreated films, the initial contact angle (at 0 s) significantly decreases ($p < 0.05$) after the incorporation of ferulic acid and quercetin, but remains unchanged for films containing tyrosol. This significant decrease is only observed for the films containing ferulic acid considering the value of the contact angle at 20 s. To better understand the effect of antioxidants on film surface properties under electron beam irradiation, the surface tension was also determined (**Table V.1.2**). The surface tension significantly increases after incorporation of ferulic acid, quercetin or tyrosol. Its dispersive component showed also a significant increase but only for films with quercetin or tyrosol. On the contrary, a significant increase of the polar component is observed for the films containing ferulic acid. The presence of this antioxidant contributed to the increase in the hydrophilicity of the film, as previously observed with the decreased value of the contact angle.

Concomitant to an increase in the polar component of the surface tension for the control films. The irradiation induces a decrease of the contact angle value with water, for films containing quercetin or tyrosol. However, the opposite effect is noticed for films containing ferulic acid. For the control, Benbettaieb et al. (2015a) showed similar results for chitosan-gelatin blend film after electron beam irradiation. It can be attributed to a reorientation of polar groups toward the film surface, hence increasing the polar component of the surface tension. Irradiation increases wettability of these films. However, the irradiation of films with ferulic acid induces a significant increase of the contact angle at 20s (from $75 \pm 7^\circ$ to $93 \pm 1^\circ$) and a decrease of the surface tension (from 42.7 ± 3.4 to 36.8 ± 0.3 mN m⁻¹) (**Table V.1.2**). This is especially due to a decrease by ten times of its polar component, rendering the films more hydrophobic. It could be assumed that irradiation can promote the interaction between CO bonding of protein and oxidized OH group of ferulic acid, and therefore it decreases the basicity of the carbonyl group of gelatin and then the hydrophobicity of film increase.

Table V.1.2. Water contact angle at 0 and 20s, surface tension (γ_S) with dispersive (γ_S^d) and polar components (γ_S^p) of chitosan-fish gelatin films, containing or not antioxidants, according the irradiation dose (0 or 60 kGy). Measurements were done at room conditions ($\sim 20^\circ\text{C}$, $\sim 50\%RH$).

	θ 0 s		θ 20 s		γ_S (mN.m ⁻¹)		γ_S^d (mN.m ⁻¹)		γ_S^p (mN.m ⁻¹)	
	0 kGy	60 kGy	0 kGy	60 kGy	0 kGy	60 kGy	0 kGy	60 kGy	0 kGy	60 kGy
Control	107.8±2.5a, α	94.7±2.6b, α	100±4.2a, γ	88.5±1.7b, α,β	35±0.6a, α	36.6±0.6b, α	34.9±0.5a, α	34.6±0.5a, α	0.23±0.2a, α	2.2±0.05b, α
Ferulic acid	81.7±7.4a, β	88.8±2.7a, α,β	75.7±7.2a, β	93.4±1.5b, α	42.7±3.4a, β	36.8±0.4b, α	36.7±2.2a, α,β	36.1±0.3a, β	7.2±1.7a, β	0.7±0.1b, α
Quercetin	99.5±4a, γ	88.0±4.7b, β	100.7±2.8a, γ	82.2±6.6b, β	38.5±0.5a, γ	40.4±1.5a, β	38.5±0.4a, β	35.8±0.4b, β	0.0±0.0a, β	5.2±0.5b, β
Tyrosol	108.6±5.6a, α	67.5±2b, γ	101±9a, γ	72.2±4.1b, γ	37.7±1a, α,γ	46.6±2.2b, γ	37.4±0.9a, β	40.2±0.8b, γ	0.3±0.1a, β	6.3±1.6b, β

Values are given as mean \pm standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$ (for each parameter). Means with the same Greek letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

V.1.3.6. Thermo-gravimetric analysis (TGA)

Thermo-gravimetric analysis was performed to follow the thermal stability of blend films prepared from chitosan-fish gelatin incorporating antioxidants. Thermograms are displayed in **Figure V.1.3(a)**. The corresponding temperatures of transformation, determined from the derivative of the thermograms (Td: onset temperature, Tmax: temperature of maximum transformation rate and Tf: end temperature), and the weight loss (Δw) observed for the various films are given in **Table V.1.3**.

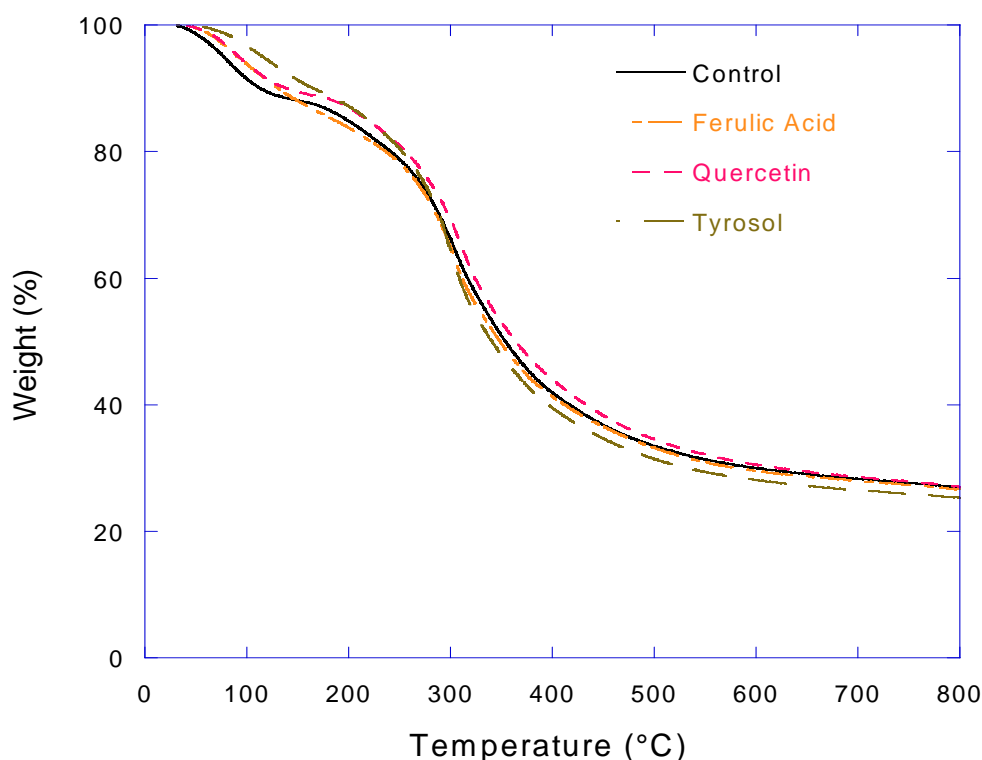


Figure V.1.3 (a). TGA thermograms of non-irradiated chitosan-fish gelatin film containing or not antioxidants. All films were previously equilibrated at 50% RH and 25°C.

Two main stages of weight loss appear for all blend films with or without antioxidants. The first stage of weight loss ($\Delta w_1=3.1-7.8\%$) is observed over a temperature range (Td1-Tf1) of around 50-153°C. It is probably associated with the loss of acetic acid and free water sorbed in the film. These results are in agreement with Inamura et al. (2013), who observed a similar behavior for biocomposite films prepared with gelatin and nut wastes as fiber source (46-140°C). Barreto et al. (2003) and Pena et al. (2010) also showed similar results in the case of gelatin film, for this first stage, up to 200°C and from 25 to 150°C, respectively. These temperature range differences can be attributed to the variation of the initial water content as well as the plasticizer used (polyols). A similar result was found in skin gelatin films incorporating green tea extract (Wu et al., 2013) and for skin gelatin films containing cinnamon, clove

Résultats et discussion. Chapitre V

and star anise extracts (Hoque et al., 2011) but at a lower degradation temperature of 62-83°C and 46-61°C, respectively. The second stage of weight loss ($\Delta w_2 = 40.8-53.9\%$) occurs in the temperature range from 215 up to 400°C. This was most likely associated to the degradation of the polysaccharide and protein backbones, of the glycerol (thermal degradation starts about 177-211°C up to 450°C (Maturana and Pagliuso, 2011)) and also structurally bound water. Barreto et al. (2003) found that the degradation of milk protein and gelatin films begins at temperatures between 296 and 329°C, and is associated with the protein chain breakage (helical structure) and peptide bonds rupture. They suggest that the different primary and secondary structures of the proteins do not significantly affect the thermal degradation process in nitrogen atmosphere. Pena et al. (2010) found very similar results to ours for gelatin film with a 250-400°C temperature range and a 66% weight loss. Ferulic acid and tyrosol powder exhibited a single stage weight loss, with decomposition starting at 170-180°C (**Figure V.1.3b**). This is in agreement with the starting decomposition temperature of ferulic acid (173°C) observed by Mathew and Abraham. (2008). On the contrary, quercetin powder exhibits two stages of weight loss (**Figure V.1.3b**): the first stage starting at 100°C, the second stage starting at 380°C. As quercetin is a very polar molecule bearing 5 hydroxyl groups on the aromatic moieties, the first stage could be assigned to the loss of two molecules of water corresponding to a weight loss of 10%. Then, the second weight loss can be assigned to the breaking of the C-C chemical bond between the naphthalen structure and the residual benzene ring which is actually the less stable chemical bond of the structure. Furthermore, final decomposition temperature of ferulic acid (260°C) and tyrosol (280°C) was lower than that of quercetin (380°C). This might lead to the higher heat resistance of films containing quercetin than films with ferulic acid or tyrosol as observed in **Figure V.1.3a**.

Films incorporating antioxidants show higher thermal degradation temperatures for T_{max1} and T_{max2} associated to lower weight loss Δw_1 and Δw_2 , when compared to the control film (**Table V.1.3**). This suggests that interactions between phenolic compounds and chitosan-gelatin molecules yield to a stronger film network, thus leading to the higher heat resistance of the films. Similar results were observed in the case of skin gelatin after addition of star anise extracts (Hoque et al., 2011) and green tea extract (Wu et al., 2013). Pena et al. (2010) showed an increase of the degradation temperature and a decrease of the weight loss for gelatin films crosslinked with hydrolysable chestnut-tree tannin. Saravanan et al. (2011) also observed an improvement of the thermal stability of chitin-bentonite blend film after glutaraldehyde addition. They suggest that there are stronger interactions between the molecular chains of chitin and bentonite in the presence of the crosslinking agent.

Résultats et discussion. Chapitre V

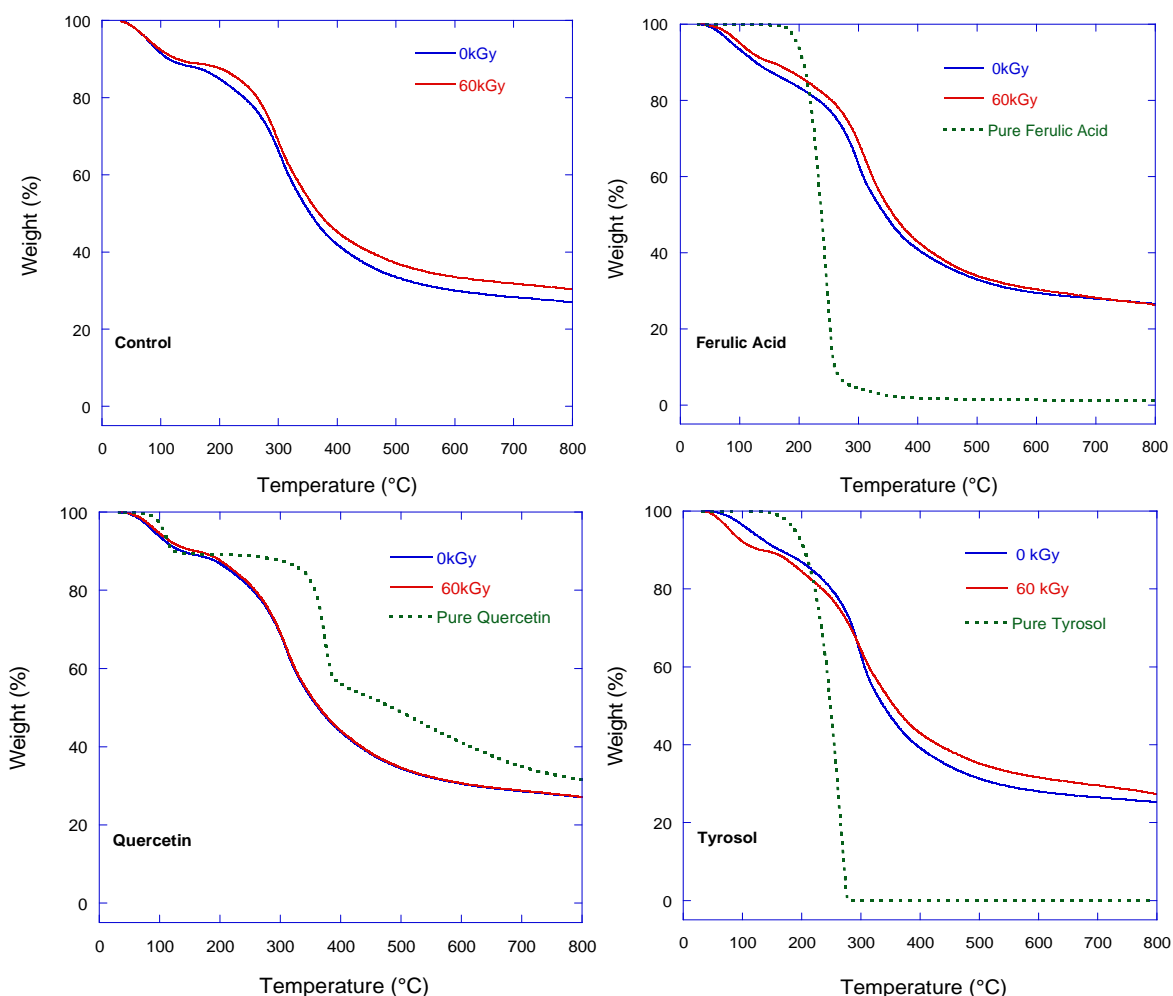


Figure V.1.3(b). TGA thermograms of irradiated and non-irradiated films containing or not antioxidant and TGA thermograms of the pure antioxidants. All films were previously equilibrated at 50% RH and 25°C.

After the irradiation, maximum thermal degradation temperature ($T_{\max 1}$ and $T_{\max 2}$) for control film and film with ferulic acid or quercetin was improved (**Table V.1.3**). This result suggests the apparition of new bonds, thermally more resistant to heat than initial bonds existing before irradiation which enhances the thermal properties. This result is in good agreement with the improvement of oxygen barrier and mechanical properties as previously discussed. A similar result was found by Inamura et al. (2013) in the case of composite gelatin-nut shell fiber after 40 kGy irradiation dose. For film containing tyrosol, improvement of thermal stability after irradiation was only observed only for the second stage of weight loss ($T_{\max 2}$ increase and Δw_2 decrease).

Table V.1.3. Weight loss (Δw), transformation temperature (T_d , T_{max} or T_f) and % of residue from TGA analysis of non-irradiated and irradiated chitosan-fish gelatin film containing antioxidants, measured at 25°C and 50% RH.

Film types	Doses	1st transformation region				2nd transformation region				Residue (%)
		Δw (%)	T_d^a (°C)	T_{max}^b (°C)	T_f^c (°C)	Δw (%)	T_d^a (°C)	T_{max}^b (°C)	T_f^c (°C)	
Control	0 kGy	7.4	57	72	117	53.8	215	296	328	26
	60 kGy	5.2	51	78	120	42.3	221	302	341	30
Ferulic Acid	0 kGy	5.7	59	83	139	45.7	233	301	342	26
	60 kGy	4.1	62	97	143	40.8	239	312	396	26
Quercetin	0 kGy	5.7	64	87	129	41.9	243	314	395	27
	60 kGy	3.1	63	95	130	42.2	244	314	397	27
Tyrosol	0 kGy	5.6	78	126	153	53.9	233	293	323	24
	60 kGy	7.8	50	76	104	46.1	238	300	334	27

^a Onset temperature, ^b Maximum temperature, ^c End temperature.

V.1.3.7. FTIR spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used in order to assess the ability of antioxidants to crosslink chitosan-fish gelatin films under electron beam irradiation. FTIR spectra of irradiated and non-irradiated CS-G blend films incorporating or not antioxidant molecules are presented in **Figure V.1.4**. The spectra of fish gelatin films (data not shown) showed major bands at approximately 3303, 2938, 1653, 1546 and 1243 cm^{-1} , corresponding respectively to amides A, amide B, amide-I, amide-II and amide-III (NurHanani et al., 2013 and Benbettaieb et al., 2014). The amide A (3302 cm^{-1}), amide-I (1653 cm^{-1}) and amide-II (1546 cm^{-1}) peaks of the chitosan film were shifted (about 5 to 9 cm^{-1}) to higher wavenumbers after the addition of gelatin. These spectra could suggest molecular interactions between the two biopolymers. In the case of chitosan films blended with a different proportion of bovine gelatin, Benbettaieb et al. (2014) displayed that amino and carbonyl moieties interact mainly through electrostatic interactions to form a poly-electrolyte-complex at adjusted pH. Some noticeable differences in the relative intensity and position of peaks are observed in the amide groups after the incorporation of antioxidants. The amide A peak of control film at 3302 cm^{-1} shifted to 3286 cm^{-1} with the addition of ferulic acid or quercetin. The same peak was shifted to 3309 cm^{-1} after tyrosol addition. However, amide A band also correspond to band of OH and then, the shifts observed could also attributed to water content changes and water-biopolymer interactions which could affect the network organisation. After quercetin addition, the Amide B (2932 cm^{-1}) and amide-II (1551 cm^{-1}) are shifted to 2927 cm^{-1} and 1559 cm^{-1} , respectively. Amide-I peak shifts from 1648 cm^{-1} to 1643 cm^{-1} after the incorporation of tyrosol. Amide-III peak shifts from 1246 cm^{-1} to 1262 cm^{-1} or 1278 cm^{-1} after the incorporation of quercetin or ferulic acid, respectively. The shifting of amides groups in the blend film with the addition of antioxidants reveals interactions between the amide groups of chitosan and gelatin and ferulic acid, quercetin and tyrosol maybe through their respective hydroxyl groups. A similar result was found by Mathew and Abraham. (2008) in the case of starch-chitosan blend films incorporating ferulic acid. They suggested that the shift in amide-I groups indicates an interaction between the amide groups of chitosan and hydroxyl groups of starch and ferulic acid. Introzzi et al. (2012) worked on pullulan coatings, and from surface analysis using an X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) technique. They showed the existence of new adhesion forces between the polyolefin backbone and the pullulan. Bonding mechanism is observed through the interaction between hydroxyl group of pullulan (polysaccharide) and the COO^- , C=O and NH groups of surface coated activated LDPE. The shift in the amide-I band to a lower wavenumber after tyrosol addition is also in good agreement with that previously reported by Nuthong et al. (2009) on protein based films incorporating glyoxal and caffeic acid. Authors indicated that the oxygenation of the caffeic acid favoured conversion to quinone and then induced protein cross-linking to a high extent as indicated by the shift of amide-I peak. Wu et al. (2013) noticed a shift of the amide A band of to lower wavenumbers in the gelatin film after incorporation of green tea extract, revealing interactions between the NH group of gelatin with OH group from green tea extract (composed on mainly catechines, kaempferol, quercetin, and myricetin) . However, it could also be supposed that the addition of green tea extract may change the OH interaction and water content in films. When the pendant NH group of an aminoacyl is involved in a hydrogen bond, the position is shifted to lower frequencies. After irradiation, some shifts in the position of bands in the region between 3600 and 2800 cm^{-1} (assigned to the ν_{OH} , ν_{NH} and ν_{CH} group) and between 1700 and 1500 cm^{-1} (assigned to the

ν_{CO} and δ_{NH} group) were observed in the all of the studied films. This clearly shows some modifications in the interactions between the polymer chains and/or between the polymer chains and the antioxidants after 60 kGy irradiation. A similar result was reported by Benbettaieb et al. (2015a) in chitosan-gelatin blend film after electron beam irradiation. In the second region of the FTIR spectrum, from 1700 to 1500 cm^{-1} , a shift occurs after 60kGy irradiation for amide II band from 1551 to 1561 cm^{-1} and from 1559 to 1551 cm^{-1} for control films and for films containing quercetin, respectively. A shift for amide I band from 1643 to 1648 cm^{-1} is also noticed for the films incorporating tyrosol.

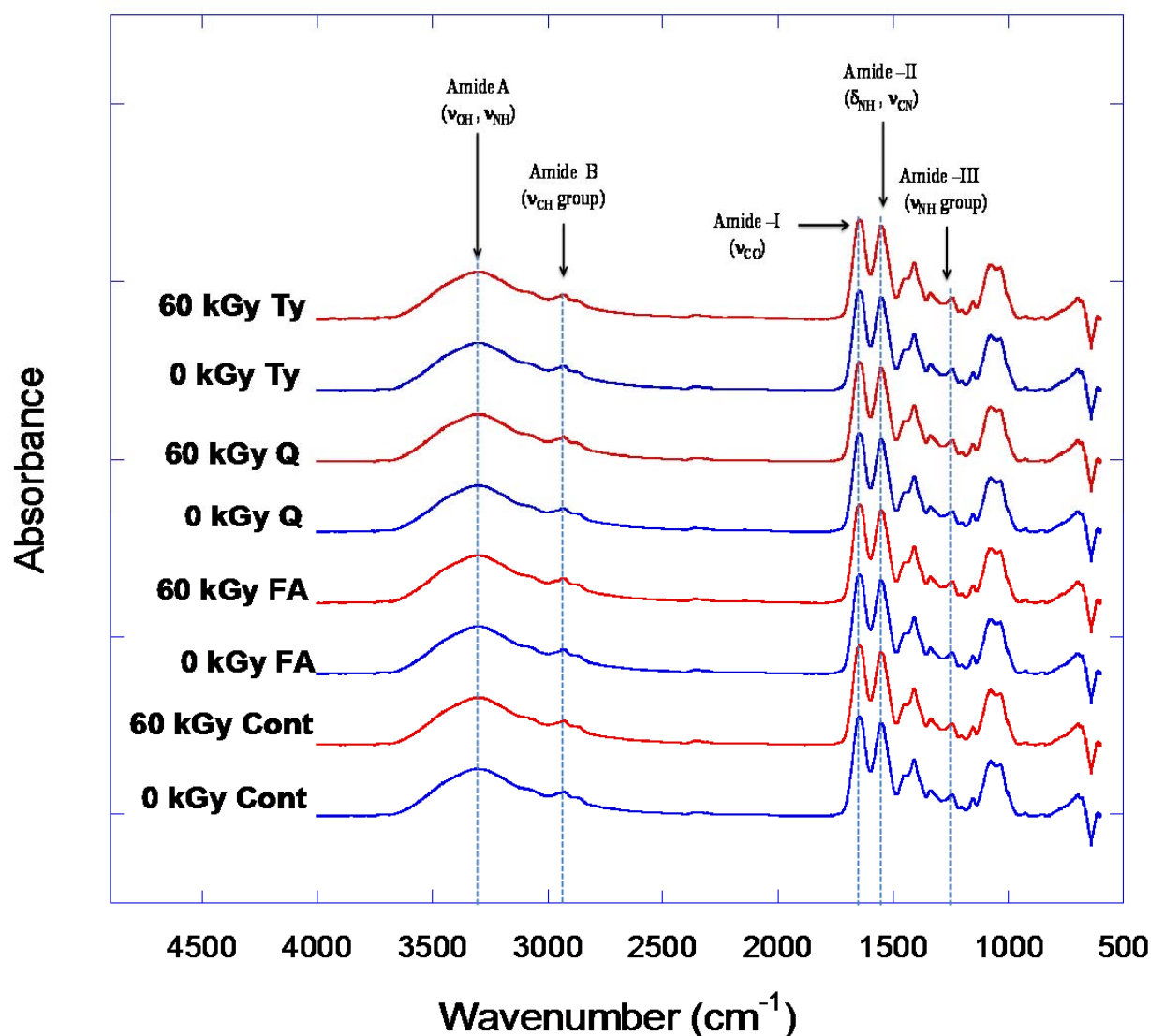


Figure V.1.4. FTIR spectra of non-irradiated and irradiated (60kGy) chitosan-fish gelatin films containing antioxidants (film incorporated with tyrosol: Ty; film incorporated with quercetin: Q and film incorporated with ferulic acid: FA). Control film (without antioxidant) was codified by Cont. All films were equilibrated at 50% RH and 25°C.

The amide I absorption band between 1600 and 1700 cm^{-1} is a useful peak for the IR analysis of the secondary structure of protein like gelatin. Slight shifts in of the amide I bands were also observed from the spectra before and after UV irradiation treatment (Bhat and Karim, 2009). These authors suggested a possible crosslinking occurring in gelatin granules after to UV irradiation. Shift in the absorption bands relative to amide I, amide II, CO, and CN after irradiation are highly in favor new linkage occurring between polymer chains and antioxidants. Electron beam irradiation can create free radicals (hydrogen and hydroxyl radicals) after water radiolysis.

Finally, FTIR experiments allowed to identify the groups involved in the cross linking mechanisms induced by both antioxidant addition and irradiation treatment, and suggested from the macroscopic analyses of functional properties.

V.1.3.8. ACP and overall discussion and conclusions

The correlations between the original data for each variable and each principal component were computed through the Principal Component Analysis (PCA) using XLSTAT. These correlations between the principal components and the original variables helped interpret these principal components. The principal directions, in which different data varies, are represented by mainly three axes (F1, F2 and F3): F1 and F2-axes covers over 65% of the information, and when F3-axis is added, it covers about 80% of total information. The F1-F2 covariance matrix is represented in **Figure V.1.5**. The F1-axis describes especially the effect of the physicochemical properties of antioxidants (Log P, solubility in water (SOL), saturated vapour pressure (SVP), molecular weight (MW), surface tension (ST), melting point (MP) and boiling point (BP)) and therefore their incorporation effect. While F2 and F3 axes are especially attributed to the effect of irradiation treatment (Doses).

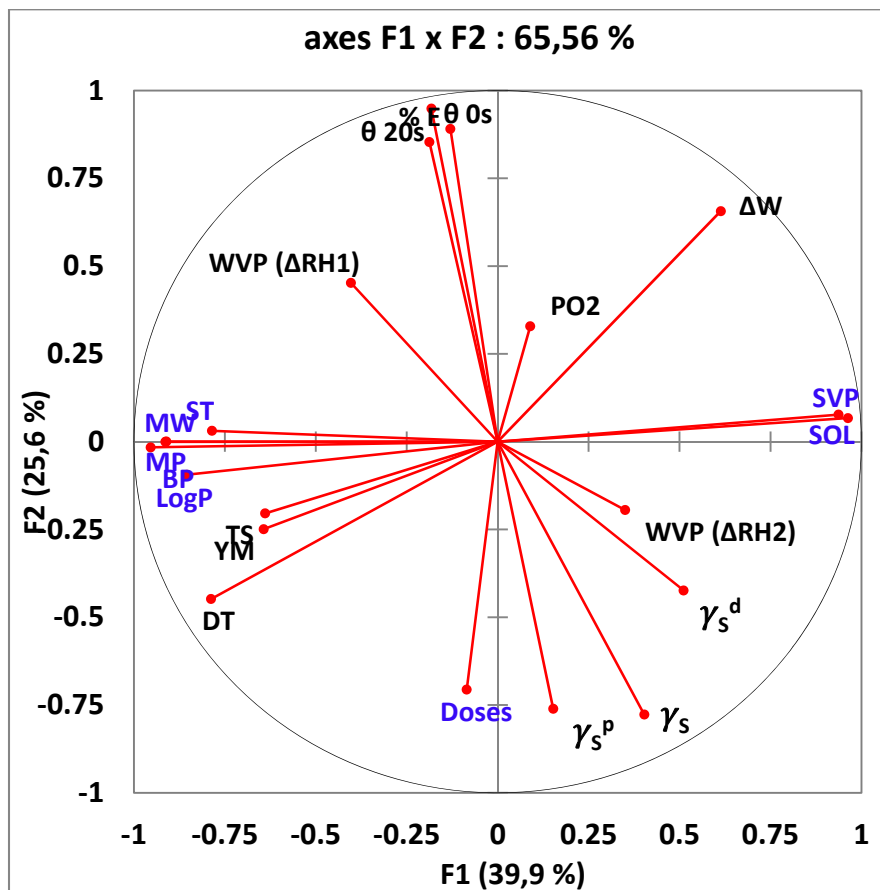


Figure V.1.5. Correlation between factors (in blue) and responses (in black) according to F1x F2 principal components axes. Factors are: irradiation dose (Doses) and physicochemical characteristics of different antioxidants (LogP, SVP: saturated vapour pressure, SOL: solubility, ST: surface tension, MW: molecular weight, MP: melting point, BP: boiling point). Responses (measured parameters) are: ΔW : weight loss (%) and DT: degradation temperature ($^{\circ}C$) determined from the second transformation region, TS: tensile strength, YM: Young's Modulus, %E: elongation at break, γ_s : surface tension, γ_s^p : polar component of surface tension, γ_s^d : dispersive component of surface tension, θ_{0s} and θ_{20s} : contact angle at 0 and 20s, PO2: oxygen permeability measured at 53% RH condition, WVP Δ RH1 and WVP Δ RH2: water vapour permeability measured, respectively, at (0-30)% and (30-85)% RH differentials gradients.

For mechanical properties (%E, YM and TS), we can state that the elongation at break (%E) of the films is inversely dependent on the irradiation dose (represented by F2 and F3 axis), while TS and YM are represented by F1-axis, which means they are more sensitive to the nature of antioxidants incorporated in the film. So, YM and TS of chitosan films are also dependent on their plasticization, thus it is consistent that YM and TS are positioned on opposition to the solubility, but also to the WVP ΔRH_2 corresponding to the permeability measured with a highest RH gradient favoring plasticization

The thermal stability presented by degradation temperature (DT) and weight loss (ΔW) variables is weak or not sensitive to the F2-axis. Thus, it is not affected by the irradiation process. However, DT and ΔW are reduced by the addition of the antioxidants. Indeed, thermal stability is correlated to MP, BP, MW, ST and LogP, and in opposite to soluble and/or hygroscopic antioxidants (oppositely correlated to SOL and SVP).

Dealing with the surface properties and according to their representation on **Figure V.1.5**, it is difficult to interpret because they are not clearly correlated to F1, F2 or F3 axis. Moreover, they display an opposite direction between F2 and F3-axes. Indeed, the surface properties parameters (contact angles at 0 and 20 sec (θ_0 and θ_{20s}), surface tension (γ_S), polar and dispersive components of γ_S (γ_S^p and γ_S^d)) are located on the diagonals. Contact angle (θ) at 0 and 20s varied inversely with the irradiation dose and is very weakly correlated to F2 and F3 axes. The contact angle is thus mainly dependent on the irradiation, rather than the nature of the antioxidants. The surface tension (γ_S , γ_S^p and γ_S^d) is always opposite to the contact angle. The polar component of the surface tension (YSP) of the films is strongly correlated with the irradiation dose, and still inversely correlated with the surface tension (ST) and LogP of antioxidants.

The irradiation treatment weakly affects the permeability. Irradiation increases the water vapour permeability (WVP) and reduces oxygen permeability (PO2). Oxygen permeability is close to the vertical axis (F2 or F3). It is not correlated to the physicochemical properties of antioxidants and therefore to the presence of these active compounds on the films. Inversely, even if the effect of irradiation dose seems to be weak on the water vapor permeability, as the water vapour permeabilities measured at the two RH gradients 0-30% (WVP ΔRH_1) and 30-84% (WVP ΔRH_2) are located on the diagonals of the F1-F2 and F1-F3 diagrams, a synergistic effect of irradiation dose and antioxidants addition seems to occur. We can observe that the effect of irradiation on WVP at low RH gradient (WVP ΔRH_1) is in opposition to that observed for the higher RH gradient (WVP ΔRH_2). This can be explained by the positive effect of the irradiation dose on hydrophilicity of the films surface. The higher the RH values of the RH gradient is, the higher sorption and thus plasticization are.

Finally, this study provides new understanding on the influence of both natural antioxidants and irradiation treatment on the functional properties of chitosan-gelatin edible films. Electron beam irradiation produced free radicals in the form of unpaired electrons, particularly in case of chitosan-gelatin films containing ferulic acid and tyrosol film. FTIR spectra clearly showed that irradiation of all studied films induced shift in the position of bands in the region between 3600 and 2800 cm^{-1} (assigned to the νOH , νNH and νCH group) and between 1700 and 1500 cm^{-1} (assigned to the νCO

and δNH group). This indicated some modifications in the interactions between the polymer chains and/or between the polymer chains and the antioxidants after irradiation that affected the functional properties as displayed by the PCA analysis. This study displays the complementarity between macroscopic and molecular analyses to contribute to new understanding of the role of antioxidants and irradiation on edible films properties and thus applications.

V.1.3.9. Supplementary data: Surface properties and wettability

To estimate the resistance of films to liquid water, the swelling index and swelling rate were also determined from the droplet volume kinetics, along with the contact angle values at the time of deposit (0 s) and at considered metastable equilibrium (20 s) (as previously presented). Results, for all films, are given in **Table V.1.4**. For untreated films, swelling index and swelling rate were null for control film (without antioxidants). These parameters significantly ($p < 0.05$) increase after incorporation of antioxidants. Swelling index of all films increases significantly ($p < 0.05$) after irradiation. Maximum value was observed for film containing ferulic acid. Swelling rate increases also for all the films, but it is significant only for the control films and for the films containing the ferulic acid. These data are coherent with the previous results. Indeed, increasing the swelling index and the swelling rate after both irradiation and/or antioxidant addition also explain the water vapour permeabilities measured for the highest gradient. This behaviour of surface in contact of water is also explained by the increase of surface polarity and orientation of polar groups toward the surface which strongly favoured the water absorption.

Table V.1.4. Swelling index and swelling rate of irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin film with and without antioxidants (Ferulic acid, Quercetin and tyrosol). Measurements were done at room conditions ($\sim 20^\circ\text{C}$, $\sim 50\%RH$).

	Swelling index (%)		Swelling rate ($10^{-3} \mu\text{L/s}$)	
	0 kGy	60 kGy	0 kGy	60 kGy
Control	0 \pm 0a, α	38.67 \pm 14.56b, α	0 \pm 0a, α	70 \pm 15b, α
Ferulic Acid	15.77 \pm 3.71a, β	43.85 \pm 8.10b, $\alpha\beta$	13 \pm 5a, $\alpha \beta$	48 \pm 16b, α
Quercetin	26.04 \pm 2.35a, γ	39.77 \pm 5.97b, α	26 \pm 10a, β	33 \pm 18a, β
Tyrosol	13.30 \pm 8.24a, β	39.98 \pm 5.86b, α	25 \pm 17a, β	50 \pm 13a, α

Values are mean \pm standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$. Means with the same Greek letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

V.2. Effets d'irradiation sur les mécanismes de libération des antioxydants dans des milieux liquides modèles

V.2.1. Comportements de l'acide férulique et du tyrosol

Publication n°5

Controlled release of tyrosol and ferulic acid encapsulated in chitosan-gelatin films after electron beam irradiation

Benbettaïeb,N., Assifaoui,A., Karbowiak,T., Debeaufort,F. & Chambin,O

J. Rad. Phys. Chem., 2015, DOI: 10.1016/j.radphyschem.2015.01.035

Abstract

This work deals with the study of the release kinetics of antioxidants (ferulic acid and tyrosol) incorporated into chitosan-gelatin edible films after irradiation processes. The aim was to determine the influence of electron beam irradiation (at 60kGy) on the retention of antioxidants in the film, their release in water (pH=7) at 25°C, in relation with the barrier and mechanical properties of biopolymer films. The film preparation process coupled to the irradiation induced a loss of about 20% of tyrosol but did not affect the ferulic acid content. However, 27% of the ferulic acid remained entrapped in the biopolymer network during the release experiments whereas all tyrosol was released. Irradiation induced a reduction of the release rate for both compounds, revealing that cross-linking occurred during irradiation. This was confirmed by the mechanical properties enhancement which tensile strength value significantly increased and by the reduction of permeabilities. Although molecular weights, molar volume and molecular radius of the two compounds are very similar, the effective diffusivity of tyrosol was 40 times greater than that of ferulic acid. The much lower effective diffusion coefficient of ferulic acid as determined from the release kinetics was explained by the interactions settled between ferulic acid molecules and the gelatin-chitosan matrix. As expected, the electron beam irradiation allowed modulating the retention and then the release of antioxidants encapsulated.

V.2.1.1. Introduction

Over the past few decades, edible films and coating based on natural biopolymers have received increasing attention as an alternative to synthetic food packaging due to their biodegradable and edibility properties as well as in their use as active packaging (Debeaufort et al., 1998). Chitosan is nontoxic, biodegradable, biofunctional, biocompatible and has intrinsic antimicrobial properties and is able to incorporate active compounds (Jayakumar et al, 2007). In view of these properties, chitosan films have been used as a packaging material for the quality preservation of a variety of foods (Park & Zhao, 2004). Gelatin is one of the multipurpose biomaterial obtained by the controlled hydrolysis of the insoluble fibrous collagen present in the bones and skin generated as waste during animal slaughtering and fish processing and its excellent film forming ability is well-known (Hoque et al, 2011). Gelatin-based film used for coating or packaging could maintain the quality of foods during storage, due to its good barrier to oxygen, light and prevention of dehydration and lipid oxidation (Jongjareonrak et al, 2006). Several properties of gelatin film, such as mechanical properties, permeability, light absorption, transparency, antimicrobial activity and antioxidant ability, can be influenced by the addition of active substances (Pires et al, 2011).

Many investigators have evaluated their possible use as a matrix to obtain bio-packaging materials. In this sense and to make films even more useful, functional edible films that contain active compounds have been developed, to enhance food quality and product shelf-life (Suppakul et al, 2003).

The incorporation of antioxidants in these biodegradable edible polymers is an interesting alternative to food preservation, since oxidation is one of the major problems affecting food quality as well as film biopolymer ageing (Martins et al, 2012). The use of natural, non-toxic antioxidants such as ferulic acid or α -tocopherol to preserve the consumer health is seek (Fabra et al, 2011). Several studies have focused on the use of these natural antioxidants in plastic films such as high-density (HDPE) or low-density (LDPE) polyethylene (Wessling et al, 2000). However, little information exists about the influence of such natural antioxidants in biodegradable films (Cao et al, 2007; Mathew & Abraham, 2008; Ou et al., 2005). So we were interested in encapsulating these natural compounds into chitosan-gelatin blend edible films. Very little studies have established the effects of polymers structure, in particular chitosan-gelatin films, on the retention and release properties of the added antioxidant compounds (Papadokostaki et al, 1997). Heat and gamma-irradiation have been shown to produce cross-linking and to improve the physical and functional properties of edible coatings via the production of cross-links between protein molecules (Vachon et al, 2000). It can be hypothesized that structure modifications induced by irradiation could increase the capacity of cross-linked edible films to control the release of embedded active compounds.

The objectives of this study were to investigate the effects of electron beam irradiation on the structure of chitosan-gelatin films containing ferulic acid or tyrosol and to study the release behaviour, in liquid medium, of these antioxidants compound entrapped in chitosan-gelatin films.

V.2.1.2. Materials and methods

See Chapter II

V.2.1.3. Results and discussion

V.2.1.3.1. Water barrier and mechanical properties

The WVP of non-irradiated and irradiated films with and without antioxidants for a RH gradient of 0-30 % are given in **Table V.2.1**. Non-irradiated films containing the active molecules showed higher water vapour barrier properties than control films (non-irradiated, without antioxidant) ($2.9 \pm 0.1 \times 10^{-12}$ and $2.8 \pm 0.2 \times 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ for films with ferulic acid and tyrosol, respectively, against $5.2 \pm 0.9 \times 10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$ for the control film). Mechanical properties, of irradiated and control films with or without antioxidants are given in **Table V.2.1**. TS and YM of control film were $25.9 \pm 3.9 \text{ MPa}$ and $1524 \pm 267 \text{ MPa}$, respectively. These values are in accordance with those reported by Benbettaieb et al. (2015a). Compared to the control film, TS values increased by 45 and 12% after incorporation of ferulic acid and tyrosol, respectively. But this increase was only significant ($p < 0.05$) for ferulic acid. Such enhancement of water barrier as well as mechanical properties after antioxidant addition was in favor of a formation of a more stable network. This could be due to cross-linking. Similar results were reported by Mathew and Abraham. (2008) in the case of ferulic acid incorporated in chitosan/starch blend film. They attributed the increase in TS to the redundant hydroxyl groups, which may interact with similar hydroxyl groups and reduce the attractive force between polymer chains. Moreover, such increase in tensile strength was also observed for gelatin-soy protein films (Cao et al., 2007a) and for soy protein films (Ou et al., 2005) in which ferulic acid and tannin acid were added. Moreover, chitosan might interact with phenolic compounds such as ferulic acid, mainly by weak interactions such as hydrogen bonding. Hydroxyl groups of phenolics could form H-bonds with NH_3^+ of chitosan (Kanatt, et al., 2008). Moreover, the amino groups probably also contributed to ionic interactions with carboxylic groups of acid phenols (Spagna et al., 1996). Mueller-Harvey et al. (1986) showed that ferulic acid is covalently linked to polysaccharides by ester bonds. Ferulic acid can cross-link with proteins and polysaccharides by producing a resonance-stabilized free radical intermediate (Hopkins et al., 2003; Oudgenoeg et al., 2001). Ou et al. (2005) suggested that ferulic acid could act as a satisfactory cross-linking agent in the preparation of protein-based edible films. These new linkage occurring between polymers chains and antioxidant could therefore affect the release of this compound from the film into the water medium.

After irradiation, no significant modification ($p < 0.05$) of the WVP is observed, whatever the films. Similar result was previously reported by Benbettaieb et al. (2015a) in the case of chitosan-fish gelatin blend film after electron beam irradiation and for the same RH difference. TS remained unchanged in the case of films containing tyrosol or ferulic acid. The increase of mechanical resistance after irradiation, could suggest that cross-linking reaction occurred between this compound and polymer chains under irradiation. Indeed, ferulic acid can enhance the cross-linking between polysaccharide and protein chains, mediated by irradiation treatment, through several mechanisms: through free radical mediated cross-linking, by esterification with ferulic acid with the hydroxyl groups of chitosan and gelatin or by quinone-mediated reactions (Ou et al., 2005). Hatfield et al. (1999) reported that polysaccharide-polysaccharide cross-linking can also be mediated through the radical dimerization of ferulates.

Table V.2.1. Physical properties of films containing either tyrosol or ferulic acid according to the irradiation dose: WVP, Water Vapour Permeability; TS, Tensile Strength; YM, Young's Modulus.

		Control film (0 kGy)	Irradiated film (60 kGy)
WVP ($10^{-12} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$) 0-30% RH	Control	5.22±0.91 ^{aα}	5.61±0.26 ^{aα}
	Ferulic Acid	2.98±0.13 ^{aβ}	3.06±0.11 ^{aβ}
	Tyrosol	2.83±0.17 ^{aβ}	2.87±0.14 ^{aβ}
TS (MPa)	Control	25.89±3.92 ^{aα}	39.20±8.32 ^{aα}
	Ferulic Acid	37.11±2.08 ^{aβ}	36.6±4.88 ^{aα}
	Tyrosol	29.28±3.69 ^{aαβ}	22.28±3.26 ^{aβ}
YM (MPa)	Control	1523.6±266.71 ^{aα}	1270.3±23.09 ^{aα}
	Ferulic Acid	1370±64.58 ^{aα}	1828.66±182.61 ^{bβ}
	Tyrosol	640±167.95 ^{aβ}	1001.63±92.22 ^{bα}

Values are mean ± standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$. Means with the same Greek letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

V.2.1.3.2. Release of ferulic acid or tyrosol from films into the water medium

Experimental and theoretical values of the amount of antioxidant (mg/g of film) in the films prior to the release experiments are summarized in **Table V.2.2**. The amount of ferulic acid in the films determined after complete dissolution in acetic acid solution remained similar to the theoretical value. On the contrary, the amount of tyrosol in the film was significantly 20% lower. This could be attributed either to strong physical entrapment or chemical interactions (possibly covalent binding) of this antioxidant with the chitosan-gelatin matrix. This could also be due to some degradation due to the solution heating or chemical reactions during the film formation process or during the film storage. Therefore, only the experimental concentrations over time were considered for the study of the release.

The content of ferulic acid remaining in the film after release (11.1±0.5 mg/g of film) was much greater than that of tyrosol (not significantly measurable amount) for the non-irradiated films. It corresponded to a percentage of 27.5±1.2% of ferulic acid retention (content of ferulic acid remaining in film at equilibrium reported to the initial content) in the film after release. This high value could be explained by the higher ability of ferulic acid to establish interactions with the polymers network, and therefore to induce cross-linking as suggested by the improvement in mechanical and permeability properties. This release kinetics results were indeed in good agreement with the higher values observed for tensile strength and Young's modulus for film containing ferulic acid as well as the slight decrease in water vapour permeability. Cross-linking could be increased via bonding between reactive site in ferulic acid with tyrosine and other amino acids from gelatin,

Résultats et discussion. Chapitre V

through a free radical mechanism, or esterification with hydroxyl amino acids, such as serine. Ou et al. (2005) supposed the same mechanisms in the case of ferulic acid with soy protein as previously discussed from mechanical and water barrier properties. On the opposite, tyrosol has less accessible site that could interact with the polymer matrix and it was then easily released.

After 60 kGy irradiation dose, the content of ferulic acid remaining in the film after release significantly ($p < 0.05$) increased from 11.1 ± 0.5 to 16.9 ± 0.4 mg/g of film. This corresponds to a ferulic acid retention in the film which increased from 27.5 ± 1.2 to $33.6 \pm 0.8\%$. However, there was no significant change in the case of tyrosol. The increase of the ferulic acid content remaining in the film after release process for irradiated samples could be explained by the cross-linking reactions occurring between this antioxidant and the polymer chains once free radical are generated during the irradiation process. This could therefore modify the film structure and delay the release.

Table V.2.2. Kinetic release parameters of ferulic acid and tyrosol from film (control and irradiated) to liquid medium (distilled water) at pH 7 under stirring.

		Control film (0 kGy)	Irradiated film (60 kGy)
Theoretical content of antioxidant in film (mg/g of film)		47.1±4.7	
Content of antioxidant in film prior to release (mg/g of film)	Ferulic Acid	40.3±4.8 ^a	50.3±2.9 ^b
	Tyrosol	36.5±1.5 ^a	38.7±0.7 ^a
Content of antioxidant remaining in the film after release (mg/g of film)	Ferulic Acid	11.1±0.5 ^{αα}	16.9±0.4 ^{βα}
	Tyrosol	1.7±2.2 ^{αβ}	0** ^{αβ}
% of antioxidant remaining in the film after release at equilibrium (mg/g of film)	Ferulic Acid	27.5±1.2 ^{αα}	33.6±0.8 ^{αα}
	Tyrosol	4.7±6.1 ^{αβ}	0 ^{αβ}
Diffusion coefficient (10^{-12} m ² /s)	Ferulic Acid	1.68±0.37 ^{αα}	1.49±0.37 ^{αα}
	Tyrosol	67.0±10.3 ^{αβ}	39.3±7.95 ^{ββ}

Values are mean ± standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$. Means with the same Greek letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

** Value below the detection limit

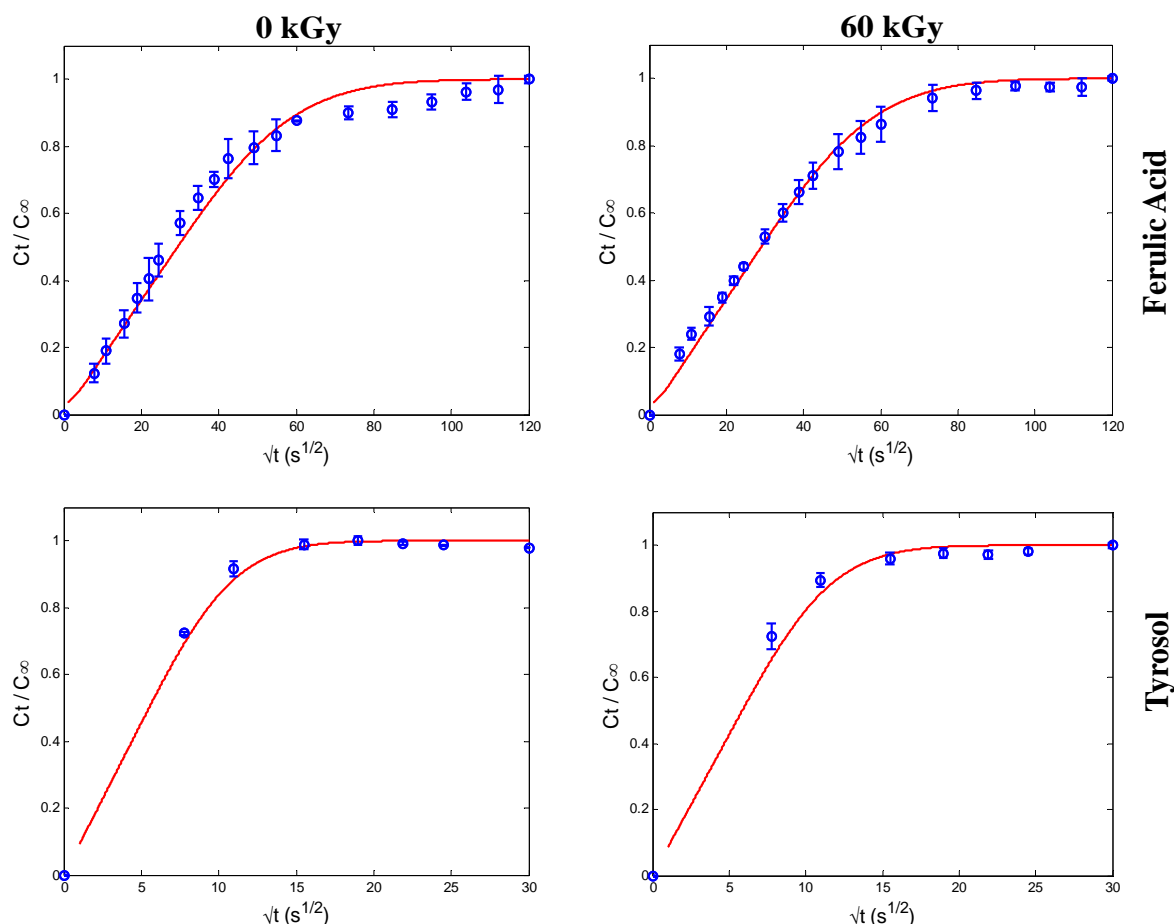


Figure V.2.1. Release kinetics of ferulic acid and tyrosol in water medium at pH=7 and 25°C, from control (0kGy) and irradiated (60kGy) chitosan-fish gelatin films. Ct: concentration of the antioxidant released in the aqueous dissolution medium at time t; C_{∞} : the maximum concentration of the antioxidant released. Symbols are experimental values (mean+standard deviation) and lines correspond to data modeling using the analytical solution of the second Fick's law (Crank, 1975).

The release kinetics of ferulic acid and tyrosol from chitosan-gelatin based films (non-irradiated and irradiated at 60kGy) in water medium (at pH=7) are given in **Figure V.2.1**.

Release kinetics of both ferulic acid and tyrosol exhibited the typical shape of non time-dependent and non concentration-dependent diffusion. However, the release of tyrosol from the films was faster than that observed for ferulic acid. The release of tyrosol was achieved between 8 and 12 min, whereas the release kinetic of ferulic acid required 10 more time than for tyrosol.

The effective diffusion coefficients (D) of the antioxidants in the films were estimated from the release kinetics by fitting experimental modeling data using the analytical solution of the second Fick's law (Crank, 1975). They are given in **Table V.2.2**. The D is related to the molecular mobility within the polymeric network and could be related to several factors such as molecular weight, structural characteristics of the matrix and solubility of antioxidants. We considered here that the partition coefficient did not affect the transfer as the concentrations involved are always much lower than the solubility limit of the tyrosol and ferulic acid in water media. As it can be observed, D values for tyrosol ($67 \pm 10.3 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$) were 40 times higher compared to those for ferulic acid ($1.68 \pm 0.37 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$). Nor the molecular weight, nor the molar volume, nor the solubility could explain such difference in diffusivity. Higher release rate and diffusion coefficient (D) were observed for

tyrosol compared to ferulic acid. Considering that the antioxidants delivery is also governed by specific dipole-dipole interactions and hydrogen bonds between water molecules and the ions present in the solution, the lower rate of release and the lower diffusion coefficient observed for ferulic acid can be explained by the higher ability of this compound to establish interactions with the polymers (and less interaction with water). As ferulic acid is negatively charged, it can interact with the positively charged amino group of chitosan. Chitosan might interact with phenolic ring of ferulic acid, mainly by weak interactions such as hydrogen bonding. Moreover, the amino groups probably also contributed to ionic interactions with carboxylic groups of acid phenols (Spagna et al., 1996). In addition, the release of the antioxidant from the films might also be related to the film microstructure densification by cross-linking or grafting (Berger et al., 2004).

After irradiation (at 60kGy), the effective diffusion coefficient of tyrosol significantly decreased ($p < 0.05$) from $67 \pm 10.3 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ to $39.3 \pm 7.95 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. No significant effect was observed for ferulic acid for which the diffusivity is mainly governed by chemical interactions with the polymer. Tyrosol is only sterically entrapped by the network. Thus, irradiation allows the modulation of this physical trapping and slowed down the release of tyrosol. Lacroix et al. (2002) showed that gamma-irradiation was efficient for inducing cross-links in calcium caseinate edible films and thus can be used to immobilize enzyme or active compounds. Lee and Rosenberg. (1999) showed the ability of glutaraldehyde to cross-link and to reduce the release rate of theophylline from whey protein-based microcapsules in water media.

V.2.2. Comportement de la quercétine

Publication n° 6

Release behavior of quercetine encapsulated in chitosan-fish gelatin edible films irradiated by electron beam.

Benbettaïeb, N., Karbowskiak, T., Chambin O. & Debeaufort, F

In preparation for J. Agric. Food Chem., (short communication)

Résultats et discussion. Chapitre V

The release of quercetin from chitosan-gelatin films (control and irradiated at 40 and 60kGy) into ethanol solution (30% v:v) were determined at last three months after film irradiation. All parameters are summarized in **Table V.2.3**.

Table V.2.3. Kinetic release parameters of quercetin from films (control and irradiated) into liquid medium (30% v:v of ethanol at 96° GL) under stirring.

	Control film (0 kGy)	Irradiated film (40 kGy)	Irradiated film (60 kGy)
Theoretical content of quercetin in film prior to release (mg/g of film)		47.1±4.7	
Content (<i>and</i> %) of quercetin remaining in the film after release (mg/g of film)	6.63±1.61 ^a (23.43±5.72 ^a)	9.5±0.6 ^b (33.61±2.09 ^b)	8.33±0.65 ^{a,b} (29.45±2.33 ^{a,b})
Diffusion coefficient (10 ⁻¹³ m ² /s)	2.06±0.31 ^a	1.71±0.08 ^{a,b}	1.49±0.28 ^b

Values are mean ± standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at p<0.05.

The content of quercetin remaining in the film after release increased from 6.63±1.61 to 9.5±0.6 and to 8.33 ±0.65 mg/g of film, respectively after 40 and 60kGy irradiation dose. Observed increase could be explained by the interactions occurring between polymer chains and this antioxidant during the irradiation process. This could therefore change the film structure organisation and the release mechanisms of antioxidant from the film. Furthermore, the effective diffusion coefficients (D) of the quercetin in the films were estimated from the release kinetics by fitting (**Figure V.2.2**) experimental data modeling using the analytical solution of the second Fick's law (Crank, 1975) and are given in **Table V.2.3**.

As it can be observed, the effective diffusion coefficient of quercetin decreases from 2.06±0.31 to 1.71±0.08 and to 1.49 ±0.28x10⁻¹³m².s⁻¹ respectively after 40 and 60kGy irradiation doses, but decrease is only significant (p<0.05) after 60kGy. This is in agreement with the increase of the quercetin content remaining in the film, after release, with the increasing of the irradiation dose. The observed decrease of diffusion coefficient could be related to the irradiation treatment which limits the mobility of quercetin and therefore reduces the diffusivity of the quercetin in the films. Tin Wui et al. (2002), worked on the influence of microwave irradiation on the drug release properties of polysaccharides beads, showed that the release-retarding property of alginate and alginate–chitosan beads was significantly enhanced by subjecting the beads to microwave irradiation. Irradiation could favor the interaction between quercetin and biopolymer via free radical mediated mechanism. Hence quercetin is more linked, consequently more protected and less mobile. This result is in agreement with the enhancement of mechanicals, barrier and thermal properties of films containing quercetin after irradiation as previously presented (Part V.1). Therefore, the release kinetic of quercetin is delayed after irradiation.

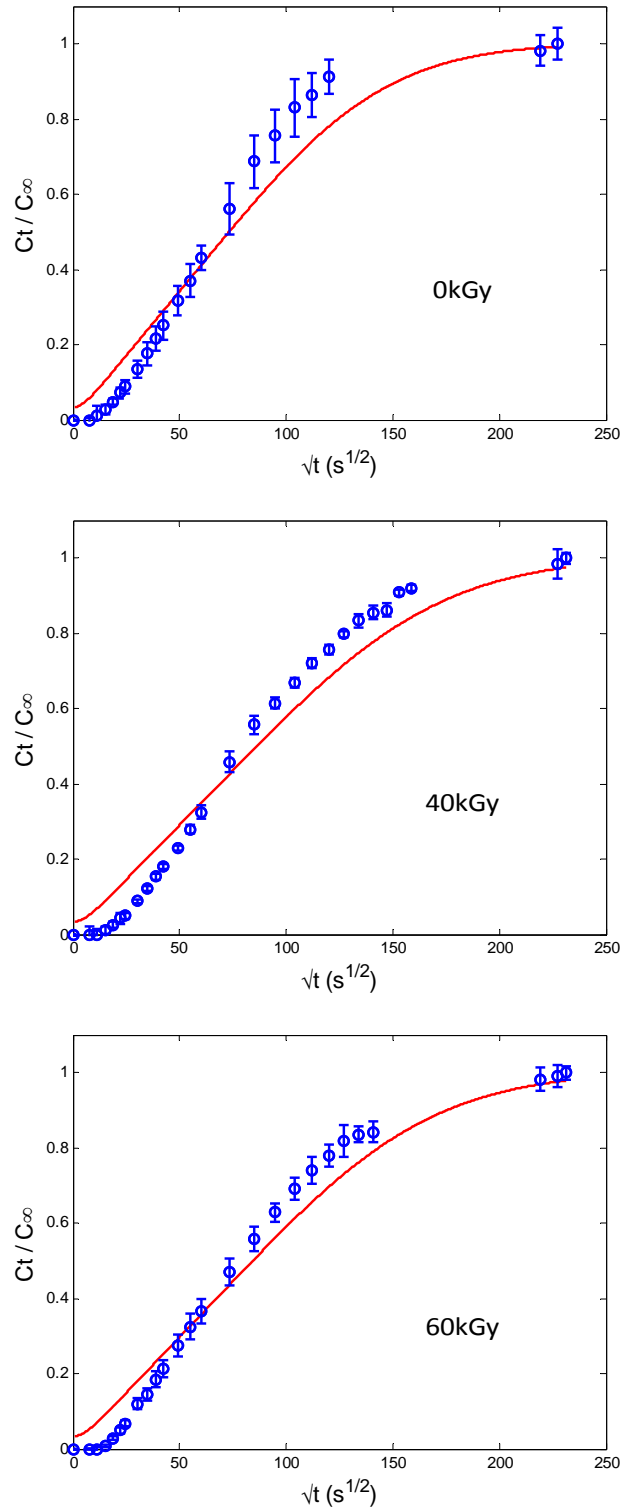


Figure V.2.2. Release kinetics of quercetin in aqueous 30% ethanol (96° GL) solution in stirring medium at 25°C, from control (0kGy) and irradiated (40 and 60kGy) chitosan-fish gelatin films. C_t : concentration of the quercetin released in the aqueous dissolution medium at time t ; C_∞ : the maximum concentration of the quercetin released. Symbols are experimental values (mean+standard deviation) and lines correspond to data modeling using the analytical solution of the second Fick's law (Crank, 1975).

Conclusions

This work aimed at studying the release kinetics of ferulic acid, quercetine and tyrosol from chitosan-gelatin edible films in relation to other physical properties and the effect of electron beam irradiation. For non-irradiated films, the amount of ferulic acid remaining in the film after release was higher than those of tyrosol and quercetin. This could be explained by the higher ability of ferulic acid to make some interactions with the polymers network and therefore to increase the cross-linking density and inversely to decrease the mobility (diffusivity) of this antioxidant from the film to liquid medium. This result is in good agreement with the higher values observed for tensile strength and Young's modulus for the films containing ferulic acid, which confirmed the cross-linking of the network induced by both the ferulic acid presence and the irradiation process. However, weak modification of mechanical or permeability properties was observed in the case of tyrosol addition; only the irradiation allowed to reduce by two times the rate of release. The effective diffusion coefficient of tyrosol was however 40 times much higher than ferulic acid, mainly due to the absence of interactions between the tyrosol and the biopolymer network, leading to a mobility essentially driven by the steric hindrance. We did not compare the quercetin release behavior to that of ferulic acid or tyrosol as the medium used was different. This study showed that, for compounds displaying similar molar volume, molecular weight, molecular size and hydrophobicity, the release rate could vary strongly by controlling the conditions of film making process (irradiation) and the chemical interactions between species.

**Chapitre VI. Influence de l'incorporation
de la coumarine sur les propriétés des
films et sur sa libération après irradiation.**

Chapitre VI. Influence de l'incorporation de la coumarine sur les propriétés des films et sur sa libération après irradiation

Publication n°7

Release of coumarin encapsulated in chitosan-gelatin irradiated films

Benbettaïeb,N., Assifaoui,A., Chambin,O., Karbowiak,T. & Debeaufort, F

J. Food Hydrocoll., submitted

Abstract

Chitosan and fish gelatin, by-products from marine industry, were used to prepare active biobased films containing an antioxidant (coumarin). After drying, the films were treated at 40 and 60kGy irradiation doses by electron beam accelerator. This treatment aims to investigate the effect of irradiation on the film properties as well as on the release kinetic of the antioxidant in water medium. Electron Spin Resonance (ESR) unravelled free radical formation during irradiation in films containing coumarin. After antioxidant addition and/or irradiation treatment, only a shift of amide A, and amide B peak was observed for all the films, and a shift of amide II band for the control film after 60kGy irradiation dose. Irradiation allowed to improve the thermal stability of the films. Both addition of coumarin and irradiation increased the surface wettability (polar component of the surface tension increased and swelling occurred). From the water barrier analysis, neither irradiation nor coumarin addition influenced the permeability at the lower RH gradient used (0-30% RH). Using the higher RH gradient (30-84%) induced a rise of the WVP of all films (containing or not coumarin) after irradiation treatment. At 60kGy, the tensile strength of only the control films varied significantly. Finally, functional and structural properties are weakly affected but it is enough to modify the release kinetics of the antioxidant into aqueous medium. Indeed, irradiation allowed to reduce twice the apparent diffusion coefficient. Irradiation also allowed to better protect the encapsulated antioxidant. Indeed, the amount of coumarin in the non-irradiated film was significantly lower than the theoretical value calculated from the film recipe and that of the irradiated films. This is probably due to oxidation during storage.

VI.1. Introduction

Maintaining food quality, improving safety, and reducing storage losses waste are key objectives of a sustainable food system. Nowadays, the modern food industry is facing new challenges one of which being related to the food packaging to extend shelf life. Currently, a great number of research works are focused on the use of bio-based films with good water and oxygen barrier properties to protect food (Fabra et al., 2011). Since the consumer demand has shifted to safe materials, especially from renewable agriculture by-products and food processing industry wastes (Tharanathan, 2003), natural polymers (proteins, polysaccharides) are the main components of edible films (Gontard & Guilbert, 1994). They are considered as active packaging when they incorporate active compounds, such as antimicrobials, preservatives or antioxidants, which allow to improve food quality and safety (Han, 2002). Chitosan is a natural polymer from fish industry waste obtained by the deacetylation of chitin. It is a nontoxic material, biocompatible, and biodegradable that manifests antibacterial properties. In acidic environment the amino groups are protonated and their positive charges can interact with polyanions such as alginate, carrageenan, gelatin, etc. forming polyelectrolyte complexes (PEC) increasingly used in the encapsulation of various biocomponents. Due to these characteristics, chitosan has been widely used for the production of edible films as well as bio-compatible polymeric materials (Aider, 2010; Rivero et al., 2010). Gelatin is another widely used bio-based material obtained by the controlled hydrolysis of the insoluble fibrous collagen present in the bones and skin generated as waste during animal slaughtering and fish processing. Its excellent film forming ability is well-known (Hoque et al, 2011). Gelatin-based films are used for coating or packaging in order to maintain the quality of foods during storage, due to its good barrier to oxygen, light and prevention of dehydration and lipid oxidation (Jongjareonrak et al, 2006). Most research on gelatin film has focused on gelatin derived from mammalian sources such as bovine and porcine. Recently, there has been more interest in using fish as alternative sources of gelatin, due to religious considerations or fear of bovine spongiform encephalopathy (Pérez-Mateos et al., 2009).

Chitosan and gelatin have been shown to be compatible due to the ability to associate through electrostatic and hydrogen bonding. Specifically, when chitosan is positively charged and gelatin is negatively charged under appropriate conditions of pH. This is particularly important to improve the final network properties as compared to those obtained from the pure polymers (Benbettaieb et al., 2015a). Thus, many investigations focused on their possible use as a matrix to obtain bio-packaging materials. In this sense and to make films even more useful, functional edible films that contain active compounds have been developed, to enhance food quality and product shelf-life (Suppakul et al, 2003). The incorporation of antioxidants in these biodegradable and edible polymers is an interesting alternative to food preservation, since oxidation is one of the major problems affecting food quality as well as film biopolymer stability during ageing (Martins et al, 2012). The use of natural, non-toxic antioxidants such as ferulic acid or α -tocopherol to preserve the consumer health has been investigated (Fabra et al, 2011). Several researchers have previously reported on the potential benefits of using naturals antimicrobials and antioxidants compounds in edible and bio-based films for extending food shelf life (Oussalah et al., 2004; Ouattara et al., 2000). However, little information exists about the influence of these compounds on films structural and physicochemical properties.

Recently, Tammineni et al.(2014) reported that mechanical and barrier properties of bovine gelatin films were improved after tannic acid incorporation. Furthermore, crosslinking bovine gelatin films with tannic acid results in reduction of film solubility by about 80% (Zhang et al., 2010). Kavoosi et al. (2014) studied antioxidant and antibacterial activity of gelatin films incorporated with *Zataria multiflora* essential oil (2 to 8% w/w of gelatin). They reported that beside their excellent antibacterial properties against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, bioactive films have new functional properties. Peng and Li. (2014) demonstrated that water vapour permeability of chitosan films decrease while the tensile strength inversely increases when essentials oils are incorporated. Therefore, we were interested in encapsulating these natural compounds into chitosan-gelatin blend edible films. Moreover, physical methods including dehydrothermal treatment, ultraviolet, heat and gamma irradiation (Bigi et al., 1998) help to modify the polymeric network through the cross-linking of the polymer chains and also help to improve the functionality of polysaccharide (Sabato et al., 2000) or protein (Vachon et al., 2000) based films. Indeed, irradiation treatments have been described to enhance water barrier and mechanical properties of protein-polysaccharides complexes (Lacroix et al., 2002; Lee et al., 2004; Jo et al., 2005; Inamura et al., 2013). The structural modifications induced by irradiation could increase the capacity of cross-linked edible films to control the release of embedded active compounds. In the current literature there is a lack of detailed studies dealing with the effects of polymers structure, in particular chitosan-gelatin films, on the retention and release properties of the added antioxidant compounds (Papadokostaki et al, 1997). Very few studies have been published on the impact of irradiation on the release of active compounds from natural biopolymers. Indeed, Tin Wui et al. (2002) showed that the release-retarding property of alginate and alginate–chitosan beads is significantly enhanced after the beads irradiated by microwave. In the same way, Lacroix et al. (2002) displayed that gamma-irradiation induces cross-links in calcium caseinate edible films and thus allows a better control of enzyme and active compounds release. Previous works displayed that ferulic acid, quercetin or tyrosol addition affected differently the functional properties of gelatin-chitosan films according the irradiation dose (Benbettaieb et al, 2015b).Irradiation accentuated the wettability and the hydrophilicity of the film containing antioxidants whereas oxygen barrier and thermal stability were enhanced. The aim of this study is to further investigate the effect of coumarin addition and electron beam irradiation on the mechanical, thermal, barrier and structural properties of chitosan-fish gelatin edible films. The effect of irradiation on the coumarin release in liquid medium was also investigated.

VI.2. Materials and methods

See Chapter II

VI.3. Results and discussion

VI.3.1. How irradiation and coumarin addition influence chemical and structural organisation of biopolymer-blend network

VI.3.1.1. Free radical generation

As an appropriate procedure to examine the generation of free radicals in a polymers structure, electron spin resonance (ESR) emerges as a powerful tool for detection and identification. The ESR spectra of chitosan-gelatin blend film incorporated with coumarin before and after irradiation (60kGy) are displayed in **Figure VI.1**.

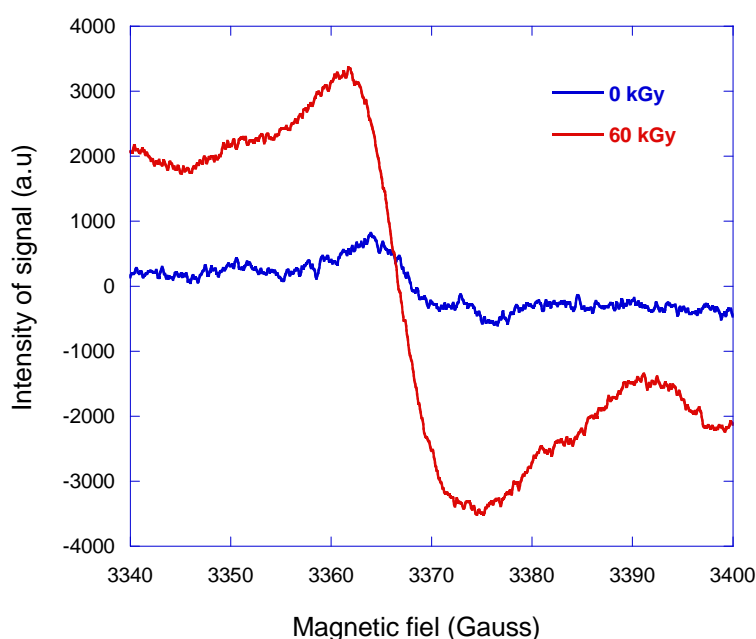


Figure IV.1: ESR spectra of chitosan-fish gelatin films incorporated with coumarin and irradiated at 60kGy at the dose rate of 300Gy/sec. Measurements were performed at 25°C and 50% RH, 3 months after irradiation.

A very weak ESR signal is detected, at 3365 G, in the case of non-irradiated films. Contrarily, irradiated film displays an important peak at the same position, which suggests that irradiation already includes radical species. This peak intensity remains even after 3 months of storage. For chitosan-gelatin film without coumarin, Benbettaieb et al. (2015a) founded that irradiated films displayed one peak, but at 3500G, and the peak intensity increases with the increasing of irradiation dose. The analysis of peak to peak amplitude between film containing or not coumarin show that after irradiation at 60kGy, the peak amplitude is 2 and 5 time much higher than non-irradiated films, respectively for control film (without coumarin) and for film incorporated coumarin. The detection of free radicals generated within the films may contribute to clarifying the role of these reactive spices to initiates the reaction sequences yielded to change the chemical and structural organisation of the biopolymer-blend network. It is expected that this new organisations and arrangements in the

chemical structure after irradiation, can help and favour the linkage between the biopolymers chains or between the biopolymers chains and the active compound. Hydroxyl-coumarin obtained after hydroxylation reaction by OH radical produced from water radiolysis could react with polysaccharide and protein network. As coumarin is a phenolic substance made of fused benzene and alpha pyrone ring. Their phenolic groups can be easily converted to quinone in presence of peroxide radicals (produced by irradiation), via quinone-mediated reactions. In addition to providing a source of stable free radicals, quinones are known to complex irreversibly with nucleophilic amino acids in protein. The reaction mechanism involves an initial oxidization of phenolic structures to quinones, which can readily react with nucleophiles from reactive amino acid groups in protein: sulfhydryl group in cys, amino group of lys and arg, amide group from asp and glu, indole ring of trp and imidazole ring from his (Zhang et al., 2010). This tends to be confirmed as our films gain a yellowish colour after irradiation. Sahu et al. (2009) showed the efficiency of microwave irradiation for the oxidation of phenol to quinone after free radicals generation in the presence of hydrogen peroxide. Furthermore, the amino acid residues in proteins are highly susceptible to oxidation by reactive oxidative species (ROS) that are formed during exposure to irradiation (Stadtman and Levine, 2003). Intra- or inter-protein interactions occur by several different mechanisms, including essentially direct interaction of two carbon-centered radicals and two tyrosine radicals and/or interaction of carbonyl groups of oxidized proteins with the primary amino groups of lysine residues in the same protein or from another protein. This could induce an improvement of functional properties of final network. Casimiro et al. (2010) showed that, in acidic medium, NH_2 groups (from deacetylated units) of chitosan are able to be involved in some interactions during irradiation. Knowing free radicals are present after irradiation, and they are very reactive; this would probably undergo sequences of reaction within and between polymers chains and antioxidant and could affect structural properties of the final network which must be verified by other techniques.

VI.3.1.2. FTIR spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used in order to assess the possibility of interactions and the nature of linkage between polysaccharides-protein network and coumarin under irradiation. FTIR spectra of irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin blend films incorporating or not coumarin are presented in **Figure VI.2**. The spectra of non-irradiated control film showed major peaks at 3303, 2932, 1648, 1551 and 1246 cm^{-1} , corresponding respectively to band between: 3300-3360 cm^{-1} , assigned to ν_{OH} stretch, free water and ν_{NH} stretch of amide A, 2915-2935 cm^{-1} , assigned to ν_{CH} asymmetric/symmetric stretch and amide B, 1550-1680 cm^{-1} , assigned to C=C and C=O stretch, primary and secondary amine NH band of amide I, 1550-1610 cm^{-1} , assigned to δNH of amide II and 1240-1340 cm^{-1} , assigned to aromatic primary amine, CN stretch of amide III (Coates, 2000; Benbettaieb et al., 2015a). The peak observed in 1034 cm^{-1} is related to possible interactions arising between plasticizer (OH group of glycerol) and polymer structure via hydrogen bonds (Cerqueira et al, 2012).

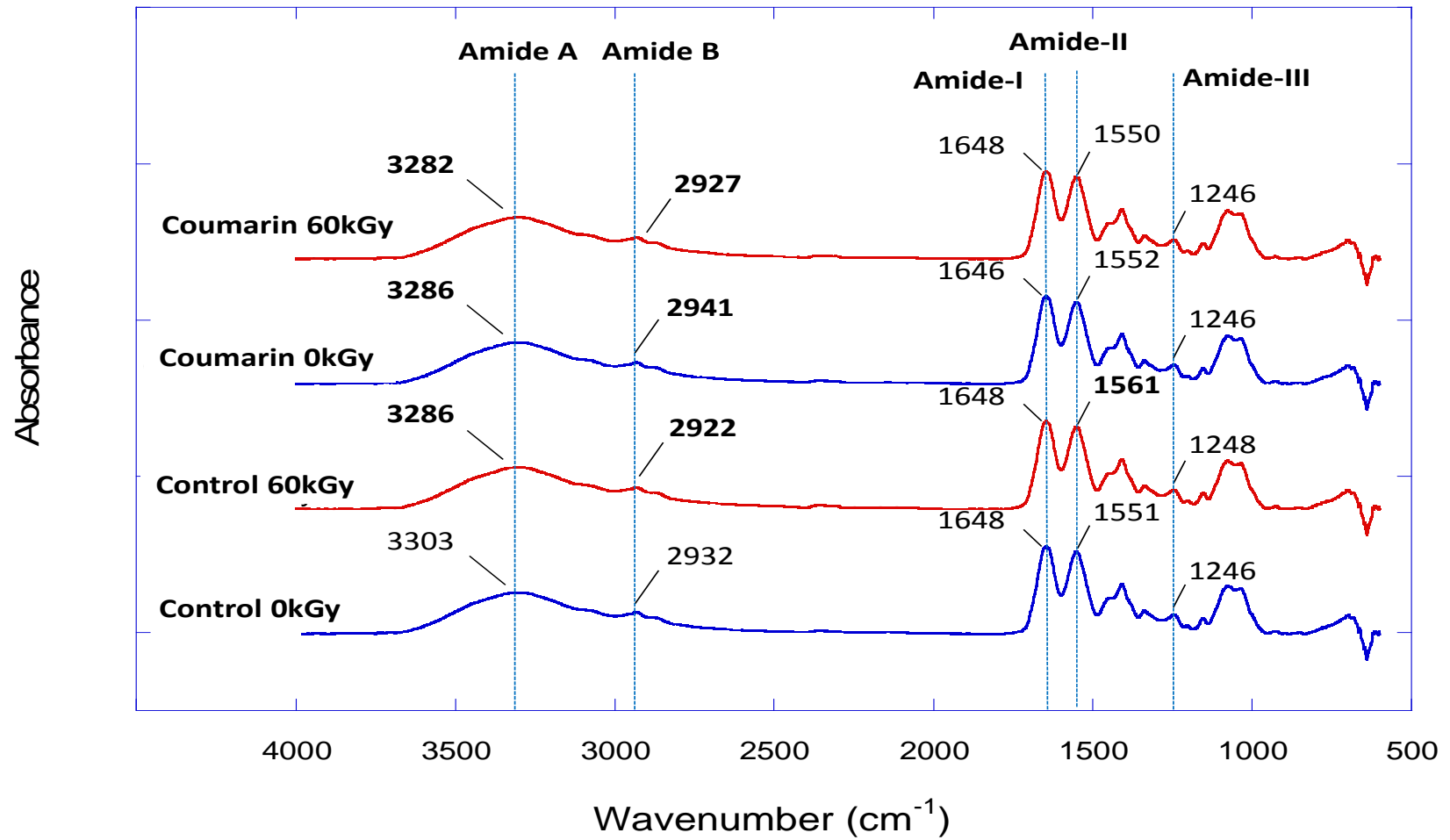


Figure VI.2. FTIR spectra of non-irradiated and irradiated (60kGy) chitosan-fish gelatin film containing or not coumarin. All films were equilibrated at 50% RH and 25°C.

Résultats et discussion. Chapitre VI

After incorporation of coumarin, the peak observed at 3303 cm^{-1} in control film is shifted to lower wavenumber (3286 cm^{-1}). However, this peak also corresponds to the band of OH. Indeed, changes in water content could induce new organisation of the biopolymer network, revealing new interactions displayed by the shift of the OH band. Inversely, the amide B peak (2932 cm^{-1}) is shifted to higher wavenumber (2941 cm^{-1}). But, no change is observed on amide-I, amide-II and amide-III peak position after incorporation of coumarin. Contrarily, Mathew and Abraham. (2008), in the case of starch-chitosan blend film incorporating ferulic acid, founded a significant shift in amide-I groups, and they suggested that this shift indicates interaction between the amide groups of chitosan and hydroxyl groups of starch and ferulic acid. Nuthong et al. (2009) also founded a shift in the amide-I band to a lower wavelength after glyoxal or caffeic acid addition on protein based film. These authors indicated that oxygenation of the caffeic acid favoured conversion to quinone and then induced protein cross-linking to a high extent as indicated by the shift of amide-I peak. Same results was founded by Benbettaieb et al.(2015b) after incorporation of ferulic acid on chitosan-gelatin film. After irradiation, some shifts in the position of bands in the region between 3600 and 2800 cm^{-1} associated to amide A and amide B groups (assigned to the ν_{OH} , ν_{NH} and ν_{CH} group) are observed in the all of the studied films. Furthermore, we don't observe any modification in peak position and intensity associated to amide-I and amide-III after irradiation of all films. And only a shift of amide II band from 1551 to 1561 cm^{-1} is observed for control film after 60kGy irradiation dose. The amide I absorption band between 1600 and 1700 cm^{-1} is a useful peak for the IR analysis of the secondary structure of protein like gelatin. There is no shifts observed for amide-I peak for control film and film with coumarin after irradiation. Inversely, Bhat and Karim. (2009) founded a shifts of the amide I bands for gel strength of fish gelatin after UV irradiation treatment. These authors suggested a possible crosslinking occurring in gelatin granules after to UV irradiation. Finally, FTIR experiment showed just a weak modification on the structure of the final network without new significant linkage. This technique allowed to identified that only amide A and amide B (and amide II for control film) groups was shifted after both antioxidant addition and irradiation treatment.

VI.3.1.3. Thermo-gravimetric analysis (TGA)

Thermo-gravimetric analysis was performed in order to study the effect of coumarin addition under irradiation on thermal stability of blend chitosan-fish gelatin films. **Figure VI.3** shows two main stages of weight loss events for all films. The first stage occurs over a temperature range of around $51\text{-}121^\circ\text{C}$ and results in a weight loss (Δw_1) of approximately $5.2\text{-}7.4\%$. It may be associated to the loss of acetic acid and free water sorbed in the film. These results are in agreement with Inamura et al. (2013), who observed similar behavior for biocomposite films prepared with gelatin and nut wastes as fiber source ($46\text{-}140^\circ\text{C}$). Barreto et al. (2003) and Pena et al. (2010) also showed similar results for gelatin film, from 25 to 200°C . These temperature ranges differences can be attributed to the variation of the initial water content as well as the plasticizer used. A similar result was found in skin gelatin film incorporating green tea extract (Wu et al., 2013) and for skin gelatin film containing cinnamon, clove or star anise extracts (Hoque et al., 2011) but at lower degradation temperature of $62\text{-}83^\circ\text{C}$ and $46\text{-}61^\circ\text{C}$, respectively. The

Résultats et discussion. Chapitre VI

second stage of weight loss ($\Delta w_2 = 42.3\text{-}53.8\%$) occurs in the temperature range from 215 up to 330°C. This is most likely associated to the degradation of the polysaccharide and protein backbones, of the glycerol evaporation and thermal degradation (from 177-211°C up to 450°C (Maturana and Pagliuso, 2011)) and also structurally bound water evaporation. Barreto et al. (2003) found that the degradation of milk protein and gelatin film begins at temperatures between 296 and 329°C, and is associated with the protein chain breakage (helical structure) and peptide bonds rupture. They suggested that the different primary and secondary structures of the proteins do not significantly affect the thermal degradation process in nitrogen atmosphere. Pure coumarin (powder) exhibits a single stage weight loss, with decomposition starting at 160-180°C and finishing at about 230°C (Figure VI.3).

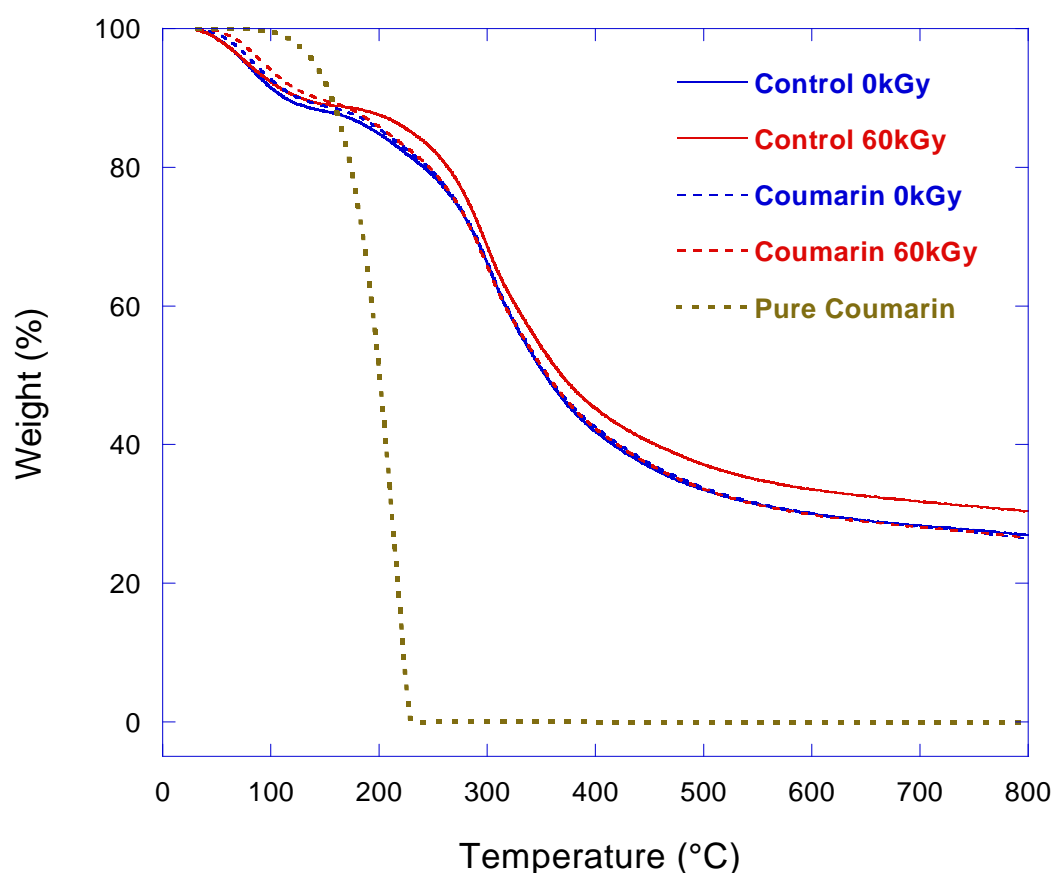


Figure VI.3. TGA thermograms of irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin film with and without coumarin. All films were previously equilibrated at 50% RH and 25°C.

A weak difference was observed on thermal decomposition temperatures and weight loss (Δw_1 and Δw_2) when compared control film to film with coumarin due to the low coumarin content (47mg/g). Opposite results were observed in the case of skin gelatin after addition of star anise extracts (Hoque et al., 2011) and green tea extract (Wu et al., 2013). They suggested that some interactions occurred

between phenolic compounds and gelatin molecule yield to a stronger film network, thus leading to the higher heat resistance of the films. Benbettaieb et al. (2015b) founded that thermal stability of chitosan-gelatin film is improved after quercetine addition. After irradiation, thermal degradation temperature of the control film is improved, associated with a decrease observed on weight loss (Δw_1 and Δw_2). This result suggests the apparition of new bonds, thermally more resistant to heat than initial bonds existing before irradiation which enhances the thermal properties. Similar result was found by Inamura et al. (2013) in the case of composite gelatin-nut shell fiber after 40 kGy irradiation dose. Inversely, we cannot observe any significant modification of thermal stability for film containing coumarin after irradiation. Benbettaieb et al. (2015b) showed a reverse tendency for chitosan-gelatin film containing ferulic acid after 60kGy irradiation dose. Finally, from the above structural and thermal analysis, we can hypothesis that the interaction between coumarin and polymers chains is very weak and no covalent or strong linkage occurred under irradiation. For this reason, a complimentary analysis must be undertaken to more understand the effect of both irradiation and coumarin addition on functional properties of films.

VI.3.2. Impact of both irradiation and coumarin addition on functional film properties

VI.3.2.1. Surface properties and wettability

The contact angle (θ) value obtained after deposition of a water drop on the film surface indicates the surface hydrophobicity. To estimate the resistance of films to liquid water, the swelling index and swelling rate were also determined from the droplet volume kinetics, along with the contact angle values at the initial time of deposit (0 s) and at considered metastable equilibrium (20 s). Results, for all films, are given in **Figure VI.4**. For untreated films, the contact angles (at 0 and 20s) significantly decrease ($p < 0.05$) after incorporation of coumarin. Furthermore, no swelling is observed for the control film. Swelling index and swelling rate significantly ($p < 0.05$) increase to $52 \pm 4\%$ and to $68 \pm 24 \times 10^{-3} \mu\text{L/s}$, respectively after addition of coumarin. After irradiation, the contact angles (at 0 and 20s) significantly decrease for all film (decreases is not significant only for the contact angle at 20s for coumarin film). Whereas, swelling index and swelling rate increase for all films, but it is significant ($p < 0.05$) only for the control film.

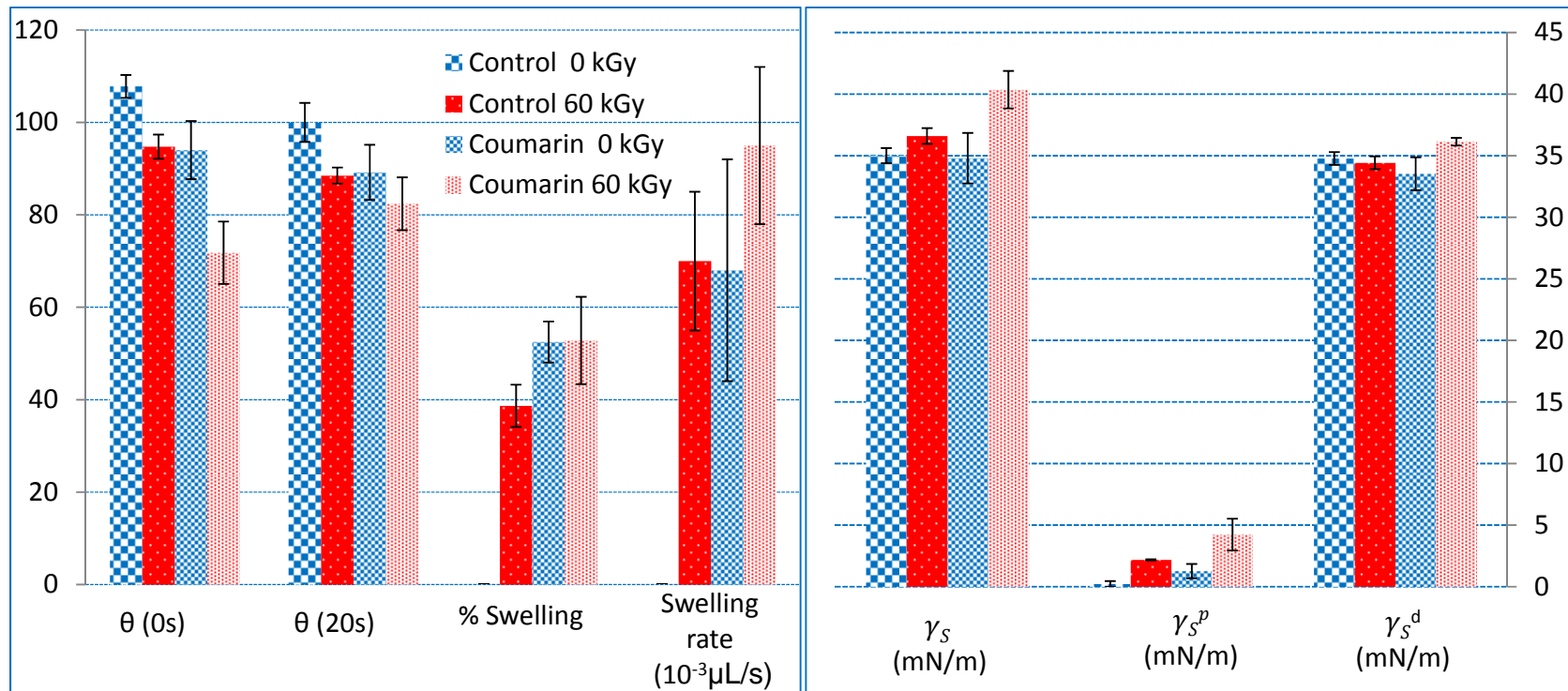


Figure VI.4. Water contact angle at 0 and 20s, swelling index and swelling rate and surface tension (γ_S) with dispersive (γ_S^d) and polar components (γ_S^p) of irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin film with and without coumarin. Measurements were done at room conditions ($\sim 20^\circ\text{C}$, $\sim 50\%RH$).

Résultats et discussion. Chapitre VI

To better understand the effect of coumarin on film surface properties under electron beam irradiation, the surface tension was also determined. Surface tension does not show significant modification after incorporation of coumarin. However, a slight increase is observed on the polar component. The presence of this antioxidant seems to contribute to the hydrophilicity of the film. Similar behaviour was founded by Benbettaieb et al.(2015b) in the case of ferulic acid addition into the same films. Irradiation induces a decrease of the contact angle value with water, concomitant to an increase in the polar component of the surface tension for all films. Benbettaieb et al. (2015b) showed similar results for chitosan-gelatin blend film incorporated or not with tyrosol and quercetine, after electron beam irradiation. It can be attributed to a reorientation of polar groups at the film surface, hence increasing the polar component of the surface tension. Thus irradiation increases wettability of these films.

VI.3.2.2. Water vapour permeability

Table VI.1 displays the WVP of non-irradiated and irradiated films with and without coumarin for the two RH gradient studied (0-30 % and 30-84 %). For the 0-30%RH gradient, the WVP of non-irradiated film containing coumarin ($0.47 \pm 0.03 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$) is in the same range to that of control film ($0.52 \pm 0.1 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$). Inversely, Wu et al. (2013) noticed a decrease of 16 % in the WVP for films composed of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin containing green tea extract (0.7%). Other authors did not observed any change in the water vapor permeability when ferulic acid was added to gelatin films (Cao et al., 2007a), to soy protein films (Ou et al., 2005), or to caseinate based films (Fabra et al., 2011). After irradiation we did not observed any modification on WVP ((0-30%) gradient) for control film and for film containing coumarin. Furthermore, the (0-30%) RH gradient correspond to water activity average equal to 0.15, which is in the BET domain, thus we supposed only water involved in structure with weak plasticization of the network by water occurs. In this domain, neither irradiation or coumarin addition affects the water barrier properties for resulting film.

Using the higher RH gradient (30-84%) induces a rise of the WVP of all films (containing or not coumarin) after irradiation treatment. WVP increases from 2.41 ± 0.44 to $23.06 \pm 0.85 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ and from 2.23 ± 0.65 to $24.8 \pm 2.11 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$, respectively for control film and film with coumarin after 60kGy irradiation dose. Due to the effect of irradiation, the barrier properties are mainly related to the increasing the water content that induces the plasticization of the film during permeation. The 30-84% RH gradient corresponds to an average water activity equal to 0.57, which is in the plasticization domain of the network by water. This is in good agreement with the increase of polar compound and a decrease of contact angle observed after film irradiation. But the effect of coumarin in the network and the transfer phenomena is not significant.

Résultats et discussion. Chapitre VI

Table VI.1. Thickness, water vapour permeability (WVP) and mechanical properties (Tensile strength (TS), Young's Modulus (YM) and elongation at break (% E) of irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin film with and without coumarin. Water vapour permeability was measured at 25°C under (0-30) % and (30-84) % RH differentials. Mechanical properties were measured at 25°C and 50% RH.

Films	Irradiation dose (kGy)	Thickness (μm)	WVP ($10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)		TS (MPa)	YM (MPa)	%E
			$\Delta\text{RH} = (0-30)\%$	$\Delta\text{RH} = (30-84)\%$			
Control	0	65±8 ^a	0.52±0.10 ^{a,b}	2.41±0.44 ^a	25.89±3.92 ^a	1523±266 ^a	2.2±0.4 ^a
	40	65±8 ^a	0.59±0.04 ^{b,c}	22.46±0.7 ^b	28.54±3.76 ^a	1221±235 ^{a,b}	3.1±0.9 ^{a,b}
	60	65±8 ^a	0.56±0.03 ^{b,c}	23.06±0.85 ^{b,c}	39.20±8.32 ^b	1270±23 ^{a,b}	4.1±2.1 ^{a,b}
Coumarin	0	77±12 ^a	0.47±0.03 ^{a,d}	2.23±0.65 ^a	30.95±0.83 ^{a,b}	1328±185 ^{a,b}	4.7±0.5 ^{a,b}
	40	77±12 ^a	0.47±0.02 ^{a,d}	25.13±1.25 ^d	28.65±5.02 ^a	1006±115 ^b	3.2±0.3 ^{a,b}
	60	77±12 ^a	0.50±0.04 ^{a,c}	24.80±2.11 ^{d,c}	31.35±5.64 ^{a,b}	1187±201 ^{a,b}	3.0±0.4 ^{a,b}

Values are given as mean \pm standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same column are not significantly different at $p < 0.05$.

Table VI.2. Kinetics release parameters of coumarin from irradiated and non-irradiated chitosan-fish gelatin film. All parameters were determined during release and from release kinetics profile (after total release) of coumarin from irradiated and non-irradiated films. Dissolution medium is water at pH=7 and 25°C.

	0kGy	40kGy	60kGy
Theoretical content of coumarin in film (mg/g of film)	47.1±4.7	47.1±4.7	47.1±4.7
Initial Content of coumarin in film prior to release (mg/g of film)	10.1±1.5 ^a	31±0.4 ^b	39.2±4 ^c
Content of coumarin remaining in the film after release at equilibrium (mg/g of film)	1.7±0.6 ^a	7.17±0.51 ^b	12.6±1.7 ^c
Diffusion coefficient ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)	3.26±0.74 ^a	1.87±0.48 ^b	2.04±0.05 ^b

Values are given as mean \pm standard deviation. Means with the same Arabic letter in the same line are not significantly different at $p < 0.05$.

VI.3.2.3. Mechanical properties

Mechanical parameters (tensile strength (TS), Young's Modulus (YM) and elongation at break (E)) of all studied films are giving in Table VI.1. TS, YM and E of control film (non-irradiated, without coumarin) were 25.9 ± 3.9 MPa, 1523 ± 266 MPa and $2.2\pm 0.4\%$, respectively. Jridi et al. (2014) found similar value of %E ($2.7\pm 0.5\%$) but higher value of TS (44.3 ± 1.2 MPa) for chitosan-skin fish gelatin blend film (50:50 w/w) that could be due to thickness or molar mass. Compared to the control film, we did not observe any significant ($p < 0.05$) modification on mechanical parameters (TS, YM and %E) after coumarin addition. An opposite tendency was observed by Benbettaieb et al. (2015b) who showed that TS increases significantly when ferulic acid was added in to the chitosan-gelatin film. Mathew and Abraham. (2008) in the case of ferulic acid incorporated in chitosan/starch blend film, attributed the high increase in TS and YM to the redundant hydroxyl groups which interact within the carbohydrate string and then reduce the attractive force between ferulic acid and the carbohydrate, thus enhancing TS and YM. When irradiation doses (40 and 60kGy) were applied, no significant ($p < 0.05$) modification of all mechanical parameters was observed. But only TS of control film increases significantly with the increasing dose at a 60kGy. This increase of film stiffness and resistance is in accordance with the improvement of thermal stability of control film after 60kGy irradiation dose, previously observed from TGA thermograms.

Finally results from functional and structural properties still less consistent to make the hypothesis related to the crosslinking reaction between polymers chains and coumarin under irradiation. But only few interactions occur (probably by hydrogen linkage) between the different reactive compounds and the orientation of polar groups at to the surface, which enhance the film wettability and hydrophilicity. The interactions between polymer and coumarin after irradiation, even if they seem to be weak could affect the release of the antioxidant into aqueous medium.

VI.3.3. Influence of irradiation and coumarin on its release in aqueous media

The release experiments were determined at last three months after film irradiation. All data are summarized in **Table VI.2**. The amount of coumarin in the non-irradiated film (10.1 ± 1.5 mg/g of film) determined after complete dissolution of films in acetic acid solution (experimental value) was significantly ($p < 0.05$) lower than the theoretical value (47.1 ± 4.7 mg/g of film) calculated from the film recipe. Indeed, about 80% of coumarin disappeared, probably due to oxidation during storage (**Table VI.2**). After irradiation, experimental (real) amount of coumarin in the films is much less reduced as only 35% is lost. Irradiation protects coumarin against degradation during the time of storage (3 months). It could be that coumarin make some interaction with polymers and/or with free radical and thus is less available to be oxidized during storage period. This result suggests that irradiation may function as a safeguard method of antioxidant when this later is encapsulated in hydrocolloids films. This can be considered as a good way to protect active compound and ensure its quality until final consumer.

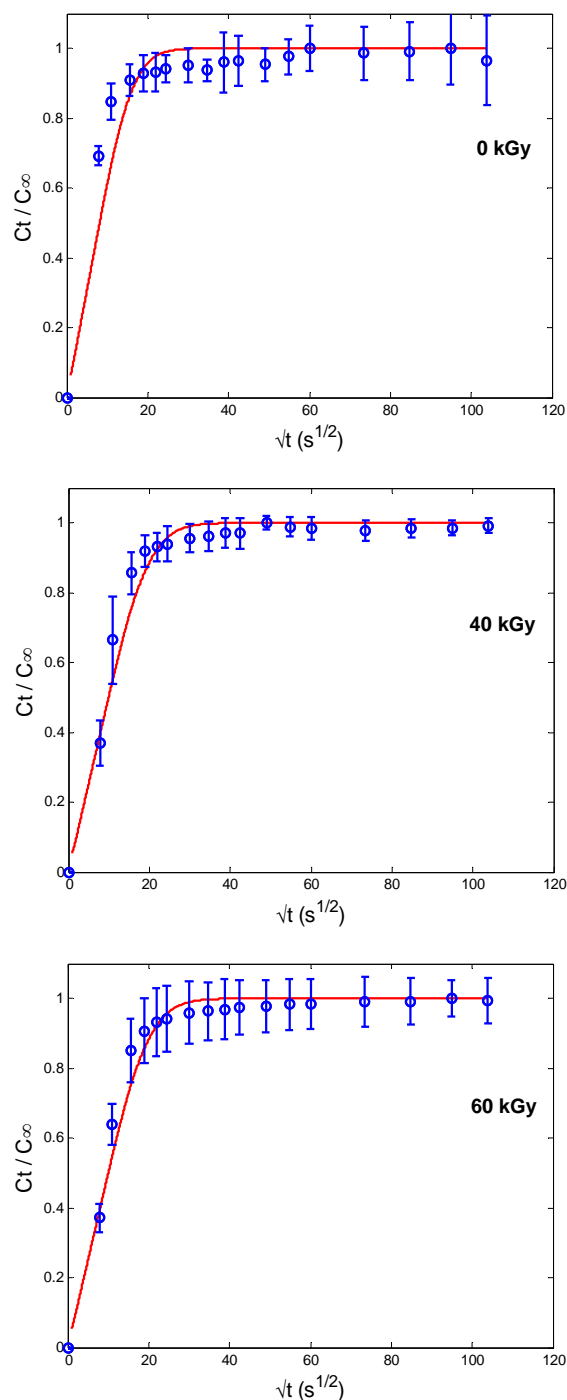


Figure VI.5. Modelization profiles of kinetic release of coumarin in water medium at pH=7 and 25°C, for control (0kGy) and irradiated (40 and 60kGy) chitosan-fish gelatin films. C_t : concentration of coumarin released in the aqueous dissolution medium at time t ; C_∞ : the maximum concentration of coumarin released. Symbols are experimental values (mean+standard deviation) and lines correspond to data modeling using the analytical solution of the second Fick's law (Crank, 1975).

As the difference observed between theoretical and experimental content of coumarin in the film, only the experimental concentration is considered for the study of the release. The release kinetics of coumarin from chitosan-gelatin based films (non-irradiated and irradiated at 40 and 60kGy) in water medium (at pH=7) are displayed in **Figure VI.5**.

Release kinetics of coumarin exhibited the typical shape of non time-dependent and non concentration-dependent diffusion. The content of coumarin remaining in the film after release significantly ($p < 0.05$) increased from 1.7 ± 0.6 to 7.17 ± 0.5 and to 12.6 ± 1.7 mg/g of film, respectively after 40 and 60kGy irradiation dose. This could be explained by the interaction between polymer chains and this antioxidant favoured by the irradiation process. This could therefore modify the film structure organisation and the release mechanisms of antioxidant from the film. Furthermore, the effective diffusion coefficients (D) of the coumarin in the films were estimated from the release kinetics by fitting experimental data using **Eq.II.23** and are given in **Table VI.2**. The D is related to the molecular mobility within the polymeric network and could be related to several factors such as molecular weight, structural characteristics of the matrix and solubility of this antioxidant. We considered here that the partition coefficient did not affect the transfer as the concentrations involved are always much lower than the solubility limit of the coumarin in water media. As it can be observed, the effective diffusion coefficient of coumarin significantly decreased ($p < 0.05$) from 3.26 ± 0.74 to 1.87 ± 0.48 and to $2.04 \pm 0.05 \times 10^{-11} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ respectively after 40 and 60kGy irradiation doses. This is in agreement with the increase of the coumarin content remaining in the film after release. Indeed the higher numbers of interaction between the coumarin and biopolymer strings induces coumarin entrapments and lower its mobility. The observed decrease of diffusion coefficient could be related to the irradiation treatment which limits the mobility of coumarin and therefore down the diffusion. Tin Wui et al. (2002), worked on the influence of microwave irradiation on the drug release properties of polysaccharides beads, showed that the release-retarding property of alginate and alginate–chitosan beads was significantly enhanced by subjecting the beads to microwave irradiation. They showed that microwave technology can be employed in the design of solid dosage forms for controlled-release application without the use of noxious chemical agents. Irradiation could favor the interaction between coumarin and biopolymer via free radical mediated mechanism. Hence, coumarin is more linked consequently, more protected and less mobile.

The effect of irradiation modifies the surface properties by increasing its polarity. So swelling phenomenon occurs too quickly to affect the diffusion determination. Despite the swelling, the film remains intact and we did not observe dissolution nor network structure destruction during the kinetic release. In non-irradiated film, as the structure is less dense, water can easily enter into the network and favour the polymeric chain mobility and thus the coumarin diffusion through the hydrated films is greater. However, irradiation allowed to delay by 50% the release time. So, film irradiation after optimization, will be an effective process for controlled release of active natural antioxidants in aqueous food.

Conclusions

Chitosan and fish gelatin films encapsulating coumarin were prepared as an active biobased film. After film drying and peeling, an irradiation by electron beam was applied at 40 and 60kGy. This work aimed to investigate the coupled effect of irradiation and of the presence of the active compound on the structure and functional properties of the films. Electron Spin Resonance (ESR) displayed the free radical formation during irradiation in films involved in the crosslinking of biopolymers. After irradiation treatment, only the control films displayed the amides A, B and II peaks shifted (FTIR) that confirmed a crosslinking. From TGA analysis, coumarin did not affect the thermal stability of films whereas irradiation improved it. Both addition of coumarin and irradiation decreased the contact angle with water and increase the polar component of the surface tension of films, as well as the swelling index and rate. This is attributed to a reorientation of polar groups at the film surface. From water barrier analysis, neither irradiation nor coumarin addition affected the water vapour permeability at low RH gradient. However, a higher RH gradient (30-84%) induced a rise of the WVP of all the films after irradiation treatment that is related to the surface properties and film wettability. Incorporation of coumarin did not affect the mechanical properties of films on the contrary to irradiation, but very weakly. The interactions between biopolymers and coumarin after irradiation affected the release of the antioxidant into the aqueous medium. The content of coumarin remaining in the film at equilibrium after release significantly increased when film were irradiated, from 17% to 32% mg/g of film, inversely, the effective diffusion coefficient of coumarin decreased by 1.6 times. Irradiation, also displayed that it is an efficient process to prevent coumarin degradation during the storage of films, as more than 50% of the antioxidant was preserved compared to non irradiated films.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

L'application des films comestible d'emballage en industries alimentaires n'est pas récente, ainsi plusieurs travaux se sont intéressés à la formulation, à la technologie de fabrication et/ou d'application des films comestibles à base d'hydrocolloïdes (Embuscado, 2009; Krochta, 1994, Cuq et al., 1995a, ...). La plupart de ces travaux concerne l'utilisation de films mono-polymères ou de films à base de mélanges de deux ou plusieurs biopolymères. Par ailleurs, les mélanges protéines-polysaccharides ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs (Al-Hassan et Norziah, 2012 ; Brindle et Krochta, 2008,...), afin de profiter des nombreuses interactions intermoléculaires qui peuvent s'établir entre les biopolymères (liaisons Hydrogène, interactions hydrophobes, forces de van der Waals, interactions ioniques et formation de complexes polyélectrolytiques, etc.). Pour augmenter les performances de ces systèmes, il est envisagé des voies de réticulation plus « douces » et plus « propres » que les traitements conventionnels chimiques, thermiques ou enzymatiques. Ces derniers sont des procédés coûteux, longs, ou induisant l'usage de composés ou de solvants toxiques. En effet, l'irradiation par rayonnements UV, gamma ou par faisceaux d'électrons est une méthode physique de réticulation considérée comme propre car n'utilisant pas de solvant. Elle s'est avérée être une alternative efficace pour créer des nouvelles liaisons intra- ou intermoléculaires entre les chaînes de biopolymères, en particulier dans les systèmes protéiques (en solution), améliorant très significativement les propriétés barrières et mécaniques des films. Ces traitements ionisants n'engendrent pas d'élévation de température, ni de résidus toxiques ou radioactifs dans le produit fini ou dans le film comestible, et sont très simples et faciles à contrôler. En outre, la modification de la structure des réseaux de macromoléculaires par réticulation des chaînes, permet aussi l'immobilisation de molécules bio-actives (antimicrobiens, antioxydants, arômes...) et le contrôle de leur libération. Cette approche nous a permis d'orienter les travaux menés au laboratoire sur les films comestibles actifs vers d'autres applications.

Très peu d'études se sont intéressées à la modification des propriétés physiques et structurales des films suite à l'incorporation de ces composants actifs, et encore moins après des traitements de réticulation par irradiation. Ainsi l'originalité de cette étude s'articule sur l'effet combiné de l'irradiation et de l'ajout d'antioxydants naturels sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des films à base de mélanges protéines-polysaccharides. Visant une application comme emballage ou enrobage comestible actif, l'effet de l'irradiation sur la libération de ces antioxydants, dans un milieu aqueux modèle, a été aussi étudié.

Conclusions et perspectives. Chapitre VII

Le choix du polysaccharide (chitosan) et de la protéine (gélatines de bœuf puis de poisson) a été retenu sur la base de leurs propriétés fonctionnelles (filmogènes, mécaniques et barrières) avérées, de leur compatibilité physico-chimique, de leur potentielle réactivité chimique, de leur relative neutralité sensorielle, et parce que ce sont des co- et sous-produits de l'industrie des produits de la pêche encore insuffisamment valorisés. Le choix des molécules actives s'est appuyé sur l'étude bibliographique des antioxydants, si possible naturels (composés phénoliques), qui possèdent une double liaison libre qui peut, sous irradiation, créer de nouvelles interactions ou liaisons covalentes avec les groupes fonctionnels ou chargés du chitosan et/ou de la gélatine. Mieux comprendre l'effet de l'irradiation et de l'incorporation de ces antioxydants sur les propriétés fonctionnelles (en particulier mécaniques et barrières) des films et sur leur libération dans des milieux aqueux modèles, est nécessaire au développement et à l'application finale des films comestibles actifs.

Nous avons ainsi étudié l'effet de la composition (ratio chitosan/gélatine), de l'épaisseur et des conditions de séchage sur les propriétés des films. Ainsi, pour un film obtenu à partir d'un ratio volumique de 25% de chitosan et 75% de gélatine (soit un ratio de 1:9 en masse), l'épaisseur des films, après séchage, augmente linéairement avec la densité de surface ($\text{mg polymère}/\text{cm}^2$). Cette linéarité était cohérente avec une structure très homogène, influencée ni par la quantité d'eau évaporée et donc ni par la durée de séchage, ce qui a été confirmé par l'observation par microscopie électronique des films (résultats non présentés). La densification de la solution filmogène puis du gel pendant le séchage ne dépend donc ni de l'épaisseur, ni de la concentration en matière sèche, ni de la durée et laisse supposer une diffusion Fickienne de l'eau dans la matrice. Comme nous le verrons après, cela induira un gonflement et donc une perméabilité des films exposés à l'humidité (lors du transfert de vapeur d'eau) qui est proportionnel à l'épaisseur.

Les films de gélatine sont plus résistant mécaniquement (force à la rupture (TS) élevée) mais moins déformables que les films de chitosan. L'addition de gélatine a accru d'une façon significative ($p < 0,05$) TS et YM, tandis que E a considérablement été réduit (**Figure VII.1** et **Tableau III.3**). Ceci est expliqué par une augmentation de la température de transition vitreuse (**Figure III.5**) ou une augmentation de la fraction cristalline, ce qui n'a pu être démontré.

L'amélioration des propriétés mécaniques des films de chitosan après incorporation de la gélatine pourrait être reliée à la formation d'un réseau interpénétré des deux polymères, plus dense dû aux interactions intermoléculaires mises en jeu. Ce résultat a été confirmé par les observations microscopiques. A l'échelle moléculaire, le chitosan et la gélatine peuvent s'associer et interagir via des interactions hydrogène et surtout électrostatiques. En effet, à pH de 5,6-6,2, elles s'établissent entre le groupement NH_3^+ provenant de la protonation du groupement amine (NH_2) du chitosan en milieu acide, et d'autre part, et le groupement carboxylique (COO^-) de la gélatine à un pH supérieur à son point isoélectrique. L'analyse par FTIR a confirmé cette hypothèse par les shifts des pics relatifs aux bandes amide-I (associé à la vibration CO) et amide-II (associé à la vibration NH) au niveau du chitosan et de la gélatine. Cette analyse a permis de sélectionner le film composé de 50% de chitosan et 50% de gélatine de poisson (proportion massique) présentant le meilleur compromis en propriétés mécaniques et barrières.

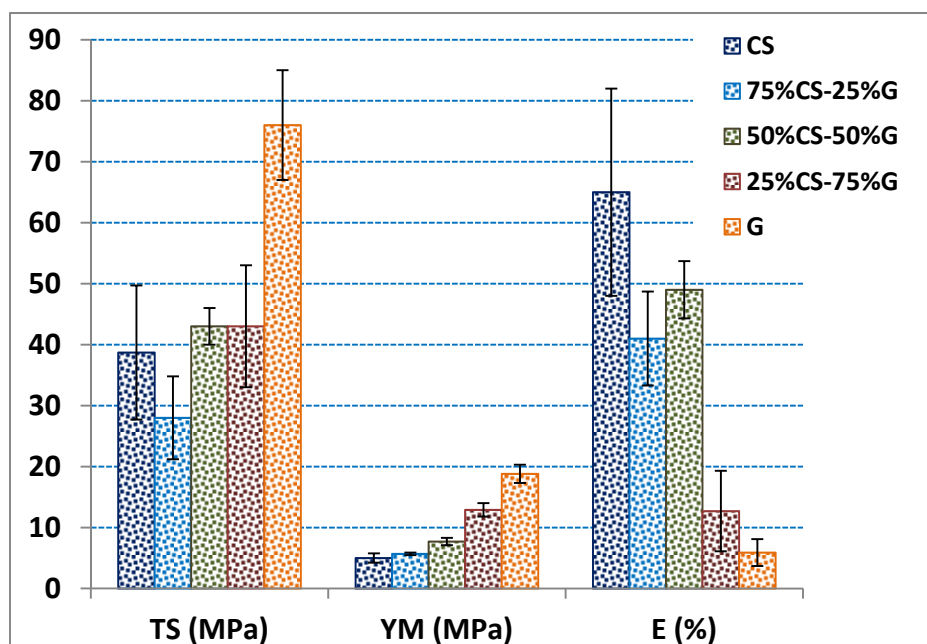


Figure VII.1. Influence du ratio (v/v) chitosan/gélatine sur les propriétés mécaniques des films mesurées à 25°C et 50% d'humidité relative (TS : force à la rupture, YM : module de Young, E : déformation à la rupture)

Le traitement par faisceau d'électron des films après séchage s'est avéré moins impactant que nous pouvions le supposer, probablement du fait de la faible mobilité moléculaire dans le système sec. Toutefois, l'irradiation a accru significativement la stabilité thermique des films de gélatine, mais peu celle des films de chitosan. La présence de nombreuses fonctions chimiques susceptibles d'interagir dans les protéines l'explique. En effet, une structure plus dense a été observée par microscopie électronique. L'analyse par DRX a montré que la fraction cristalline reste inchangée, quelle que soit la composition des différents films. S'il y a eu un effet de dégradation ou de réticulation des chaînes de chitosan et/ou gélatine suite à l'irradiation, elle ne concerne que la phase amorphe. La phase amorphe constitue la phase continue dans les films, responsable des propriétés mécaniques et dans laquelle s'opèrent la majorité des transferts des petites molécules. La présence des radicaux libres (spectre ESR), très réactifs, a engendré des réactions de réticulation entre les chaînes de gélatine et/ou de chitosan. En outre, les spectres UV-Vis (augmentation de l'absorbance à 280 nm pour les films de gélatine et entre 280-300 nm des films en mélange à 50%-50% CS-G) et les shifts observés sur les spectres infra-rouge (FTIR) au niveau des groupements carbonyles et amides confirment la présence de nouvelles interactions intermoléculaires de faibles énergies. L'impact de l'irradiation sur les propriétés de surface est significatif mais cela affecte plus les propriétés barrières des films que les propriétés mécaniques.

L'effet combiné des traitements d'irradiation et de l'ajout des antioxydants sur les propriétés physiques des films (50%CS-50%G) a modifié les propriétés mécaniques des films. La présence de 5% d'antioxydants accroît la force à la rupture des films comme le montre la **figure VII.2**.

Ces antioxydants peuvent aussi interagir avec les chaînes des polymères, induire de nouvelles liaisons moléculaires et augmenter ainsi la rigidité de films. L'effet de la combinaison de l'ajout des

Conclusions et perspectives. Chapitre VII

antioxydants et d'une irradiation des films sur les propriétés mécaniques et structurales des films est beaucoup plus complexe (**Figure VII.2**). En effet, l'irradiation ne modifie peu ou pas les propriétés mécaniques des films contenant l'acide férulique ou la coumarine, alors que nous observons un effet « antagoniste » avec le tyrosol. Toutefois, seule la quercétine semble avoir un effet synergique sur TS après irradiation. La complexité du système provient du fait de la possibilité des antioxydants de « monopoliser » certains sites réactifs des chaînes de chitosan et/ou gélatine, qui deviennent alors non disponibles pour la réticulation lors de l'irradiation. Ainsi, l'acide férulique est plus à même de générer des interactions avec les biopolymères que le traitement d'irradiation, inversement, on peut penser que le tyrosol bloque les sites réactifs sans pour autant créer des interactions favorables à une amélioration des propriétés mécaniques des films. La combinaison des antioxydants de type phénolique avec un traitement d'irradiation par faisceau d'électrons n'est donc pas forcément à l'avantage des propriétés mécaniques des films comestibles à base de chitosan et de gélatine de poisson.

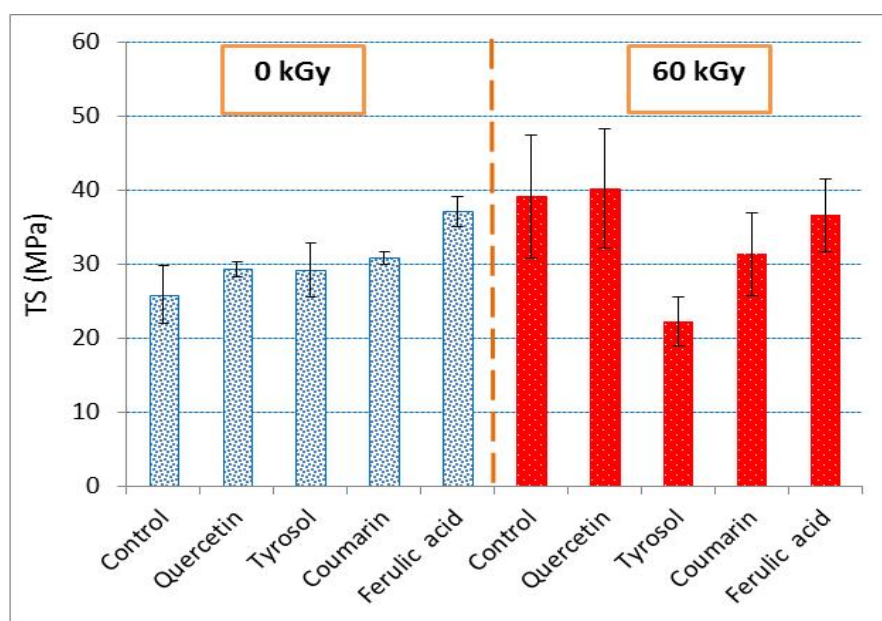


Figure VII.2. Influence de l'ajout d'antioxydants et de l'irradiation sur la force à la rupture (TS) des films de chitosan-gélatine (50%CS-50%G, w:w). Mesure à $T \sim 20^\circ\text{C}$ et $\text{RH} \sim 50\%$.

Dans les films composés de gélatine et de chitosan en mélange, la perméabilité à la vapeur d'eau augmente linéairement avec l'épaisseur des films, et cette augmentation est d'autant plus prononcée que le gradient d'humidité relative est élevé. Ainsi, lorsque l'épaisseur croît de 52 à 159 μm , la WVP augmente, respectivement de 32%, 52% et 61% pour les gradients 30-75%, 30-84% et 30-100% HR. Le chitosan et la gélatine étant des polymères hygroscopiques, ils absorbent de l'eau et gonflent. Ce gonflement augmente proportionnellement avec l'épaisseur, réduisant la viscosité locale, augmentant le volume libre et par conséquent le transfert de petites molécules comme l'eau ou l'oxygène. Sachant que l'épaisseur influe sur la perméabilité, elle a été fixée pour la suite des études menées dans cette thèse. La proportion de gélatine ajoutée au chitosan est favorable à l'efficacité barrière à la vapeur d'eau, mais aussi à l'oxygène, comme le montre la **figure VII.3**, et ce, quel que soit le gradient d'humidité relative utilisé (30-100%, 30-84% et 30-75%). Nous avons

expliqué ces comportements par la formation du complexe polyélectrolytique et par les interactions mises en place entre le chitosan et la gélatine, favorisant une densification du réseau polymériques, limitant ainsi la mobilité moléculaire de l'eau et de l'oxygène dans les films.

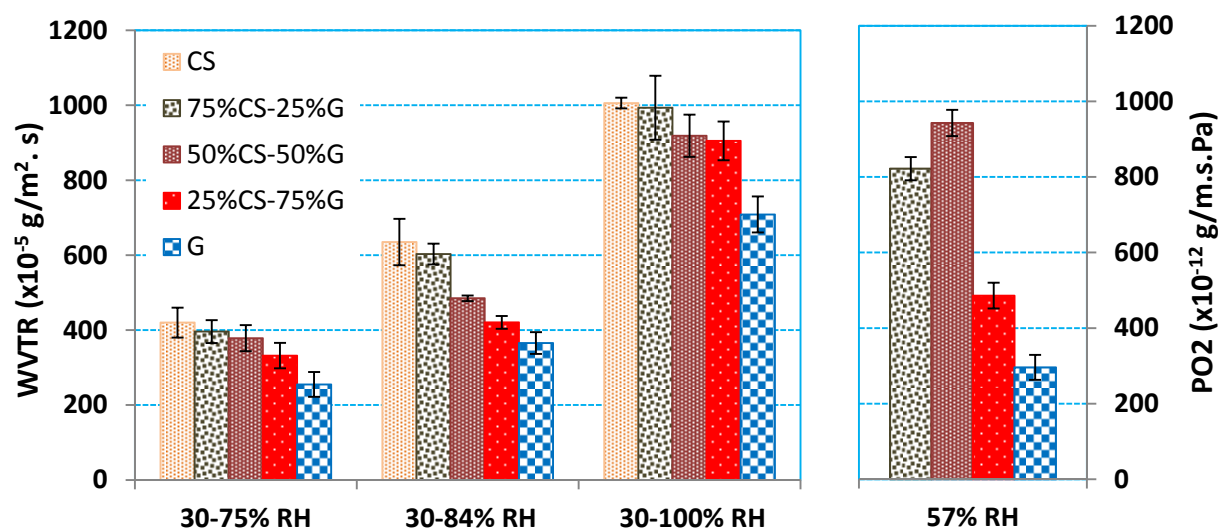


Figure VII.3. Influence de la proportion du mélange chitosan-gélatine (CS-G) sur le flux de vapeur d'eau (WVTR) à 3 gradients d'humidités relatives (30-100%, 30-84% et 30-75%) et sur la perméabilité à l'oxygène (PO2) à 57% RH des films.

Après irradiation, l'augmentation de la perméabilité à la vapeur d'eau, observée en particulier pour les films de gélatine, est attribuée à la mouillabilité et à l'hydrophilie des films. En effet, l'irradiation augmente d'une façon significative la sensibilité des films à la vapeur d'eau par orientation des groupements ou résidu polaires à la surface des films. Cette hypothèse est confirmée par l'abaissement très net des angles de contact et surtout à l'augmentation de la composante polaire de la tension de surface de tous les films après irradiation (**Tableau V.1.** et **Figure VI.4.**), y compris après ajout des antioxydants. Ainsi, malgré la génération de liaisons nouvelles après irradiation qui devaient réduire la mobilité des petites molécules qui transfèrent, la modification de la polarité des films a induit une affinité pour l'eau suffisamment élevée pour favoriser la sorption d'eau et donc accroître la perméabilité.

A un faible gradient (0-30% HR), la perméabilité à la vapeur d'eau des films diminue avec l'ajout des antioxydants (**Tableaux V.1.1** et **VI.1.**), et de manière plus significative pour le cas de l'acide férulique ou du tyrosol. Aucun changement de la perméabilité n'a été observé après irradiation, quel que soit l'antioxydant considéré. A ce faible gradient, l'activité d'eau moyenne du film est de 0,15, et correspond à une teneur en eau moyenne du film suffisamment faible pour être considérée comme l'eau intimement liée et impliquée dans la structure du réseau. La teneur en eau n'est donc pas suffisante pour induire une plastification « visible » pouvant masquer ou accentuer l'effet des antioxydants ou de l'irradiation.

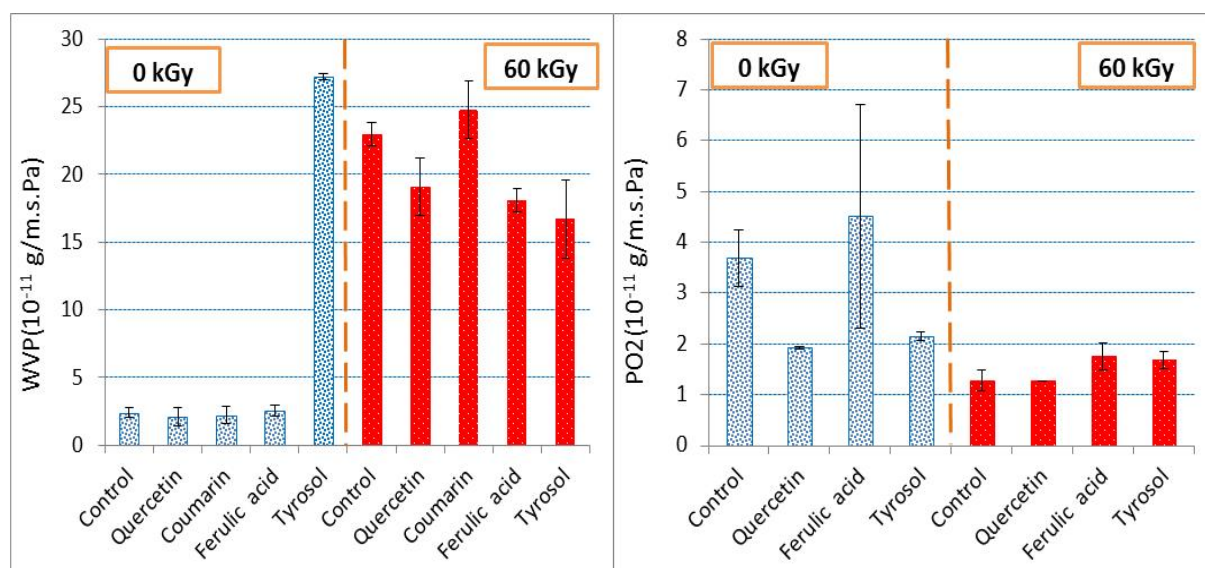


Figure VII.4. Influence de l'ajout d'antioxydants et de l'irradiation sur les propriétés barrières à la vapeur d'eau (WVP, gradient 30-84%) et à l'oxygène (PO₂, 53% HR) de films de chitosan-gélatine (50%CS-50%G, w:w) à 25°C.

En utilisant un gradient d'humidité plus élevé (30-84% RH), la perméabilité à la vapeur d'eau augmente jusqu'à 10 fois après ajout d'antioxydants et/ou irradiation (**Figure VII.4**). L'augmentation très prononcée de la WVP des films contenant le tyrosol peut être attribuée à sa structure chimique avec deux fonctions hydroxyles opposées (en position para), à sa grande solubilité en phase aqueuse et à son faible log P. Les caractéristiques physiques et chimiques lui permettent une compatibilité aussi bien avec le chitosan que la gélatine, de s'insérer entre les chaînes, jouant ainsi le même rôle plastifiant que le glycérol, et enfin de favoriser la sorption d'eau. La combinaison de l'ajout des antioxydants et de l'irradiation sur la perméabilité à la vapeur d'eau à un niveau de gradient élevé ne permet pas de tirer de règles générales. Des effets de compétitions entre l'ajout des composés phénoliques et le traitement d'irradiation sur la mise en place des interactions intra- ou inter-chaînes polymériques, entre chaînes polymériques et antioxydants, entre chaînes polymériques et plastifiants (eau et glycérol) et entre antioxydants et plastifiants sont possibles. Mais, dans tous les cas, il faut retenir que l'irradiation est défavorable à l'efficacité barrière à la vapeur d'eau des films due à l'augmentation de la polarité de surface et de l'hydrophilie. Inversement, la perméabilité à l'oxygène des films contenant les antioxydants est significativement réduite après irradiation. Il est possible que cela soit plus lié à la propriété intrinsèque des composés phénoliques choisis, c'est-à-dire à leur propriété antioxydante, mais cela n'a pas été vérifié. L'irradiation ayant favorisé la formation de radicaux libres, les groupements « activés » par ces radicaux sont plus susceptibles de réagir avec l'oxygène ce qui pourrait expliquer l'abaissement de la perméabilité.

Afin de valider les hypothèses précédentes et d'évaluer l'intérêt de ces films comestibles actifs, nous avons vérifié la teneur en antioxydants dans les films après traitement et 3 mois de stockage. Puis, le suivi de la libération des antioxydants encapsulés dans les films de chitosan-gélatine dans un milieu liquide simple a été appréhendé. La quantité théorique initialement encapsulée dans le film (environ 50 mg/g de film) est identique à la quantité réelle mesurée uniquement pour l'acide férulique, y

Conclusions et perspectives. Chapitre VII

compris après irradiation et stockage. Au contraire, des pertes de 20% pour le tyrosol et de 80% pour la coumarine sont constatées. Ceci est probablement dû soit à leur dégradation thermique durant la préparation des films ou leur dégradation chimique (oxydation) durant le processus de fabrication (séchage) et le stockage. Toutefois, l'irradiation a permis de réduire très nettement ces pertes (tyrosol : 17% ; coumarine moins de 35% de pertes). Les interactions établies entre les chaînes de chitosan et/ou de gélatine et certains antioxydants sont confirmées par le pourcentage d'antioxydants retenus dans les films à l'équilibre (fin de cinétique de libération en condition de dilution infinie = solubilité non limitante). Ainsi, 27 % de l'acide férulique, 23 % de la quercétine, 17% de la coumarine et seulement 4 % du tyrosol ont été retenus. Autant, les résultats par analyses spectroscopiques ont mis en évidence des shifts correspondant aux interactions physico-chimiques pour l'acide férulique et la coumarine, autant on suppose plutôt une encapsulation stérique dans le cas du tyrosol. Les coefficients de diffusion varient selon la nature et la structure chimiques des antioxydants, de l'ordre de $10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ pour la coumarine et le tyrosol, de l'ordre de $10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ pour l'acide férulique et $10^{-13} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ pour la quercétine (**Tableaux V.2.2, V.2.3 et VI.2**). Quel que soit le composé actif, l'irradiation a réduit de 12% à 50% les coefficients de diffusion. Même si l'effet de l'irradiation sur les propriétés barrières et mécaniques des films « secs » reste faible ou négligeable, elle s'est avérée néanmoins efficace pour moduler la libération des molécules actives.

Ce travail de thèse nous a ainsi permis de formuler un emballage comestible à base d'un mélange de chitosan et de gélatine, de mieux comprendre les mécanismes d'interactions entre ces hydrocolloïdes, leurs incidences sur les propriétés fonctionnelles des films, et sur leur application.

Nous rappelons que le traitement de réticulation par faisceaux d'électrons accélérés a été réalisé sur des films secs. Dans ces conditions, le réseau macromoléculaire était déjà « figé », la majorité des interactions moléculaires entre les chaînes de polymères était établie. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'irradiation à différents niveaux d'humidité des films, ou sur des gels étalés plus ou moins séchés. En effet, la présence d'eau en plus grande quantité joue complètement son rôle de plastifiant, augmente la mobilité moléculaire et pourrait accentuer l'effet réticulant des traitements ionisants. De même, nous avons posé comme hypothèse que les antioxydants gardaient leur propriété antioxydante lors de la fabrication des films, leur irradiation et leur stockage. Cependant, cela mérite d'être vérifié car les radicaux libres formés lors de l'irradiation, d'autant plus marqués en présence des antioxydants, peuvent aussi altérer la fonctionnalité des composés phénoliques étudiés. Enfin, nous avons évalué les propriétés de libération des antioxydants dans des milieux très simples (liquides aqueux dont le pH était fixé), mais il faudrait aussi tester nos films comestibles actifs sur des aliments réels (enrobages) ou dans des milieux qui simulent mieux l'aliment, en tenant compte par exemple de la viscosité, de la présence de sels (force ionique) ou d'autres solutés qui peuvent interférer sur la structure des films (plastifiant, lipides, enzymes....).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abugoch, L.E., Tapia, C., Villamán, M.C., Yazdani-Pedram, M. & Díaz-Dosque, M. (2011). Characterizations of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25, 879–886.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review, *LWT-Food Science Technology*, 43, 837–842.
- Al Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S. & Elsabee, M. Z. (2009). Extration and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77 (1), 410-419.
- Al-Hassan, A.A and Norziah, M.H. (2012). Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26, 108-117.
- Alves, N. M. & Mano, J. F. (2008). Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 401–414.
- Apostolov ,A.A., Fakirov, S., Evstatiev, M., Hoffmann, J., and Friedrich, K. & (2002). Biodegradable Laminates Based on Gelatin, 1 Preparation and Mechanical Properties. *Macromolecular Material Engineering*, 287, 693–697.
- Appendini, P. and Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food package. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3:113–126.
- Arcan, I. and Yemenicioglu, A. (2011). Incorporating Phenolic Compounds Opens a New Perspective to Use Zein Films as Flexible Bioactive Packaging Materials. *Food Research International*, Oxford, 44 (2), 550-556.
- Arifin, D.Y., Lee, L.Y. & Wang, C.H. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (12–13), 1274–1325.
- Arvanitoyannis, I. & Biliaderis, C.G. (1998). Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemistry*, 62(3), 333-342.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aibab, S. & Yamamoto, N. (1997). Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Food Chemistry*, 60 (4), 593-604.
- Arvanitoyannis, I.S. (2002). Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings. In A. Gennadios (Ed.), *Protein-based films and coatings* (pp. 275-304). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Ashby, M.F. & Gibson L. J. (1988). *Cellular solids: structure and properties*, Pergamon Press, Oxford, U.K.
- Aspeden, T.J., Mason, J.D.T., Jones, N.S., Lowe, J., Skaugrud, O. and Illum, L. (1997), Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 509-513.
- ASTM 51607 (2004). Practice for use of the alanine-EPR dosimetry system. *ASTM Book of Standards*, Philadelphia, PA.
- ASTM E96–80 (1980). Standard test methods for water vapour transmission of materials, *ASTM Book of Standards*, Philadelphia, PA.
- Audic, J.L., & Chaufer, B. (2010). Caseinate based biodegradable films with improved water resistance. *Journal of Applied Polymer Science*, 117, 1828-1836.

Références bibliographiques

- Austin, P. (1984). Chitin solvents and solubility parameters, in Chitin and chitosan and related enzymes. Orlando Academic Press.
- Avena-Bustillos, R.J., Du, W.X., Woods, R.D., McHugh, T.H., Levin C.E., Mandrell, R.E, Friedman, M. (2009). Hedonic evaluation of cooked chicken wrapped with apple and tomato films formulated with cinnamaldehyde and carvacrol. Presented at the Institute of Food Technologists Annual Meeting. Anaheim, CA: Abstract 158-18; June 6-10.
- Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C.W., Olson, D.A., Chiou, B., Yee, E. & Bechtel, P.J. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71(4), 202-207.
- Averous, L. (2004). Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch, *Journal of macromolecular science*, C44 (3), 231-274.
- Ayranci, E., Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423-431.
- Babin, H. & Dickinson, E. (2001). Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15(3), 271–276.
- Baker, R.A., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. (1994). Meats, poultry, and seafood. In: *Edible coatings and films to improve food quality*. J.M. Krochta, E.A. Baldwin, M.O. Nisperos-Carriedo (Eds.), Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, 90-101.
- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Baker, R.A. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 35(6), 509-524.
- Bao, S., Xu, S. & Wang, Z. (2009). Antioxidant activity and properties of gelatin films incorporated with tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(15), 2692-2700.
- Barreto, P.L. M., Pires, A.T. N. & Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*, 79 (1), 147–152.
- Belhaneche-Bensembra, N. and A. Bedda. (2001). Analyse de la relation structure-propriétés des mélanges PVC-PMMA. *Annales de Chimie et Sciences des Matériaux*, 26, 79-90.
- Bell, L.N and Labuza, T.P. (2000). Determination of moisture sorption isotherms. In: *Moisture sorption: Practical aspects of isotherm measurement and use*, 2nd edition, pp. 33-56. American Association of Cereal Chemists, St Paul.
- Benabbou, R., Zihler, A., Desbiens, M., Kheadr, E., Subirade, M. & Fliss, I. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a combination of chitosan and divergicin M35. *Canadian Journal of Microbiology*. (Accepted).
- Benbettaieb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.H. & Debeaufort, F. (2015b). Coupling tyrosol, quercetin or ferulic acid and electron beam irradiation to cross-link chitosan-gelatin films: a structure-function approach. Accepted by *European polymer journal*.
- Benbettaieb, N., Karbowiak, T., Bornaz, S., Debeaufort, F. (2015a). Spectroscopic analyses for understanding the effect of electron beam irradiation doses on mechanical and transport properties and microstructure of chitosan-fish gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.09.038.
- BenBettaieb, N., Kurek, M., Bornaz, S. & Debeaufort, F. (2014) Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin/chitosan blend films related to biopolymer interactions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94, 2409–2419.

Références bibliographiques

- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. R. & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications: Review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 19–34.
- Bertuzzi, M.A., Castro Vidaurre, E.F., Armada, M. and Gottifredi, J.C.(2007).Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80, 972–978.
- Bessho, M., Kojima, T., Okuda, S. & Hara, M. (2007). Radiation-induced cross-linking of gelatin by using γ -rays: insoluble gelatin hydrogel formation. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 80, 979–985.
- Bhat, R. & Karim, A.A. (2009). Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin. *Food Chemistry*, 113, 1160–1164.
- Bifani, V., Ramirez, C., Ihl, M., Rubilar, M., García, A. & Zarithsky, N. (2007). Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 40, 1473–1481.
- Bigi, A., Borghi, M., Cojazzi, G., Fichera, A.M., Panzavolta, S. & Roveri, N. (2000). Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *Journal of Thermal Analysis*, (61), 451-459.
- Bigi, A., Bracci, B., Cojazzi, G., Panzavolta, S. & Roveri, N. (1998). Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials*, 19, 2335–2340.
- Bigi, A., Panzavolta, S. & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and *Biopolymers*, 53, 523-528.
- Biquet, B and Labuza, T.P. (1988).Evaluation of moisture permeability characteristics of chocolate films as an edible moisture barrier. *Journal of Food Science*, 53, 989-998.
- Bourtoom, T and Chinnan M.S. (2008).Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1633-1641.
- Brady, R.F. (2003).Comprehensive desk reference of polymer characterization and analysis. Washington, D.C.Oxford Univ. Press. 772 p. Jr, editor.
- Brault, D., D'Aprano, G. & Lacroix, M. (1997). Formation of free-standing sterilized films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 2964–2969.
- Brayden, D.J. (2003).Controlled release technologies for drug delivery. *Drug Discovery Today*, 8 (21), 976–978.
- Brindle, L.P. and Krochta, J.M. (2008).Physical Properties of Whey Protein–Hydroxypropylmethylcellulose Blend Edible Films. *Journal of food science*, 73(9), 446-454.
- Bungenberg de Jong, H.G. (1949). Morphology of coacervates. In Kruyt, H. R. (Ed.). *Colloid science*, 2, 335-432. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.
- Buonocore, G.G., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., La Notte, E., Del Nobile, M.A., (2004).Controlled release of antimicrobial compounds from highly swellable polymers. *Journal of Food Products*, 67 (6), 1190–1194.
- Butler, B.L., Vergano, P.J., Testin, R.F., Bunn, J.M. & Wiles, J.L. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, 61, 953-955.
- Byun, E.H., Kim, J.H., Sung, N.Y., Choi, J.I., Lim, S.T., Kim, K.H., Yook, H.S., Byun, M.W. & Lee, J.W. (2008). Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of β -glucan. *Radiation Physics and Chemistry*, 77, 781–786.
- CAC (Codex Alimentarius Commission). (2003). Codex general standard for irradiated foods. CODEX STAN 106-1983. Rev. 1-2003.

Références bibliographiques

- Cagri, A., Ustunol, Z. & Ryser, E.T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, 6(6), 865–870.
- Caillet, S., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2006) Evaluation of antiradical properties of grape phenol extracts by a fast colorimetric method, *Journal of Food Chemistry*,95(1),1-18.
- Caner, C., Vergano, P.J and Wiles, J.L. (1998).Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science*, 63, 1049–1053.
- Cao, N., Fu, Y. & He, J. (2007a). Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21, 575–584.
- Cao, N., Fu, Y. & He, J. (2007b). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1153–1162.
- Cao, N., Yang, X. & Fu, Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 729-735.
- Carvalho, R.A. & Grosso, C.R.F. (2004). Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*, 18, 717–726.
- Carvalho, R.A., Sobral, P.J.A., Thomazine, M., Habitante, A.M.Q.B., Gime´nez, B. & Go´mez-Guille´n, M.C.(2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 1117-1123.
- Casimiro, M.H., Gil, M.H. & Leal, J.P. (2010). Suitability of gamma irradiated chitosan based membranes as matrix in drug release system. *International Journal of Pharmaceutics*, 395, 142–146.
- Cerqueira, M.A., Souza, B.W., Teixeira, J.A., & Vicente, A.A. (2012). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 175-184.
- Cha, D.S., Choi, J.H., Chinnan, M.S. & Park, H.J. (2002). Antimicrobial films based on Na-alginate and κ-carrageenan. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology*, 35, 715–719.
- Chambi, H. & Grosso, C.(2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458–466.
- Chatelet, C., Damour, O. & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan Films. *Biomaterials*, 22, 261-268.
- Cheah, L.H., Page, B.B.C. & Shepherd, R. (1997).Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots. *New Zealand Journal of Crop Horticulture Science*, 25, 89-92.
- Chen, C.H., Wang, F.Y., Mao, C.F., Liao, W.T., Hsieh, C.D. (2008). Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 37–42.
- Chen, J.L and Zhao, Y. (2012). Effect of Molecular Weight, Acid, and Plasticizer on the Physicochemical and Antibacterial Properties of β-Chitosan Based Films. *Journal of Food Science*, 77(5), 127-136.
- Chen, M., Yeh, G.H. & Chiang, B. (1996). Antimicrobial and physicochemical properties of methycellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation*,. 20: 379-390.
- Chen, Y.C., Yu, S.H., Tsai, G.J., Tang, D.W., Mi, F.L., Peng, Y.P. (2010). Novel technology for the preparation of self-assembled catechin/gelatin nanoparticles and their characterization, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6728–6734

Références bibliographiques

- Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24, 2871–2880.
- Chiono, V., Pulieri, E., Vozzi, G., Ciardelli, G., Ahluwalia, A., Giusti, P. (2008). Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Material Science: Material Medecine*, (19), 889–898.
- Chiou, B.S., Avena-Bustillos, R.J., Bechtel, P.J., Imam, S.H., Glenn, G.M., Orts, W.J. (2009). Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. *Journal of Food Engineering*, 95, 327–331.
- Chiou, B.S., Avena-Bustillos, R.J., Bechtel, P.J., Jafri, H., Narayan, R., Imam, S.H., Glenn, G.M. & Orts, W.J. (2008). Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. *European Polymer Journal*, 44, 3748–3753.
- Ciesla, K., Salmieri, S. & Lacroix, M. (2006). Modification of the properties of milk protein films by gamma radiation and polysaccharide addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (6), 908–914.
- Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Ó John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000. R.A. Meyers (Ed.) pp. 10815–10837.
- Cofré, D.C., Azócar, M.I., Páez, M., Enrione, J. & Matiacevich, S. (2012). Influence of Glassy or Rubbery State on the Antimicrobial Activity of Chitosan-gelatin Films. *Journal of Food Research*, 1(4), 184-193.
- Coughlan, K., Shaw, N.B, Kerry, J.F., Kerry, J.P. (2004). Combined effect of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate based edible films. *Journal of Food Science*, 69(6), 271–275.
- Crank, J. (1975). *The mathematics of diffusion*. Brunel University Uxbridge. Second edition. Oxford University Press, Ely House, London W.I. pp. 56-57.
- Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J. L. & Guilbert, S. (1995b). Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties, *Journal of Food Science*, 60, 1369–1374.
- Cuq, B., Gontard, N. & Guilbert, S. (1995a). Edible films and coatings as active layers. In: *Active Food Packagings*. Rooney M.L. (Ed), Blackie Academic & Professional, Glasgow, 111-142.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L. & Guilber, S. (1996). Functional properties of myofibrillar protein based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, 61, 580–584.
- Debeaufort, F. (1994). Etude des Transferts de Matière au Travers de Films d’emballages. Perméation de l’eau et de substances d’arôme en relation avec les propriétés physicochimiques de films comestibles. Thèse de doctorat, ENSBANA, Université de Bourgogne, France.
- Debeaufort, F. and Voilley, A. (1997). Methylcellulose-based edible films and coatings: 2. Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer content. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 45, 685–689.
- Debeaufort, F., Martin-Polo, M. & Voilley, A. (1993). Polarity, homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *Journal of Food Science*, 58, 426–434.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A. & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow’s packagings : a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299-313.
- Debeaufort, F., Teson, N. & Voilley, A. (1995). Aroma compounds and water vapour permeability of edible and polymeric packagings. In: *Food And Packaging Materials – Chemical Interactions*, Ackermann P., Jagerstad M., Ohlsson T. (Eds.), The Royal Society, Cambridge, 169-175.

Références bibliographiques

- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A., Delporte, B. & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*, 180, 47-55.
- DeKerf, M.D., Mondelaers, W., Lahorte, P., Vervaeet, C., & Remon, J. P. (2001). Characterisation and disintegration properties of irradiated starch. *International Journal of Pharmaceutics*, 221, 69–76.
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. & Masi, P. (2006). Chitosan-whey protein edible films produced in the presence of transglutaminase: analysis of their and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7, 744-749.
- Dickinson, E. and Galazka, V. B. (1991). Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 5(3), 281–296.
- Dickinson, E. and Pawlowski, K. (1996). Effect of high-pressure treatment of protein on the rheology of flocculated emulsions containing protein and polysaccharide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2992-3000.
- Dima, C., Gitin, L., Alexe, P. & Dima, S. (2013). Encapsulation of coriander essential oil in alginate and alginate/chitosan microspheres by emulsification external gelation method. *Inside Food Symposium*, 9-12 April, Leuven, Belgium.
- Du, W.X., Avena-Bustillos, R.J., Hua, S.S.T. & McHugh, T.H. (2011). Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* A Méndez-Vilas (Ed.) 1124-1134.
- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173–1182.
- Elsabee, M.Z., Abdoub, E.S., Nagy, K.S.A. & Eweisc, M. (2008). Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 187-195.
- El-Sawy, N.M., Abd El-Rehim, H.A., Elbarbary, A.M. & Hegazy, E.S.A. (2010). Radiation-induced degradation of chitosan for possible use as a growth promoter in agricultural purpose. *Carbohydrate Polymers*, 79, 555–562.
- Elzoghby, A.O. (2013). Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research. *Journal of control release*, 172(3), 1075-1091.
- Embuscado, M.E. (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Materials and Process Technology School of Food Science. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp-43-59.
- Fabra, M.J., Chambin, O., Voilley, A., Gay, J.P., Debeaufort, F. (2012). Influence of temperature and NaCl on the release in aqueous liquid media of aroma compounds encapsulated in edible films. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 30–36.
- Fabra, M.J., Hambleton, A., Talens, P., Debeaufort, F. & Chiralt, A. (2011). Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(6) 1441-1447.
- Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. (2008). Effect of alginate and k-carrageenan on tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate–lipid based films. *Carbohydrate Polymers*, 74. 419–426.
- Fan, J.M., Ma, W., Liu, G.Q., Yin, S.W., Tang, C.H. & Yang, X.Q. (2014). Preparation and characterization of kidney bean protein isolate (KPI) chitosan (CH) composite films prepared by ultrasonic pretreatment. *Food Hydrocolloids*, 36, 60- 69.
- Farkas, J. (2004). Food irradiation. In A. Mozumder, & Y. Hatano (Eds.), *Charged particle and photon interactions with matter* (pp. 785–812). New York: Marcel Dekker.

Références bibliographiques

- Farkas, J. (2006). Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 148–152.
- Farris, S., Schaich, K.M., Liu, L.S., Cooke, P.H., Piergiorganni, L. & Yam, K.L. (2011). Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 25, 61-70.
- Farris, S., Schaich, K.M., Liuc, L.S., Piergiorganni, L. & Yam, K. L.(2009). Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 20, 316-332.
- Fennema, O., Donhowe, I.G. & Kester, J.J. (1994). Lipid type and location of the relative humidity gradient influence on the barrier properties of lipids to water vapor. *Journal of Food Engineering*, 22, 225-239.
- Fennema, O.R., Donhowe, I.G. & Kester, J.J. (1993). Edible films: barriers to moisture migration in frozen foods. *Food Australia*, 45, 521-525.
- Ferreira, C.O., Nunes, C.A., Delgadillo, I.J. & Lopes-da-Silva, A. (2009). Characterization of chitosan whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42, 807-813.
- Fonkwe, L.G., Narsimhan, G., & Cha, A.S. (2003). Characterization of gelation time and texture of gelatin and gelatinepolysaccharide mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 871-883.
- Forbes, W.F. & Sullivan, P.D. (1966). The effect of radiation on collagen. *Biochemical and Biophysical Acta*, 120, 222-228.
- Fowkes, F.M. (1964). Attractive forces at Interfaces. *Industrial Engineering Chemistry*, 56(12).40-52.
- Friedman, M., Zhu, L., Fienstein, Y. & Ravishankar, S. (2009). Carvacrol facilitates heat induced inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and inhibits formation of heterocyclic amines in grilled ground beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1848-1853.
- Friess, W. (1998). Collagen-material for drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 113–136.
- Gaibal, E. & Vincent, T. (2007). Adsorption d'ions métalliques sur chitosane et produits dérivés dans : Traitement des épurations des eaux industrielles polluées, coordonné par G Crini et PM Badot. Presses Universitaires de Franche-Comté. Chapitre 4, 137.
- Galiotta, G., Gioia, LD., Guilbert, S.B. & Cuq, B. (1998) Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, 81, 3123–3130.
- Gallo, J.A.Q., Debeaufort, F. & Voilley, A. (1999). Interactions between Aroma and Edible Films. 1. Permeability of Methylcellulose and Low-Density Polyethylene Films to Methyl Ketones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 108-113.
- Galus, S., Lenart, A., Voilley, A. & Debeaufort, F. (2013). Effect of oxidized potato starch on the physicochemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Food Technology and Biotechnology*, 51(3), 403–409.
- Garcia, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2000). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65, 941-947.
- Garcia, M.A., Pinotti, A. & Zaritzky, N.E.(2006). Physicochemical, water vapour barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co*, 58, 453-463.
- Gennadios, A. (2002). Protein-based edible films and coatings. CRC Press, Lancaster, pp 890
- Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Park, J.W., Weller, C.L & Testin, R.F. (1994). Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolates films. *Indust Crops Prod*, 2, 189–195.
- Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Park, J.W., Weller, C.L., Testin, R.F. (1993). Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. *Industrial Crops and Products*. 2, 189-195.

Références bibliographiques

- Gennadios, A., Rhim, J.W., Handa, A., Weller, C.L. & Hanna, M.A. (1998). Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. *Journal of Food Science*, 63(2), 225–228.
- Ghorpade, V.M., Li, H., Gennadios, A. & Hanna, M.A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Transactions of the ASAE*, 38, 1805–1808.
- Ghoshal, S., Khan, M.A., Noor, F. G. & Khan, R. A. (2009). Gamma radiation induced biodegradable shellac films treated by acrylic monomer and ethylene glycol. *Journal of Macromolecular Science, Part A. Pure and Applied Chemistry*, 46, 975–982.
- Gobbetti, M., Di Cagno, R. & de Angelis, M.(2010). Functional microorganisms for functional food quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 716-727.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. & Montero P.(2010).Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27, 889-896.
- Gómez-Estaca, J., Lopez-de-Dicastillo, C., Hernandez-Munoz, P., Catala, R. & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F. & GómezGuille'n, M.C. (2009). Physico-chemical and film forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 480-486.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B. & Gómez-Guillén, M.C. (2007).Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. 105, 511-520.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B. López-Caballero M.E., Montero, M.P. (2011).Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25, 1813-1827.
- Gomez-Guillen, M.C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A. & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1133-1143.
- Gómez-Guillen, M.C., Turnay, J., Fernandez-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A. & Montero, P.(2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 25-34.
- Gontard, N. & Gorris, G.M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings, *LWT- Food Science and Technology*, 29, 10–17.
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J.L. & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 29, 39-50.
- Gontard, N., Guilbert, S. & Cuq, J.L. (1992). Edible wheat gluten: influence of the main process variables in film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190-199.
- Gontard, N., Guilbert, S. & Cuq, J.L. (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.
- Gounga, M.E., Xu, S.Y., Wang, Z. (2007). Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering* 83 (4), 521–530.
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 435-448.

Références bibliographiques

- Grevellec, J., Marquié, C., Ferry, L., Crespy, A. & Vialettes, V. (2001). Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomaterials*, 2(4), 1104-1109.
- Guilbal, E. and Vincent, T. (2007). Adsorption d'ions métalliques sur chitosan et produits dérivés, in *Traitement des épurations des eaux industrielles polluées*, Presses Universitaires de Franche-Comté, Editor.
- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. In: *Food Packaging and Preservation, theory and practice*. Mathlouthi, M., Ed.; Elsevier Applied Science, London, U.K., 371-394.
- Guilbert, S., Cuq, B. (1998). Les Films et Enrobages Comestibles. In : *L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation ; Multon J.L., Bureau G. (Eds.)*, Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 472-530.
- Hagenmaier, R.D and Shaw, P.E. (1990). Moisture permeability of edible films made with fatty acid and hydroxypropyl methylcellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1799–1803.
- Hambleton, A., Perpiñan-Saiz, N., Fabra, M.J., Voilley, A. & Debeaufort, F. (2012). The Schroeder paradox or how the state of water affects the moisture transfer through edible films. *Food Chemistry*, 132, 1671–1678.
- Han, C., Lederer, C., McDaniel, M. & Zhao, Y. (2005). Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. *Journal of Food Science*, 70, 173- 178.
- Han, J.H. & Floros, J.D., (1998). Simulating diffusion model and determining diffusivity of potassium sorbate through plastic to develop antimicrobial packaging films. *Journal of Food Processing and Preservation* 22 (2), 107–122.
- Hashmi, M.S.J. (2014). *Comprehensive materials processing*. Elsevier, Oxford OX5, ISG, LIK.
- Hatfield, R.D., Ralph, J. & Grabber, J.H. (1999). Cell wall cross linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of Science, Food and Agriculture*, 79, 403–407.
- Hattori, M., Yang, W. & Takahashi, K. (1995). Functional Changes of carboxymethyl potato Downloaded by starch by conjugation with whey proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2007– 2011.
- Hernandez-Mun, P., Villalobos, R. & Chiralt, A. (2004). Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocolloids*, 18, 403–411.
- Hessen, M., Meter, H. & Zeeh B. (1997). *Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique*. 2^{ème} éd., Masson, Paris, p.1-48.
- Hood, L.L. (1987). Collagen in sausage casings. *Advanced Material Research*, 4, 109-129.
- Hopkins, M.J., Englyst, H.N., Macfarlane, S., Furrer, E., Macfarlane, G.T. & McBain, A.J. (2003). Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. *Applied Environment and Microbiology*, 69(11), 6354–6360.
- Hoque, M.S., Benjakul, S. & Prodpran, T. (2010). Effect of heat treatment of film forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering*, 96(1), 66- 73.
- Hoque, M.S., Benjakul, S. & Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, 25, 1085-1097.
- Horvathova, K., Novotry, L., Tothova, D., and Vachalkova, A. (2004). Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H₂O₂-treated human ML cells K562. *Neoplasma*, 51(5), 395-399.

Références bibliographiques

- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M. & Ghavi, F.F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136, 1490–1495.
- Hua, S.S.T., Du, W.X., Avena-Bustillos, R.J. & McHugh, T.H. (2011). Novel approach to inhibit the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production by essential oil edible film. 111th General Meeting American Society for Microbiology. New Orleans, A, May 21-24, (Abstract no: 11-GM-A-2474-ASM).
- Ibarguren, C., Vivas, L., Bertuzzi, M.A., Apella, M.C. & Audisio, M.C. (2010). Edible films with anti-*Listeria monocytogenes* activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1443–1449.
- Iijimaa, M., Nakamura, K., Hatakeyama, T. & Hatakeyamab, H.(2000). Phase transition of pectin with sorbed water . *Carbohydrate Polymer*, 41, 101 – 106.
- Inamura, P.Y., Kraide, F.H., Drumond, W.S., deLima, N.B. Moura, E.A.B. & delMastro, N.L. (2013). Ionizing radiation influence on the morphological and thermal characteristics of a biocomposite prepared with gelatin and Brazil nut wastes as fiber source. *Radiation Physics and Chemistry*, 84, 66–69.
- Introzzi, L., Fuentes-Alventosa, J.M., Cozzolino, C.A., Trabattoni, S., Tavazzi, S., Bianchi, C.L., Schiraldi, A., Piergiovanni, L. & Farris, S. (2012). Wetting Enhancer Pullulan Coating for Antifog Packaging Applications. *Applied Materials and Interface*. 4, 3692–3700.
- Islam, M.M., Masum, S.M., Molla, M.A.I., Rahman, M.M., Shaikh, A.A. & Roy, S.K. (2011). Preparation of Chitosan from Shrimp Shell and Investigation of Its Properties. *Intenational Journal of Basic & Applied Sciences* 11 (1), pp. 116-130.
- ISO 527-3:1995. Determination of tensile properties (Part 3). Test conditions for films and sheets
- ISO/ASTM. (2004). Standards, 51204 Practice for dosimetry in gamma irradiation facilities for food processing.
- Jacquot, C. (2006). Chitosan, in *Actifs et additifs en cosmétologie*, M.C. Martini and M. Seiller, Editors. Lavoisier Tec&Doc: Paris. p. 315-333.
- Jagannath, J.H., Nanjappa, C., Das Gupta, D.K & Bawa, A.S. (2003). Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 88, 64–71.
- Jayakumar, R., Reis, R.L., and Mano, J.F. (2007). Synthesis and characterization of pH-sensitive thiol containing chitosan beads for controlled drug delivery applications. *Drug delivery*, 14(1) 9-17.
- Jiang, B., Wu, Z., Zhao, H., Tang, F., Lua, J., Weia, Q. & Zhang, X. (2006). Electron beam irradiation modification of collagen membrane. *Biomaterials*, 27, 15–23.
- Jiang, Y and Y. Li. (2001). Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, 73, 139-143.
- Jo, C., Kang, H., Lee, N. Y., Kwon, J. H. & Byun, M. W. (2005). Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. *Radiation Physics and Chemistry*, 72, 745–750.
- Jones, B.E. (1987). In *Hard Capsules Development and Technology*, K. Ridgway, ed., pp. 41-42, The Pharmaceutical Press, London. (11) Stickley, F.L. 1987.
- Jridi, M., Hajji, S., Ben Ayed, H., Lassoued, I., Mbarek, A., Kammoun, M., Souissi, N. and Nasri, M.(2014). Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 373–379
- Jung, D.C., Lee, S.Y., Yoon, J.H., Hong, K.P., Kang, J.S., Park, S.R., Park, S.K., Ha, S.D., Kim, G.H. & Bae, D.H. (2009). Inhibition of pork and fish oxidation by a novel plastic film coated with horseradish extract. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 856-861.

Références bibliographiques

- Kamper, S.L. and Fennema, O. (1985). Use of an edible film to maintain water vapor gradients in food. *Journal of Food Science*, 50, 382-384.
- Kanatt, S.R., Chander, R. & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107, 845-852.
- Karakirova, Y. & Yordanov, N.D. (2010). EPR and UV spectrometry investigation of sucrose irradiated with carbon particles. *Radiation Measurements*, 45, 831-835.
- Karbowiak, T., Debeaufort, F., Champion, D. & Voilley, A. (2006). Wetting properties at the surface of iota-carrageenan based edible films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 294, 400-410.
- Karim, A.A and Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges and prospect as an alternative to mammalian gelatins. *Food hydrocolloids*, 23, 563-576.
- Kaul, G. and Amiji, M. (2002). Long-circulating poly (ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery, *Pharmaceutical Research*, 19, 1062-1068.
- Kavoosi, G., Rahmatollahi, A., Mahdi Dadfar, S.M, Purfard, A.M.(2014). Effects of essential oil on the water binding capacity, physic-mechanical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin films. *LWT - Food Science and Technology*, 57,556-561.
- Kayserioglu, B.S., Bakir, U., Yilmaz, L. & Akkas, N. (2003). Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. *Bioresource Technology*, Vol. 87, 3, (May 2003), pp. (239-246), ISSN 0960-8524
- Khalil, S.A.H., Nixon, J.R., and Carless, J.E. (1968). Role of pH in the coacervation of the systems: gelatin-water-ethanol and gelatinwater- sodium sulfate, *Journal of Pharmaceutical and Pharmacology*, 20, 215-225.
- Kim, J.K., Jo, C., Park, H.J. & Byun, M.W. (2008). Effect of gamma irradiation on the physicochemical properties of a starch-based film. *Food Hydrocolloids*, 22, 248-254.
- Ko, S., James, M.E., Hettiarachchy, N.S. & Johnson, M.G. (2001). Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 66(7):1006-1011.
- Koelsch, C.M and Labuza, T.P. (1992). Functional, physical and morphological properties of methyl cellulose and fatty acid-based edible barriers. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 25, 404-411.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Hambleton, A., Lenart, A. & Voilley A. (2010b). Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 11, 503-510
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A. & Voilley, A. (2010a). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, 20: 53-60.
- Kołodziejska, I and Piotrowska, B.(2007).The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, 103, 295-300
- Kozlov, P.V. and Burdygina, G.I. (1983). The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* 24, 651-666.
- Krochta, J.M. and C. Mulder-Johnston. (1997). Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61-74.
- Krochta, J.M.(1992).Control of mass transfer in food with edible coatings and films. In: *Advances in Food Engineerin"*, Singh R.P., Wirakartakusumah M.A., (Eds), CRC Press, Boca Raton, 517.

Références bibliographiques

- Kuana, Y.H., Bhata, R., Patrasb, A. & Karim, A.A. (2013). Radiation processing of food proteins - A review on the recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 105-120.
- Kuijpers, A.J., Engbers, G.H., Krijqsveld, J., Zaat, S.A., Dankert, J. & Feijen, J. (2000). Crosslinking and characterization of gelatin matrices for biomedical applications. *Journal of Biomaterials science, Polymer Edition*, 11(3), 225-243.
- Kunte, L.A, Gennadios, A, Cuppett, S.L, Hanna, M.A and Weller, C.L. (1997). Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74(2), 115-118.
- Kurek, M., Brachais, C.H., Nguimjeu, C.M., Bonnotte, A., Voilley, A., Galic, K, Couvercelle, J.P and Debeaufort, F. (2012c). Structure and thermal properties of a chitosan coated polyethylene bilayer film. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 1232-1240
- Kurek, M., Brachais, C.H., Ščetar, M., Voilley, A., Galić, K., Couvercelle, J.P. & Debeaufort, F. (2013). Carvacrol affects interfacial, structural and transfer properties of chitosan coatings applied onto polyethylene. *Carbohydrate Polymers*, 97(1), 217-225.
- Kurek, M., Descours, E., Galic, K., Voilley, A. & Debeaufort, F.(2012a). How composition and process parameters affect volatile active compounds in biopolymer films. *Carbohydrate Polymers*, 88, 646– 656
- Kurek, M., Scetar, M., Voilley, A., Galic, K. & Debeaufort, F. (2012b). Barrier properties of chitosan coated polyethylene. *Journal of Membrane Science*, 403– 404, 162–168.
- Kwok, K. C. & Ou, S. Y. (2002). Effect of ferulic acid on water vapor and gas permeability of soy protein isolate based film. *Science and Technology of Food Industry*, 23, 24–26.
- LaCoste, A., Schaich, M., Zumbrennen, D., Yam, K.L., (2005). Advancing controlled release packaging through smart blending. *Packaging Technology and Science* 18 (2), 77–87.
- Lacroix, M., Le, T.C., Ouattara, B., Yu, H., Letendre, M., Sabato, S.F., Mateescu, M.A., & Patterson, G. (2002). Use of gamma irradiation to produce films from whey, casein and soy proteins: Structure and functional characteristics. *Radiation Physics Chemistry*, 63, 827–832.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-82.
- Lang, G. and Clausen, T. (1989). The use of chitosan in cosmetics. In: Skjak-Braek, G., Thorleif Anthosen, T., Standford, P. (Eds.), *Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 139–147.
- Larré, C., Desserme, J., Barbot, J. & Gueguen, J. (2000). Properties of deamidated gluten films enzymatically cross-linked. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5444–5449.
- Latha, M.S., Rathinam, K., Mohanan, P.V., Jayakrishnan A. (1995). Bioavailability of theophylline from glutaraldehyde cross- linked microspheres in rabbits following oral administration, *Journal Controlled Release* 34, 1–7.
- Lazaridou, A and Biliaderis, C.G. (2002). Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers*, 48 (2), 179-190
- Le, C., Letendre, M. and Ispas-Szabo. (2000). Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5566–5575.
- Lee, K.Y., Shim, J. & Lee, H.G. (2004). Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers*, 56 (2), 251–254.

Références bibliographiques

- Lee, S.J. and Rosenberg, M.(1999). Preparation and properties of glutaraldehyde crosslinked whey protein-based microcapsules containing theophylline. *Journal of Controlled Release*, 61, 123-136.
- Lee, S.L., Lee, M.S. & Song, K.B. (2005). Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films. *Food Chemistry*, 92, 621–625.
- Letendre, M., D’Aprano, G., Lacroix, M., Salmieri, S. & St-Gelais, D. (2002). Physicochemical properties and bacterial resistance of biodegradable milk protein films containing agar and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6017–6022.
- Letendre, S.L., Capparelli, E.V., Ellis, R.J. & McCutchan, J.A. (2000).The HIV Neurobehavioral Research Center Group (2000) Indinavir population pharmacokinetics in plasma and cerebrospinal fluids. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44, 2173-2175.
- Li, B., Kennedy, J.F., Jiang, Q.G., & Xie, B.J. (2006).Quick dissolvable, edible and heatsealable blend films based on konjac glucomannane gelatin. *Food Research International*, 39, 544-549.
- Li, B., Li, J., Xia, J., Kennedy, J.F., Yiea, X., Liu, T.G. (2011). Effect of gamma irradiation on the condensed state structure and mechanical properties of konjac glucomannan/chitosan blend films. *Carbohydrate Polymers*, 83, 44–51
- Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J. & Liu, C.S. (2009). Microencapsulation of probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. *Journal of Microencapsulation*, 26(4), 315-324.
- Lian, W., Hsiao, H. & Chou, C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 79-86.
- Lima, C.G. A., de Oliveira, S., Figueiro, D., Wehmann, C. F., Goes, J. C. & Sombra, A.S.B. (2006). DC conductivity and dielectric permittivity of collagen chitosan films. *Materials Chemistry and Physics*, 99, 284-288.
- Lin, D., Zhao, Y.Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6 (3), 60–75.
- Liu, L., Liu, C.K., Fishman, M. L. & Hicks, K.B. (2007). Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2349-2355.
- Liu, Z., Ge, X., Lu, Y., Dong, S., Zhao, Y. & Zeng, M. (2012). Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids*, 26, 311-317.
- Longares, A., Monahan, F.J., O’Sullivan, M. & O’Riordan, E.D. (2004).Physical properties and sensory evaluation of WPI films of varying thickness. *LWT- Journal of Food Technology*, 37(5), 545–550.
- Ma, W., Tang, C.H., Yang, X.Q. & Yin, S.Y. (2013). Fabrication and characterization of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate-chitosan composite films at acidic pH. *Food Hydrocolloids*, 31,237-247.
- Mahmoud, R. and Savello, P. (1992).Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein films. *Journal of Dairy Science*, 75,942–946.
- Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M.H. & Karim, A.A. (2007). Antimicrobial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch-alginate edible films containing lemongrass oils. *Journal of Food Science*, 72, 324– 330.
- Mali, S., Grossmann, M.V., García, M.A., Martino, M.N, Zaritzky, N.E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50, 4, 379–386.
- Mali, S., Grossmann, M.V., Garcia, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2004).Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56: 129-135.

Références bibliographiques

- Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P., & Porta, R. (2003). Preparation and mechanical properties of edible pectin–soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 102(2), 191–198.
- Mark, J.E. (1999). In *Polymer Data Handbook*. Oxford University Press.
- Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Vicente A.A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27, 220-227
- Martucci, J.F and Ruseckaite, R.A (2009). Tensile properties, barrier properties and biodegradation in soil of compression emolded gelatine starch dialdehyde films. *Journal of Applied Polymer Science*, 112, 2166-2178.
- Mathew, S. & Abraham, T.E. (2008). Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826–835.
- Maturana, A.Y. & Pagliuso, J.D. (2011). Thermal decomposition behavior of crude glycerin. 21st Brazilian Congress of Mechanical Engineering, October 24-28, 2011, Natal, RN, Brazil.
- McCormick, K.E., Han, I.Y., Acton, J.C., Sheldon, B.W., Dawson, P.L. (2005). In-package Pasteurization Combined with Biocide-impregnated Films to Inhibit *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in Turkey Bologna. *Journal of Food Science*, 70, 52-57.
- McHugh, T.H. and Krochta, J.M. (1994). Milk-protein-based edible films and coatings. *Food Technology*, 48 (1), 97-103.
- McHugh, T.H., Avena-Bustillos, R. & Krochta, J.M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*. 58 (4): 899–903.
- Mei, Y., Zhao, Y., Yang, Y. & Furr, H.C. (2002). Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *Journal of Food Science*, 67, 1964-1968.
- Mezgheni, E., Vachon, C. & Lacroix, M. (1998). Biodegradability behaviour of crosslinked calcium caseinates films. *Biotechnology Progress*, 14, 534-536.
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M. H., & Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2948–2953.
- Möller, H., Grelier, S., Pardon, P. & Coma, V. (2004). Antimicrobial and Physicochemical properties of chitosan-HPMC based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6585-6591.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M. & and Voilley, A. (2002). Factor affecting the moisture permeability of lipid-based edible films. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 42(1): 67-89
- Morr, C.V. and Ha, E.Y.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 33, 431-476.
- Mu, C., Guo, J., Li, X., Lin, W. & Li, D. (2012). Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. *Food Hydrocolloids*, 27, 22-29.
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Harris, P.J. & Curzon, E.H. (1986). Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research*, 148: 71–85.
- Muller, C.M.O., Laurindo, J.B. & Yamashita, F. (2009). Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. *Food Hydrocolloids*, 23, 1328-1333.
- Muyonga, J.H., Cole, C.G. B. & Duodu, K.G. (2004). Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 581–592.
- Nagahama, H., Maeda, H., Kashiki, T., Jayakumar, R., Furuike, T. & Tamura, H. (2009). Preparation and characterization of novel chitosan/ gelatin membranes using chitosan hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 76, 255-260.

Références bibliographiques

- Natrajan, N. and Sheldon, B.W. (2000). Inhibition of Salmonella on poultry skin using protein- and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1268–1272.
- Neto, C.G.T., Giacomettib, J.A, Jobb, A.E., Ferreirab, F.C, Fonsecaa, J.L.C. & Pereiraa, M.R. (2005). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, 62, 97–103.
- NF EN ISO-25 28. (2001-09). Détermination du coefficient de transmission de la vapeur d'eau. Produits en feuilles. Méthode gravimétrique.
- NF EN ISO-25 56. (2001-02). Détermination du coefficient de transmission d'un gaz par les feuilles et plastique minces, sous pression atmosphérique. Méthode manométrique.
- Nickerson, M.T., Farnworth, R., Wagar, E., Hodge, S.M., Rousseau, D. & Paulson, A.T. (2006). Some physical and microstructural properties of genipin-crosslinked gelatine maltodextrin hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38, 40-44.
- Nikolova, K., Panchev, I. & Sainova, S. (2005). Optical characteristics of biopolymer films from pectin and gelatin. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 7, 1439-1444
- Nisperos-Carriedo, M.O.(1994). Edible coatings and films based on polysaccharides. In: *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Krochta J.M., Baldwin E.A., Nisperos- Carriedo M.O. (Eds.) Technomic Publishing Compagny, Lancaster, 305-335.
- Norton, I.T. and Frith, W.J. (2001). Microstructure design in mixed biopolymer composites. *Food Hydrocolloids*, 15, 543–553.
- Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S., Yamamoto, K. & Peck, G.E. (2001). Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(2), 143–157
- Nur Hanani, Z.A., McNumara, M., Ross, Y.H. & Kerry, J. P. (2013). Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin based composite films. *Journal of Food Hydrocolloids*, 31, 264-269.
- Nuthong, P., Benjakul, S. & Prodpran, T. (2009). Characterization of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 143–148
- Oguzlu, H. & Tihminlioglu, F. (2010). Preparation and barrier properties of chitosan-layered silicate nanocomposite films. *Macromolecular Symposia*, 298, 91–98.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., & Hosseini, S.M.H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122, 161-166.
- Olabarrieta, I., D. Forsström, U.W. Gedde and M.S. Hedenqvist. (2001) Transport properties of chitosan and whey blended with poly (ϵ -caprolactone) assessed by standard permeability measurements and microcalorimetry. *Polymer*, 42, 4401-4408.
- Olivas, G.I. & Barbosa-Canovas, G.V.(2008). Alginate-calcium films: Water vapour permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity, *LWT-Food Science and Technology*, 41, 359–366.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. & Rigal, L. (2002). Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*, 43, 5417–5425.
- Ose's, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Toma's, S. A., Cruz- Orea, A. & Mate', J. I.(2009). Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering*, 92, 56-62.

Références bibliographiques

- Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C. & Jackson, M. G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate, *Journal of Food Engineering*, 70, 205–210.
- Ouattara, B., Canh, L.T., Vachona, C., Mateescu, M.A., & Lacroix, M. (2002). Use of g-irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 821–825.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A., and Holley, R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal Food Microbiology*, 62,139–148.
- Oudgenoeg, G., Hilhorst, R., Piersma, S. R., Boeriu, C. G., Gruppen, H., Hessing, M., et al. (2001). Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2503-2510.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L and Lacroix, M. (2006). Antimicrobial Effects of Alginate-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. *Journal of Food Protection*, 69 (10), 12-17.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L and Lacroix, M. (2007). Antimicrobial Effects of Alginate-Based Films Containing Essential Oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* Present in Bologna and Ham. *Journal of Food Protection*.4 (8), 901-908.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 5598-5605
- Owens, D.K. & Wendt, R.C. (1969) Estimation of the surface free energy of polymers, *Journal of Applied Polymer Science*, 13, 1741-1747.
- Ozdemir, M. and Floros, J.D. (2003). Film composition effects on diffusion of potassium sorbate through whey protein films. *Journal of Food Science* 68, 511–516.
- Özge, Z.E and Turhan, K.N. (2005). Barrier and Mechanical Properties of Methylcellulose–Whey Protein Films. *Packaging technology and Science*, 18, 295-302.
- Padgett, T., Han, I.Y. & Dawson, P.L. (2000). Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 24,423–432.
- Park, H.J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits, *Trends in Food Science and Technology*, 10, 254–260.
- Park, H.J. and Chinnan, M.S. (1990). Properties of edible coatings for fruits and vegetables. Paper No. 90-6510 presented at the International Winter Meeting, American Society of Agricultural Engineers, Chicago, Ill, December 18-21.
- Park, S.I., Zhao, Y.(2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1933-1939.
- Park, S.Y., Lee, B.I. Jung, S.T. & Park, H.J. (2001) Biopolymer composite film based on κ -carrageenan and chitosan. *Material Research Bulletin*, 36, 511-519.
- Parris, N. and Coffin, D.R. (1997). Composition factors affecting the water vapour permeability and tensile properties of hydrophilic zein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (5), 1596–1599.
- Parris, N., Coffin, D.R., Joubran, R. F. & Pessen, H.(1995). Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1432–1435.

Références bibliographiques

- Pasanphan, W., Rimdusit, P., Choofong, S., Piroonpan, T. & Nilsuwankosit, S. (2010). Systematic fabrication of chitosan nanoparticle by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(10), 1095–1102.
- Pena, C., delaCaba, K., Eceiza, A., Ruseckaite, R., & Mondragon, I. (2010) Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *BioResource. Technology*, 101(17), 6836–6842.
- Peng, Y and Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36,287-293.
- Pentimalli, M., Capitani, D., Ferrando, A., Ferri, D., Ragni, P., Segre, A.L. (2000). Gamma irradiation of food packaging materials: an NMR study. *Polymer* 41, 2871–2881.
- Pereda, M., Amica, G. & Marcovich, N.E. (2012).Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1318–1325.
- Pereda, M., Ponce, A.G. Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A., Martucci, J.F.(2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25, 1372-1381.
- Perez-Gago, M.B and Krochta, J.M. (2000).Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein–lipid emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7):2687-2692.
- Perkasa, D.P, Darmawan, E., and Rasyid, A. (2013). Effect of gamma irradiation on mechanical and thermal properties of fish felatin film isolated from Lates calcarifer scales. *Industrial Journal of Chemistry.*, 13 (1), 28–35.
- Peters, E.N. (2003).Introduction to polymer characterization. In: Brady RF, editor. *Comprehensive desk reference of polymer characterization and analysis*. Washington, D.C.: Oxford Univ. Press.
- Phan The D., Debeaufort F., Luu, D. & Voilley A. (2009a). Influence of hydrocolloid nature on the structure and functional properties of emulsified edible films. *Food Hydrocolloids*, 23: 691–699
- Phan The D., Debeaufort, F., Voilley, A and Luu, D.(2009b). Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, 90: 548–558.
- Piotrowska, B., Sztuka, K., Koodziejska, I. & Dobrosielska, E. (2008). Influence of transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-imethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) on the properties of fish-skin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 22, 1362–1371.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT- Food Science and Technology*, 38, 859-865.
- Quezada Gallo, J.A., Debeaufort, F., Callegarin, F. & Voilley, A.(2000).Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science*, 180: 37–46.
- Quijada-Garrido, V., Iglesias-González, V., Mazón-Arechederra, J. M. & Barrales- Rienda, J. M. (2007). The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. *Glass-forming liquids: 1, 2, 3-propantriol (glycerol)*. *Carbohydrate Polymers*, 68, 173-186.
- Ramaprasad, A.T., Rao, V., Sanjeev, G., Ramanani, S.P. & Sabharwal S. (2009). Grafting of polyaniline onto the radiation crosslinked chitosan. *Synthetic Metals*, 159, 1983–1990.
- Ramesh, M.N & Siddalingaiya, G.P. (2006).Edible film and coating based on fructo-oligosaccharides with probiotic properties. Patent Wipo WO/2006/103698.

Références bibliographiques

- Ramnani, S.P., Chaudhari, C.V., Patil, N.D. & Sabharwal, S.J. (2004). Synthesis and characterization of crosslinked chitosan formed by γ -irradiation in the presence of carbontetrachloride as a sensitizer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 3897-3909.
- Rattaya, S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2009). Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. *Journal of Food Engineering*, 95, 151-157.
- Renkema, J.M.S and Van Vliet, T.(2002).Heat-induced gel formation by soy proteins at neutral pH. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 1569-1573.
- Ressouany, M., Vachon, C. & Lacroix, M. (1998). Irradiation dose and calcium effect on the mechanical properties of cross-linked caseinate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1618–1623.
- Rhazi, M., Desbrières, J., Tolaimate, A., Alagui, A. and Vottero, P. (2000). Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *Polymer International*, 49, 337-344.
- Rhim, J. W., Wu, Y., Weller, C.L., & Schnepf, M. (1999a). Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate, *Journal of Food Science*, 64, 149–152.
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C.L. & Hanna, M.A., (1999b). Properties of ultraviolet irradiated protein films. *LWT- Food Science and Technology*, 32, 129–133.
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Cezeirat, C. & Hanna, M.A. (1998). Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products*, 8, 195–203.
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Cezeirat, C., Hanna, M.A. (1998).Soy protein isolate Dialdehyde starch films, *Industrial Crop Production*, 8, 195–203.
- Rinaudo, M.(2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603–632.
- Rivero, S., García, M. A. & Pinotti, A.(2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90, 531–539.
- Rivero, S., García, M.A. & Pinotti, A. (2010). Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82, 270–276.
- Roller, S and N. Covill. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 67–77.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M. & Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science*, 62, 165-177.
- Rose, P.I. (1987). *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd edition, Volume 7.
- Rubin, A.L., Riggio, R.R., Nachman, R.L., Schwartz, G.H., Miyata, T. and Stenzel, K.H. (1968). Collagen materials in dialysis and implantation. *Transactions of the American Society of the Artificial Intelligence Organisation*, 14, 169-174.
- Ryu, S.Y., Rhim, J.W., Roth, H.J., Kim, S.S. (2002). Preparation and physical properties of zein-coated high-amylose corn starch film. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35, 680–686.
- Sabato, S., Nakamurakare, N. & Sobral, P.J. (2007). Mechanical and thermal properties of irradiated films based on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) proteins. *Radiation Physics and Chemistry*, 76, 1862-1865.
- Sahu, A., Rawal, M.K., Sharma, V.K. & Parashar, B. (2009).Microwave assisted Fe (III) catalyzed oxidation of phenol by hydrogen peroxide supported on alumina. *Rasayan Journal of Chemistry*, 2(2), 536-538.
- Sakanashi, Y. (2008). Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: a model experiment. *Life Sciences*, 83,164-169.

Références bibliographiques

- Samant, S.K., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. & Rege, D.V. (1993). Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulation. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 547-562.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82, 277-283.
- Sarasam, A and S.V. Madihally. (2005). Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26, 5500–5508.
- Saravanan, D., Gomathi, T. & Sudha P.N. (2011). Comparative Study of Thermal Stability Using Natural Polymer Blend by Cross Linking. *Archives of Applied Science Research*, 3(6), 342-350.
- Saremnezhad, S., Azizi, M.H., Barzegar, M. Abbasi, S. & Ahmadi, E. (2011). Properties of a new edible film made of faba bean protein isolate, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(2)181–192.
- Savage, P.J. & Savage, G.P. (1994). The Effect of Coating Apples on the Quality of Stored Apples' in *Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand* 19, 129-133.
- Saxena, A., Sachin, K., Bohidar, H.B., Verma, A.K. (2005). Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nanoparticles. *Colloids and surface biointerfaces*, 45, 42-48.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein–polysaccharide complexes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(8), 689–753.
- Schultz, J., Tsutsumi, K. & Donnet, J.B. (1977). Surface Properties of High-Energy Solids I. Determination of the Dispersive Component of the Surface Free Energy of Mica and Its Energy of Adhesion to Water and n-Alkanes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 59(2), 272–276.
- Semenova, M.G. (1996). Factor determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. In *Macromolecular Interactions in Food Technology*, ACS Symposium Series 650: Washington DC, pp 37-49.
- Seng, J.M. (1988). Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, 9, 40-44.
- Shonaike, G.O., Simon, G.P. (1999). *Polymer blends and alloys*. New York: Marcel Dekker, Inc. 745 p.
- Silva, S.S., Goodfellow, B.J., Benesch, J., Rocha, J., Mano, J. F. & Reis, R.L. (2007). Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes. *Carbohydrate Polymers*, 70, 25-31.
- Singh, O.N. and Burgess, D.J. (1989). Characterization of albumin-alginic acid complex coacervation. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, 41, 670-673.
- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C.J. & Wess, T.J. (2004). Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, 25(5), 795-801.
- Sitthphong, S. (2010). Enhancement of mechanical property and stability of shellac by formation of composite polymer with gelatin. PhD thesis, Silpakorn University (1-165)
- Sobral, P.J.A. & Habitante, A.M.Q.B. (2001). Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 377-382.
- Spagna, G., Pifferi, P.G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G. & Palmonari, R. (1996). The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International*, 29, 241–248.
- Srinivasa, P.C., M.N. Ramesh, K.R. Kumar, and R.N. Tharanathan. (2004). Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*. 63, 79-85.

Références bibliographiques

- Stadtman E.R and Levine R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins. *Amino Acids Opening review*, 25,207-218.
- Staroszczyk, H., Sztuka, K., Wolska, J., Wojtasz-Pajak, A., Kołodziejska, I. (2014). Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 707–712.
- Strauss, G. & Gibson, S.M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 81- 89.
- Ström G., Fredriksson M., Stenius P. (1987) Contact angles, work of adhesion, and interfacial tensions at a dissolving hydrocarbon surface. *Journal of Colloid Interface Science*, 119(2), 352–361.
- Su, J.F., Huang, Z., Yuan, X.Y., Wang, X.Y and Li, M. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79, 145–153.
- Sung, H.W., Huang, R.N., Huang, L.L.H., & Tasi, C.C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterial Science*, 10, 63-78.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. & Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68, 408–420
- Suyatma, N.E. (2006). Développement de films biodégradable à base de chitosane, étude du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Thèse, Université de Reims. Champagne Ardennes.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T. & Kawashima, Y. (1996).Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharmaceutical Research*, 13, 896-901.
- Talja, R.A., Helen, H., Roos, Y. & Joupplia, K.(2008) Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, 71,269–276.
- Tang, C. H., Jiang, Y., Wen, Q. B., & Yang, X. Q. (2005). Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates, *Journal of Biotechnology*, 120, 296–307.
- Tang, R., Y. Du, and L. Fan. (2003). Dialdehyde starch-crosslinked chitosan films and their antimicrobial affects. *Journal Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 41, 993-997.
- Tapia, M.S., Rojas-Grau, M.A., Rodrigez, F.J., Ramirez, J., Carmona, A. & Martin-Belloso, O.J. (2007). Alginate and gellan-based edible films for probiotic coating on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*,2, 190-196.
- Taravel, M.N and Domard, A. (1995). Collagen and its interaction with chitosan: II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials* 16(11), 865-871.
- Taylor, M.M., Marmer, W.N. & Brown, E.M.(2005). Characterization of biopolymers prepared from gelatin and sodium caseinate for potential use in leather processing. *Journal of American Leather Chemists Association*, 100, 149–159.
- Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3), 71- 78.
- Tian, F., Decker, E.A. & Goddard, J.M. (2013). Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food and Function*, 2013, 4, 669-680.
- Tin, W.W, Lai, W.C, Shyan, B.K. & Paul, W.H. (2002). Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. *Journal of Controlled Release*. (84), 99–114.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S. & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134 (3) 1571-1579.

Références bibliographiques

- Tuhin, M.O., Rahman, N., Haque, M. E., Khan, R.A., Dafader, N.C., Islam, R., Nurnabi, M. & Tonny, W. (2012). Modifications of mechanical and thermal property of chitosan–starch blend films. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1659–1668.
- Turgeon, S.L and Beaulieu, M.(2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 15, 583–591.
- Turhan, K.N and Sahbaz, F. (2004).Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*. 61: 459–466.
- Turhan, K.N., Sancak, Z.O.E., Ayana, B. & Erdogdu, F. (2007). Optimization of glycerol effect on the mechanical properties and water vapor permeability of whey protein-methylcellulose films. *Journal of Food Process Engineering*, 30, 485-500.
- Ulanski, P. and Rosiak, J. (1992). Preliminary studies on radiation-induced changes in chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 39, 53–57.
- Utracki L.A. (1989). *Polymer blends and alloys*, Hanser, Munich, 121-134.
- Vachon, C., Yu, H.L., Yefsah, R., St-Gelais, D. & Lacroix, M.(2000). Mechanical and structural properties of milk protein edible films cross-linked by heating and γ -irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3202-3209.
- Vanin, F.M., Sobral, P.J.A., Menegalli, F.C., Carvalho, R.A. & Habitante, A.M.Q.B. (2005). Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin based films. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 899-907.
- Vaz, C.M., De Graaf, L.A., Reis, R.L. & Cunha, A.M. (2003). Effect of crosslinking, thermal treatment and UV irradiation on the mechanical properties and in vitro degradation behavior of several natural proteins aimed to be used in the biomedical field. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 14, 789–796.
- Wang, Y and Padua, G.W. (2003). Tensile Properties of Extruded Zein Sheets and Extrusion Blown Films. *Macromolecular Material Engineering*, 288, 886–893.
- Wasikiewicz, J.M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Wach, R.A., & Mitomo, H. (2005). Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sono chemical and ultraviolet methods. *Radiation Physics and Chemistry*, 73(5), 287–295.
- Weadock, K., Olson, R.M. & Silver, F.H. (1983). Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomaterial Medical Development*, 11(4), 293-318.
- Wessling, C., Nielsen, T. & Leufvén, A. (2000). The influence of α -tocopherol concentration on the stability of linoleic acid and the properties of low-density polyethylene. *Packaging Technology and Science*, 13, 19-28.
- Wihodo, M. and Moraru, C.I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films. *Journal of Food Engineering*, 114, 292–302.
- Wiles, J.L., P.J. Vergano, F.H. Bunn, and R.F. Testin. (2000). Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *Journal of Food Science*, 65, 1175-1179.
- Wong, C., Stylianopoulos, T., Cui, J., Martin, J., Chauhan, V.P., Jiang, W., Popović, Z., Jain, R.K., Bawendi, M.G., Fukumura, D. (2011). Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 108, 2426–2431.
- Wood, W., Lundgren, S., Ouellette, J., Busceme, S. & Blackstone, T. (1994). Minority influence: a meta-analytic review of social influence processes. *Psychology Bulletin*, 115, 323–345
- Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J. & Zhang, Q. (2013). Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 32, 42-51.

Références bibliographiques

- Xia, J. and Dubin, P.L. (1994). Protein-polyelectrolyte complexes. In: Dubin, P. L., Bock, J., Davis, R., Schulz, D. N., and Thies, C., Eds. *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*. Berlin: Springer-Verlag, 247-271.
- Yang, C., Shena, Z., Yu, G. and Wang, J. (2003). Effect and aftereffect of γ radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*, 99(14), 6240-6245.
- Ye, M., Neetoo, H. & Chen, H. (2008). Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 235-240.
- Yeo, Y., Bellas, E., Firestone, W., Langer, R. & Kohane, D.S. (2005). Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7518-7525.
- Yi, J.B., Kim, Y.T., Bae, H.J., Whiteside, W.S. & Park, H.J. (2006). Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71(9), 376-383.
- Yildirim, M. and Hettiarachchy, N.S. (1998). Properties of films produced by crosslinking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63(2), 248-252.
- Yin, Y., Li, Z., Sun, Y and Yao, K, A. (2005). Preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. *Journal of Material Science (Letters)*, 40, 4649-4652.
- Yoo, S.R and Krochta, J.M. (2011). Whey protein-polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2628-2636.
- Yoshii, F., Zhao, L., Wach, R.A., Nagasawa, N., Mitomo, H. & Kume, T. (2003). Hydrogels of polysaccharide derivatives crosslinked with irradiation at paste-like condition. *Nuclear Instruments and Methods B*, 208, 320-324.
- Young, T. (1805). An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 95, 65-87.
- Yue, W. (2014). Prevention of browning of depolymerized chitosan obtained by gamma irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 101, 857-863.
- Zhang, F., Xu, S. & Wang, Z. (2010). Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales. *Food and Bioprocess Processing*, doi:10.1016/j.fbp.2010.05.003.
- Zhong, Q.P and Xia, W.S. (2008). Physicochemical Properties of Edible and Reservative Films from Chitosan/Cassava Starch/Gelatin Blend Plasticized with Glycerol. *Food Technology Biotechnology*, 46 (3), 262-269.
- Zinoviadou, K.G., Koutsoumanis, K.P. & Biliaderis, C.G. (2009). Physicochemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82, 338-345.
- Zisman, W.A. (1964). Contact angle wettability and adhesion. *Advances in Chemistry*. American Chemical Society. Series No. 43 Washington DC, 1-5.
- Zuo, M., Song, Y., Zheng, Q. (2009). Preparation and properties of wheat gluten/methylcellulose binary blend film casting from aqueous ammonia: A comparison with compression molded composites. *Journal of Food Engineering*, 91, 415-422.