



HAL
open science

Utilisation du caséinate de sodium pour la fabrication de films actifs pour l'emballage alimentaire : étude des propriétés barrières aux gaz, de l'activité antimicrobienne et de la biodégradabilité

Basak Yilin Colak

► To cite this version:

Basak Yilin Colak. Utilisation du caséinate de sodium pour la fabrication de films actifs pour l'emballage alimentaire : étude des propriétés barrières aux gaz, de l'activité antimicrobienne et de la biodégradabilité. Polymères. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2014. Français. NNT : 2014STET4018 . tel-01311112

HAL Id: tel-01311112

<https://theses.hal.science/tel-01311112v1>

Submitted on 3 May 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.

THESE

Présentée à

L'Université Jean Monnet, Saint-Etienne

Ecole doctorale – Science Ingénierie Santé (ED SIS 488)

Pour obtenir le diplôme de

DOCTEUR

Spécialité « **Chimie et Sciences des Matériaux** »

Par

Basak Yilin COLAK

Utilisation du caséinate de sodium pour la fabrication de films actifs pour l'emballage alimentaire :

*Etude des propriétés barrières aux gaz, de l'activité
antimicrobienne et de la biodégradabilité*

Présentée et soutenue publiquement le 14 Novembre 2014

Devant un jury composé de :

| | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Nathalie GONTARD | Professeur des universités, | Rapporteur |
| Monique LACROIX | Professeur des universités, | Rapporteur |
| Anne-Marie RIQUET | Chargée de recherche, | Examineur |
| Fabrice GOUANVE | Maitre de conférences, | Examineur |
| Pascal DEGRAEVE | Professeur des universités, | Co-directeur de thèse |
| Frédéric PROCHAZKA | Maitre de conférences, HDR, | Directeur de thèse |

to my beautiful sisters

Ecem Bilge ÇOLAK and Gözem Naz ÇOLAK,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à Nathalie GONTARD et à Monique LACROIX pour m'avoir fait un grand honneur d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit. Je remercie également Anne-Marie RIQUET et Fabrice GOUANVE d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinateur.

Le travail présenté dans ce mémoire mené au sein du laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères de l'Université Jean Monnet à Saint Etienne (IMP@UJM) a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA) de l'Université Lyon 1.

Je tiens à remercier les Professeurs Christian CARROT et Pascal DEGRAEVE pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires au cours de ces trois années de recherche.

Je remercie particulièrement Frédéric PROCHAZKA, directeur de thèse, pour m'avoir accordé sa confiance, pour sa disponibilité, sa patience. Il a su pendant trois ans me guider et me soutenir dans mon approche du projet de thèse. Notre collaboration m'a permis d'acquérir non seulement des connaissances scientifiques mais aussi des solides compétences en conduite de projet et en encadrement. Un immense merci...

Je tiens à remercier profondément Pascal DEGRAEVE, co-directeur de thèse, pour sa disponibilité et sa rigueur. Les compétences scientifiques qu'il a également su me transmettre de jour en jour m'ont permis de mener bien ce projet. Bien qu'ayant passé la majeure partie de mon temps à Saint-Etienne, il a su me guider à distance et a été présent à chaque étape clé de ma thèse.

Je remercie Gilles ASSEZAT, ingénieur d'étude, pour tout ce qu'il m'a appris en mécanique des procédés, Nadia OULAHAL et Sophie GALLAND, les enseignantes-chercheuses de BioDyMIA, pour leurs conseils et leurs aides précieuses concernant l'étude de l'activité antimicrobienne des matériaux actifs.

Mes remerciements s'adressent à Eliane ESPUCHE et Fabrice GOUANVE pour m'avoir acceptée chaleureusement au sein de leur équipe. Je tiens également à les remercier

pour leur disponibilité et leur réactivité. Le travail que j'ai effectué avec eux m'a donné l'occasion d'approfondir mes connaissances.

Je ne peux oublier de remercier Corinne JEGAT et Sandrine MOJA, pour la confiance qu'elles m'ont confiée pour l'enseignement en chimie et biologie. Mauricette, Lydaw, Odile, les techniciens à l'UJM, qui m'ont aidé pour le bon déroulement des travaux pratiques.

Je tiens également à remercier Barbara BURGEL du service prêt entre bibliothèque qui m'a commandé une bonne partie des articles cités dans ce manuscrit, et mes deux stagiaires qui m'ont aidé à réaliser les essais scientifiques.

Cette longue période passée au laboratoire restera un souvenir inoubliable grâce aux nombreuses personnes qui sont devenues aujourd'hui mes amis. Je remercie « les grands » Célinou, Tarik, Domenico, Rémi et « les jeunes » Alix (&Lolo), Fanny, Marie, d'avoir rendu (et de continuer à rendre) si agréable ces années à Saint-Etienne. Merci beaucoup Dalila et Benj M. pour les sorties sympas pendant les congrès. Un très grand merci à Melinda, pour les discussions qu'on a eues ensemble sur tout et rien, pour ses encouragements pendant la dernière ligne droite de cette thèse.

Un profond merci à mes parents. Sans eux, l'achèvement de si longues études n'aurait pas été possible, à mes sœurs, Ecem et Gözem.

Je remercie enfin Reda. Merci pour ta présence, ton soutien et ta patience pendant les moments difficiles de la rédaction.

Merci, merci, merci...

« Teşekkürler, büyüyorum sizinle... »

| | |
|---|-----------|
| Introduction Générale..... | 3 |
| Chapitre I : Synthèse Bibliographique | 9 |
| I.1. Les films comestibles | 9 |
| I.1.1. Les biopolymères..... | 10 |
| I.1.1.1. Les polysaccharides..... | 11 |
| I.1.1.2. Les protéines..... | 16 |
| I.1.1.3. Les composites | 18 |
| I.1.2. Procédés de fabrication des films | 19 |
| I.1.3. Propriétés physico-chimiques des films comestibles | 21 |
| I.1.3.1. Propriétés mécaniques | 21 |
| I.1.3.2. Propriétés barrières aux gaz..... | 25 |
| I.1.4. Intérêts et limites à leur utilisation | 30 |
| I.1.4.1. Dans le domaine alimentaire | 30 |
| I.1.4.2. Dans le domaine non alimentaire | 32 |
| I.2. Focus sur les films à base de protéines | 33 |
| I.2.1. Les différentes protéines employées..... | 33 |
| I.2.1.1. Collagène et gélatine | 33 |
| I.2.1.2. Zéine de maïs..... | 34 |
| I.2.1.3. Gluten de blé | 36 |
| I.2.1.4. Protéines de soja | 37 |
| I.2.1.5. Protéines de lait | 39 |
| I.2.2. Les caractéristiques | 47 |
| I.2.2.1. Propriétés mécaniques | 47 |
| I.2.2.2. Propriétés barrières aux gaz..... | 49 |
| I.3. Les films comestibles antimicrobiens..... | 52 |
| I.3.1. Quels agents antimicrobiens pour fonctionnaliser des films comestibles ?..... | 52 |
| I.3.2. Modes d'adjonction de ces agents antimicrobiens | 59 |
| I.3.3. Effets de l'adjonction de composés antimicrobiens sur les propriétés générales (mécaniques, barrière, organoleptiques) d'emballages comestibles | 63 |
| I.3.4. Intérêts et limites à l'efficacité antimicrobienne des films comestibles antimicrobiens ... | 66 |
| I.4. Références bibliographiques..... | 67 |
| Avant Propos..... | 79 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre II: Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability | 83 |
| II.1. Introduction | 85 |
| II.1. Materials and methods..... | 86 |
| II.1.1. Materials | 86 |
| II.1.2. Preparation of sodium caseinate pellets and films with or without (control) lysozyme.... | 87 |
| II.1.3. Composition of pellets and films following extrusion and blowing..... | 88 |
| II.1.3.1. Moisture isotherms of sodium caseinate pellets and films | 88 |
| II.1.3.2. Proteins determination in pellets and films | 89 |
| II.1.4. Assay of lysozyme enzymatic activity | 89 |
| II.1.5. Antimicrobial activity of lysozyme-containing films..... | 90 |
| II.1.5.1. Culturable cells counting..... | 90 |
| II.1.5.2. Agar diffusion assay | 90 |
| II.1.6. Mechanical properties of sodium caseinate active films | 91 |
| II.1.7. Evaluation of ultimate aerobic biodegradability | 91 |
| II.1.8. Statistical analysis | 92 |
| II.2. Results and discussion..... | 92 |
| II.2.1. Preliminary analysis of pellets and films compositions | 92 |
| II.2.1.1. Moisture sorption..... | 92 |
| II.2.1.2. Protein quantification | 93 |
| II.2.2. Residual activity of lysozyme in pellets and films following extrusion and blowing..... | 95 |
| II.2.2.1. Influence of twin-screw extrusion temperature and blown film extrusion process... | 95 |
| II.2.2.2. Plasticizer effect | 97 |
| II.2.2.3. Stability of lysozyme during storage of pellets or films..... | 98 |
| II.2.3. Antimicrobial activity of lysozyme-containing pellets | 99 |
| II.2.4. Film characterization..... | 100 |
| II.2.4.1. Mechanical properties of sodium caseinate active films | 100 |
| II.2.4.2. Ultimate aerobic biodegradability | 105 |
| II.3. Conclusion..... | 106 |
| II.4. Acknowledgements..... | 107 |
| II.5. References | 108 |
| II.6. Abstract | 111 |

| | |
|--|------------|
| Chapitre III: Antimicrobial efficacy of nisin and natamycin from sodium caseinate extrusion-blown films: A comparative study with heat-pressed/solution cast films..... | 113 |
| III.1. Introduction | 115 |
| III.2. Materials and methods..... | 117 |
| III.2.1. Materials..... | 117 |
| III.2.2. Preparation of films | 117 |
| III.2.2.1. Extrusion blown films | 117 |
| III.2.2.2. Heat-pressed films | 117 |
| III.2.2.3. Solution casting films | 118 |
| III.2.3. Antimicrobial activity..... | 118 |
| III.2.3.1. Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC)..... | 118 |
| III.2.3.2. Culturable cells counting..... | 118 |
| III.2.3.3. Agar diffusion assay | 119 |
| III.2.4. Optical properties of films..... | 120 |
| III.2.4.1. Light transmission and film transparency | 120 |
| III.2.4.2. Color..... | 120 |
| III.3. Results and discussion..... | 121 |
| III.3.1. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of nisin and natamycin..... | 121 |
| III.3.2. Antimicrobial activity of nisin- or natamycin-containing pellets and films..... | 122 |
| III.3.2.1. Antimicrobial activity of nisin-containing pellets and films | 122 |
| III.3.2.2. Antimicrobial activity of natamycin-containing films | 129 |
| III.3.3. Optical properties of films..... | 131 |
| III.3.3.1. Color..... | 131 |
| III.3.3.2. Light transmission and transparency | 133 |
| III.4. Conclusions | 134 |
| III.5. Acknowledgement | 135 |
| III.6. References | 136 |
| III.7. Abstract | 139 |

| | |
|--|------------|
| Chapitre IV: Study of the influences of film processing conditions and glycerol amount on the water sorption and gas barrier properties of novel sodium caseinate films | 141 |
| IV.1. Introduction..... | 143 |
| IV.2. Experimental | 144 |
| IV.2.1. Materials | 144 |
| IV.2.2. Films preparation..... | 144 |
| IV.2.3. X-ray diffraction (XRD) | 146 |
| IV.2.4. Differential scanning chromatography (DSC)..... | 146 |
| IV.2.5. Dynamic vapor sorption (DVS)..... | 146 |
| IV.2.6. Water vapor permeability..... | 147 |
| IV.2.7. Oxygen permeability..... | 148 |
| IV.3. Results and discussion | 148 |
| IV.3.1. XRD..... | 148 |
| IV.3.2. Thermal properties..... | 151 |
| IV.3.3. Water sorption isotherms | 154 |
| IV.3.3.1. Experimental data | 154 |
| IV.3.3.2. Mathematical modeling..... | 158 |
| IV.3.4. Water Sorption kinetics..... | 160 |
| IV.3.5. Water vapor permeability..... | 165 |
| IV.3.6. Oxygen permeability..... | 166 |
| IV.4. Conclusion | 168 |
| IV.5. Acknowledgement | 169 |
| IV.6. References..... | 170 |
| IV.7. Abstract | 173 |
| Conclusion Générale..... | 175 |
| Perspectives..... | 181 |

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale

L'Homme a toujours eu besoin de protéger son aliment. C'est sans doute cet instinct qui a mené inconsciemment à l'utilisation de l'emballage alimentaire. Les premiers hommes se sont servis de feuilles, de peaux d'animaux et de coquilles de noix pour protéger, cacher et porter leur nourriture. En 1856, le premier plastique, à base de cellulose, est mis au point. Il s'agit du celluloïd qui sera suivi plusieurs années plus tard en 1889 par la galalithe, premier plastique artificiel à base de lait. Ensuite, en 1907 le premier polymère synthétique, la bakélite, a été développé. D'autres polymères synthétiques ont suivi et depuis, leur exploitation dans des domaines variés n'a cessé de croître. De nos jours, malgré les qualités multiples de ces matériaux synthétiques (aptitude à la mise en forme, excellentes propriétés mécaniques et barrières), l'industrie alimentaire envisage d'utiliser des emballages comestibles (ou non) et biodégradables à base de glucides ou de protéines. Ces polymères, qui ont finalement les mêmes origines que les emballages naturels primitifs, ont des propriétés parfois assez proches de celles des polymères synthétiques. Ce retour vers ces matières naturelles est lié d'une part à des enjeux économiques et environnementaux, d'autre part à la nécessité de développement de nouveaux produits et aux changements dans les modes de consommation.

Dans ce contexte général, de plus en plus de travaux de recherche visent à développer des films comestibles d'emballages (figure 1a). Parmi ces travaux publiés, une bonne partie (figure 1b) se focalise sur les films comestibles innovants. Dans le cas présent, ces films ont des fonctionnalités antimicrobiennes grâce à des agents actifs incorporés dans les formulations filmogènes. L'utilisation de tels films pourrait présenter de nombreux avantages:

- L'amélioration de la qualité des aliments
- La limitation de l'utilisation des ressources fossiles
- La réduction de l'impact environnemental

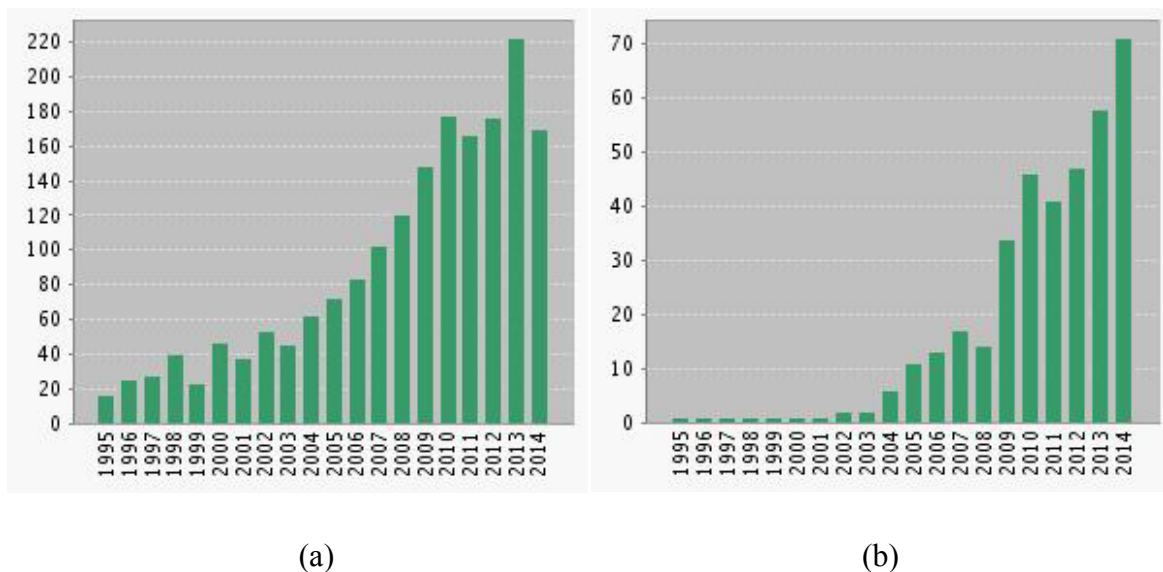


Figure 1 : Nombre de travaux de recherche publiés par an (a) sur les films comestibles et (b) sur les films comestibles antimicrobiens pendant 20 dernières années (interrogation de Web of Science le 01/ 09/2014).

En revanche, un des principaux freins à leur fabrication en grande quantité et à leur commercialisation provient de la technologie généralement proposée, la voie ‘humide’, solution qui consiste à laisser s’évaporer une solution diluée filmogène pour obtenir un film fin. Cette méthode facile à mettre en œuvre à l’échelle du laboratoire est en revanche très coûteuse à échelle industrielle car elle est très lente et grande consommatrice de solvant (principalement de l’eau).

Dans le cas du travail présenté ici, une technologie de transformation des caséinates par voie fondue, mise au point dans une précédente thèse, a permis de s’affranchir de ce frein. En effet, la voie fondue est la voie privilégiée pour l’élaboration de matériaux rigides ou souples (films) d’emballage à l’échelle industrielle.

Les objectifs principaux de cette thèse consistent à :

- ✓ développer des films d’emballages actifs antimicrobiens à base de caséinate de sodium par des procédés de transformation en voie fondue : extrusion bi-vis et extrusion-gonflage pour ensuite caractériser leur efficacité antimicrobienne et leurs propriétés mécaniques.
- ✓ comparer les propriétés de sorption d’eau et de barrières aux gaz des films à base de caséinate de sodium préparés par voie humide et par voie fondue.

Afin de répondre à ces objectifs, des expériences ont été conçues pour comprendre dans un premier temps comment le couple procédé/formulation influence les propriétés classiques des films et l'activité enzymatique résiduelle du lysozyme, un conservateur incorporé dans les formulations avant mise en forme par extrusion. Dans un second temps, les propriétés antimicrobiennes des films formulés avec du lysozyme ou deux autres conservateurs naturels (la nisine ou la natamycine) dans des conditions définies comme optimales avec le lysozyme ont été caractérisées. Finalement, certaines des propriétés physico-chimiques des films à base de caséinate de sodium ont été étudiées. Les isothermes de sorption et la perméabilité aux gaz des films préparés par voie humide et par voie fondue ont été comparées.

Différentes équipes de recherche avec des spécialités variées se sont associées pour la réalisation et l'encadrement de ces travaux:

- ✓ le laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA), Equipe d'Accueil de l'Université Claude Bernard Lyon 1, qui a apporté son expertise sur les emballages antimicrobiens alimentaires. Ce laboratoire a aidé à réaliser l'évaluation de l'activité antimicrobienne des films à base de caséinate de sodium fonctionnalisés par l'ajout des 3 conservateurs alimentaires testés.
- ✓ La partie de l'Université Claude Bernard Lyon 1 de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP) qui a apporté son expertise concernant la caractérisation des propriétés de sorption de l'eau et barrières aux gaz (oxygène et vapeur d'eau) des films à base de caséinate de sodium élaborés.

Enfin, la partie de l'Université Jean Monnet de St Etienne de l'UMR Ingénierie des Matériaux Polymères où j'ai réalisé la majorité des travaux présentés dans ce manuscrit, à savoir l'élaboration des matériaux à base de caséinate de sodium et la caractérisation de leurs propriétés mécaniques, thermiques et de leur biodégradabilité.

Ce manuscrit, présente donc les résultats de recherches menées dans les 2 laboratoires cités ci-dessus sur 3 sites (St Etienne, Lyon et Bourg-en-Bresse). Il est structuré en quatre chapitres.

Le premier chapitre sera consacré à une synthèse bibliographique sur les films comestibles à base d'agro-polymères variés d'une manière générale avant de se focaliser sur

ceux à base de protéines. De plus, une partie de l'étude bibliographique portera plus précisément sur les films comestibles antimicrobiens afin de décrire les systèmes existants.

Le deuxième chapitre sera dédié à la compréhension de l'effet du couple procédés/formulation sur la stabilité de l'activité enzymatique du lysozyme dans des films thermoplastiques à base de caséinate de sodium. L'effet des traitements thermomécaniques et du taux de plastifiant sur les propriétés mécaniques des films sera étudié dans des conditions contrôlées en humidité. La biodégradabilité des matériaux à base de caséinate de sodium sera également évaluée suite à chaque étape de transformation. Cette première partie du projet servira à évaluer la faisabilité d'élaborer des films actifs incorporant des conservateurs présentant une thermostabilité limitée comme le lysozyme dans un premier temps puis la nisine ou la natamycine par des procédés thermomécaniques. Le travail de définition des paramètres optimaux d'élaboration des films contenant des agents actifs a d'abord été réalisé avec le lysozyme car le dosage de son activité enzymatique résiduelle est plus aisé, rapide et précis qu'un dosage d'activité antimicrobienne. Ces conditions seront utilisées pour la suite du projet afin de fabriquer des films antimicrobiens avec de la nisine ou de la natamycine.

Le troisième chapitre présentera donc précisément l'activité antimicrobienne des films à base de caséinate de sodium obtenus par extrusion-gonflage contenant de la nisine ou de la natamycine. Ce chapitre sera focalisé sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des films thermoformés (gonflés ou compressés) en comparaison avec des films préparés par voie humide.

Le quatrième chapitre portera sur l'étude des propriétés physico-chimiques des films notamment, les isothermes de sorption, la perméabilité à la vapeur d'eau et à l'oxygène. L'influence du type de procédé (voie humide ou voie fondue) et de l'utilisation d'un co-solvant (éthanol) durant la fabrication sur les caractéristiques de sorption de l'eau ainsi que sur la perméabilité aux gaz des films sera étudiée. Les isothermes de sorption de l'eau des films formulés avec des taux variés de plastifiant seront également modélisées et comparées. Pour une compréhension fondamentale du phénomène de transfert à travers les films à base de caséinate, la diffusivité sera calculée. Les analyses de chromatographie à balayage différentiel ont constitué un outil d'aide à la compréhension du phénomène de plastification des caséinates de sodium en présence du glycérol et d'eau. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence l'absence d'effet du traitement thermomécanique et de l'éthanol sur les propriétés de sorption d'eau et de barrières aux gaz des films à base de caséinate de sodium.

CHAPITRE I :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.1. Les films comestibles

Introduction

Un film est généralement une couche fine de matériau constitué d'un polymère « filmogène » qui est capable de former une phase continue. En ce qui concerne les films comestibles, ce polymère provient d'une agro-ressource telle que les protéines, les glucides et les lipides. Parmi ces agro-polymères, les lipides ont un comportement particulier. Elles ne peuvent pas former des films indépendants (« stand-alone »). Elles doivent être appliquées directement sur le support à emballer et elles forment ainsi un enrobage (« coating »). Les protéines et les glucides peuvent au contraire, être utilisés en combinaison avec des additifs (plastifiant, colorant, etc.) pour former des emballages comestibles.[1, 2].

L'utilisation des films comestibles est loin d'être récente. Par exemple, le yuba (obtenue par séchage de la peau formée lors de l'ébullition du lait de soja) est utilisé traditionnellement dans les pays asiatiques depuis le 15^{ème} siècle. Actuellement, les films à base de collagène sont utilisés en tant qu'enveloppe de saucisses et les films d'hydroxy méthyl cellulose comme des sacs solubles pour des ingrédients alimentaires déshydratés. En général, les applications sont plus nombreuses avec les enrobages comestibles qu'avec les films. Les enrobages à base de gomme-laque et de cire sur les fruits et les légumes, les enrobages à base de zéine sur les bonbons et les enrobages à base de sucre sur les noix sont des applications fréquemment rencontrées dans l'industrie[1, 3].

L'emballage, lorsqu'il n'est pas destiné à être consommé avec un aliment, doit répondre à la réglementation sur les matériaux au contact des aliments. La compatibilité d'un emballage est notamment dépendante de sa composition et des conditions de sa fabrication. L'innocuité de l'emballage vis-à-vis de l'aliment, ou son aptitude au contact alimentaire, sont réglementées par la directive européenne cadre n° 89/109 du 21 décembre 1988. Cette directive s'applique aux matériaux et objets qui, à l'état de produits finis, entrent en contact avec les denrées alimentaires, et notamment les emballages mais aussi les équipements pour la préparation des denrées alimentaires. Pour assurer la sécurité des consommateurs dans un domaine où l'innovation est permanente, une liste de monomères et d'additifs dont l'usage est autorisé (liste positive) est communiquée dans le règlement (CE) N°1935/2004. Le règlement (UE) N°10/2011 prévoit les principales exigences applicables à l'utilisation de nouveaux

types de matériaux et d'objets, notamment les matériaux et objets actifs et/ou intelligents destinés à préserver activement ou à améliorer l'état des denrées alimentaires («matériaux et objets actifs destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires»)[4, 5]. En revanche, un film comestible n'est concerné que par la réglementation sur les aliments. Il doit donc être exclusivement constitué d'ingrédients alimentaires dont potentiellement des additifs alimentaires dans les conditions prévues par la réglementation (Règlement UE n°1333/2008 au sein de l'Union Européenne).

Les films comestibles renforcent la qualité des denrées alimentaires. Ils peuvent permettre un allongement de leur durée de conservation grâce à de bonnes propriétés barrières aux gaz, à l'humidité et aux arômes. De plus, leur utilisation comme porteurs de substances actives (antioxydants, agents antimicrobiens, arômes) offre la possibilité de favoriser la protection de l'aliment contre les détériorations biologiques, chimiques ou physiques et d'améliorer ainsi les qualités organoleptiques et la sécurité de l'aliment. Grâce à ces fonctions protectrices, les emballages comestibles tant qu'emballage primaire peuvent partiellement ou totalement remplacer les emballages conventionnels. Leur utilisation pourrait simplifier le système complexe d'emballage, notamment les films multicouches et donc favoriser le recyclage d'autres composants plastiques d'un emballage[6, 7].

Utiliser des agro-polymères pour élaborer des matériaux d'emballage semble être la voie la plus cohérente pour assurer leur comestibilité. La partie suivante présente les polymères issus d'agro-ressources les plus utilisés pour la fabrication des films d'emballage comestibles.

I.1.1. Les biopolymères

Les biopolymères les plus employés pour former des films comestibles sont des protéines et des polysaccharides.

Les propriétés physiques et chimiques des biopolymères influencent fortement les propriétés des films obtenus. Ainsi, le choix des polymères doit être fait selon la spécificité de l'emballage, le type de produit à emballer et les mécanismes de sa détérioration[2]. Petersen [8] a résumé les conditions requises pour la conservation d'une variété d'aliments. Typiquement les emballages destinés à protéger ces aliments doivent répondre aux critères résumés au niveau du tableau 1.

Tableau 1 : Conditions optimales que doivent fournir les emballages pour différents aliments[8].

| Food | Typical time/temp. | Quality factors determining shelf-life | | | | | | Required gas composition | Optimal required barrier properties | | | | |
|---|--------------------------|--|--------|-----------|-----------|---------|---|---|-------------------------------------|-----------------|------------------|-------------|----------------|
| | | Microbiology | Colour | Oxidation | Structure | Flavour | Others | | O ₂ | CO ₂ | H ₂ O | Light | Other |
| Animal derived products | | | | | | | | | | | | | |
| Red meats | 0–5°C 6–14d | X | X | – | – | – | – | High oxygen (70–80%), high carbon dioxide (30–20%) | High | High | (High) | – | – |
| | 0–5°C 1–4d | X | X | – | – | – | – | No control: atmospheric | Low | – | (High) | – | – |
| Other meats | 0–5°C 1 d–6w | X | (x) | – | – | – | – | Low oxygen, high carbon dioxide | High | High | (High) | – | – |
| Cured meat products | 5°C 4w | X | X | X | – | – | – | No oxygen, high carbon dioxide | High | High | (High) | High | – |
| Cured fish products | 5°C 4w | X | X | X | – | – | – | Carbon dioxide | High | High | (High) | High | – |
| Fish, high fat | 0–5°C 1–7d | X | – | X | – | X | Enzymatic | carbon dioxide (40%), Oxygen (30%) and nitrogen (30%) | High | High | Low | – | Odours |
| Fish, low fat | 0–5°C 1–7d | X | – | – | – | X | Enzymatic | Carbon dioxide (40–60%) and nitrogen (60–40%) | High | High | Low | – | Odours |
| Eggs | 2–12°C 25 d–4w | X | – | – | – | – | Water loss | – | – | – | – | – | Aroma |
| Fluid milk | 2–5°C 2 d–8 md | X | – | X | – | X | Photooxidation | – | High | – | High | High | Aroma |
| Fermented milk | 2–5°C 16–18 d | X | – | X | X | – | Photooxidation | – | High | High | High | High | Aroma |
| Fresh cheese | < 5°C 1–8 w | X | – | – | – | X | Photooxidation | – | High | High | High | High | – |
| Semi soft and hard cheese | < 5°C 1 w–18w | X | – | X | – | – | Photooxidation | – | High | Low | High | Low or high | – |
| Mould ripened cheese | < 5°C 1–8 w | X | – | – | – | X | Photooxidation | – | High | High | High | High | – |
| Butter, oil, dairy spreads, etc. | < 5°C 6 w or more | X | – | X | – | X | Chemical, enzymatic | – | High | – | High | (High) | Odours grease |
| Pastas (fresh) | 2–5°C 4 w | X | – | (x) | – | – | – | Low oxygen | High | High | (High) | (High) | – |
| Fruits and vegetables | | | | | | | | | | | | | |
| Root crops | 0–25°C from 1w | X | – | X | X | – | – | No oxygen, no carbon dioxide | High | High | High | High | Odours |
| Most vegetables | 0–25°C from 1w | X | – | X | X | – | – | Oxygen (1–5%), no carbon dioxide | High | High | High | High | Odours |
| Most fruits and some vegetables | 0–18°C from 1w | X | – | X | X | – | – | Oxygen (1–5%), carbon dioxide (0–5%) | High | High | High | High | Odours |
| Dry products | | | | | | | | | | | | | |
| Flour/grains | 2°C-room temp. 3 yr. | X | – | X | – | – | Enzymatic | – | – | – | High | – | – |
| Powders, high fat | Room temp. 1 yr. | – | – | X | – | X | Staling | Low oxygen | High | – | High | High | – |
| Powders, low fat | Room temp. > 1 yr. | – | – | – | – | X | Stale flavour | Low oxygen | High | – | High | (High) | – |
| Breakfast cereals | Room temp. 1 yr. | – | – | X | – | X | Humidity | Atmospheric/low oxygen | High | Low | High | – | – |
| Pastas (dried) | Room temp. 1–6 md | – | X | X | – | – | Enzymatic | – | – | – | High | – | – |
| Spices and herbs | Room temp. from 6 md | – | X | X | – | X | – | – | (High) | – | High | (High) | – |
| Snack foods | Room temp. 1 yr | – | X | X | – | X | Enzymatic loss of crispness, Hydrolytic rancidity | Low oxygen | High | – | High | High | – |
| Coffees/teas | 5°C-room temp. 1 yr | – | – | X | – | X | Staling | Low oxygen | High | Low | High | High | – |
| Breads | 5°C-room temp. 1d-12w | X | – | – | X | – | Staling | Low oxygen, high carbon dioxide | High | High | High | – | – |
| Cakes | 5°C-room temp. 1d-4 md | X | X | X | X | – | – | Atmospheric/low oxygen, high carbon dioxide | High | High | High | (High) | – |
| Crackers and cookies | Room temp. 4 md | – | X | X | X | X | Loss of crispness | – | – | – | High | – | – |
| Chocolates | 2°C-room temp. 6–12 md | – | X | X | – | X | – | – | – | – | – | High | Odours, greese |
| Beverages | | | | | | | | | | | | | |
| Water | Room temp. 1 yr | X | – | – | – | X | Migration, absorption | – | – | – | High | – | Aroma |
| Juice | 5°C-room temp. 5d-1 yr | X | X | X | – | X | Photo oxidation | Atmospheric, low oxygen | High | – | High | High | – |
| Carbonated drinks (beer & soft drinks) | 5°C-room temp. 6 md-1 yr | X | – | X | – | X | Absorption, migration | High carbon dioxide, low oxygen | High | High | High | High | – |
| Frozen foods | | | | | | | | | | | | | |
| High fat products | –18°C 1 yr | – | (x) | X | (x) | – | – | Low oxygen | High | – | High | (High) | – |
| Low fat products | –18°C 2 yr | – | (x) | (x) | (x) | – | Enzymatic | (Low oxygen) | High | – | High | (High) | – |
| Others | | | | | | | | | | | | | |
| High fat products (dressing, sauce, etc.) | 5°C-room temp. 1 yr | – | (x) | X | – | – | – | Low oxygen | High | – | High | High | Aroma, grease |
| Ready meals | 2–5°C 3–21d | X | – | X | – | (x) | – | Low oxygen, high carbon dioxide | High | High | High | – | – |

*d= Day(s), w=week(s), md=month(s), yr =year(s).

I.1.1.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des matières premières intéressantes grâce à leur abondance naturelle. Les polysaccharides utilisés dans les formulations de films sont majoritairement les mêmes que ceux utilisés en tant qu'émulsifiant, épaississant et gélifiant. Les séquences

(motifs) principales des polysaccharides sont relativement simples par rapport aux protéines composées de 20 acides aminés. La figure 1 présente différents motifs de répétition des polysaccharides. Cependant, la conformation structurale d'un polysaccharide peut être plus compliquée et aussi imprévisible que celle d'une protéine. De plus ils présentent généralement des masses moléculaires plus élevées que les protéines. Les films à base de polysaccharides sont généralement hydrophiles et présentent de bonnes propriétés barrières à l'O₂ et au CO₂ sous certaines conditions [1, 2, 9] mais des propriétés barrière à la vapeur d'eau beaucoup plus limitées.

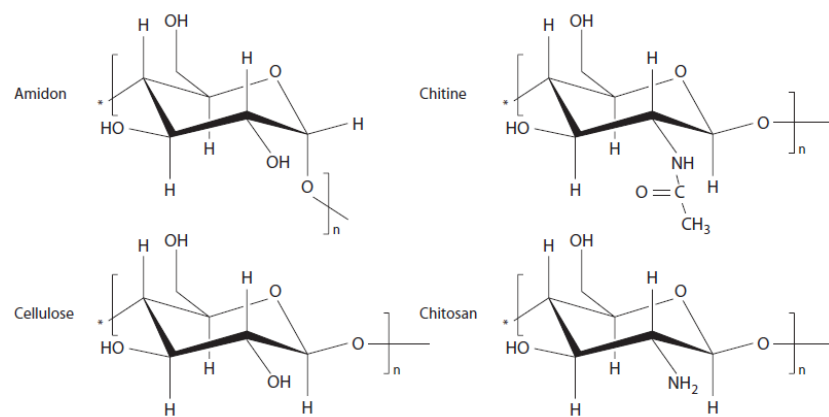


Figure 2 :Exemples de motifs de répétition de quelques polysaccharides[10]

Parmi les polysaccharides filmogènes communément employés, on peut citer la cellulose modifiée, l'amidon et ses dérivés, la chitine et le chitosane.

a. La cellulose

La cellulose est le composant principal de la paroi des cellules végétales ce qui en fait polymère naturel le plus abondant. C'est un polymère linéaire constitué de résidus de D-glucose dans lequel les molécules de glucose sont liées entre elles par des liaisons glucosidiques de type β -1,4. Le degré de polymérisation varie de quelques centaines à quelques milliers selon l'origine botanique de la plante. Les chaînes de cellulose associées par des liaisons hydrogènes, des forces de van der Waals, forment des structures solides ordonnées. Cela rend la cellulose fibreuse et insoluble dans l'eau. Cependant, sa solubilité dans l'eau peut être augmentée par un traitement alcalin suivi d'une réaction avec l'acide chloroacétique, le chlorométhane ou l'oxyde de propylène pour obtenir respectivement la

carboxyméthylcellulose (CMC), la méthylcellulose (MC), l'hydroxypropyl méthyl cellulose (HPMC) ou l'hydroxypropyl cellulose(HPC). La MC, l'HPMC, l'HPC et la CMC possèdent de bonnes propriétés filmogènes grâce à leurs structures linéaires : les films obtenus sont généralement souples, transparents, inodores, sans goûts et sont relativement résistants à l'humidité et aux lipides[7].Leurs principaux intérêts d'utilisation sont liés aux possibilités de retarder la migration des composés comme l'humidité entre aliments et d'y incorporer des additifs tels que des antioxydants ou des agents antimicrobiens.

Parmi les dérivés de la cellulose, la MC (E461) est la moins hydrophile et la plus résistante à l'eau. En revanche sa perméabilité à la vapeur d'eau reste relativement élevée. Turhan *et al.*[11]ont rapporté qu'un rajout d'éthanol dans la solution aqueuse formant le film pouvait diminuer la perméabilité à la vapeur d'eau (à 50% HR, 25°C) des films non-plastifiés.

La MC et l'HPMC (E464) forment des gels thermiquement réversibles. Ils se solubilisent dans l'eau froide et forment un gel à chaud. Leurs films sont des barrières efficaces contre les lipides et l'oxygène[12]. Balasubramaniam *et al.*[13] ont par exemple utilisé un enrobage à base d'HPMC sur de la viande de poulet pour retarder l'absorption de l'huile et la perte de l'eau pendant la friture. Atarés *et al.*[14]ont aussi démontré l'efficacité de films d'HPMC contre l'oxydation de l'huile d'amande. Le CMC (E466) est généralement utilisé sous forme de sel de sodium, le carboxyméthylcellulose sodique (NaCMC). Pro-long® (Courtaulds Group, Londres, UK) et Semperfresh™ (AgriCoat Nature SealLtd., Hungerford,UK) sont deux enrobages comestibles à base de NaCMC disponibles sur le marché pour les fruits.

Récemment, un autre dérivé de cellulose, le sulfate de cellulose, a été proposé pour une utilisation de film comestible. Chen *et al.*[15] ont appliqué des films de sulfate de cellulose sur la peau de bananes doublant ainsi le temps d'apparition de tâches brunes durant le stockage à température ambiante.

b. Amidon

L'amidon est un polymère rencontré dans des végétaux. Ses principales sources sont les pommes de terre, les céréales et le riz. Il constitue 60% des graines de céréales et il est relativement simple à séparer des autres composants. La composition de l'amidon varie considérablement selon l'origine botanique de la plante. L'amidon natif est composé principalement de deux macromolécules nommées amylopectine et amylose dont la

proportion massique dans la plupart des amidons est de 20 à 30% d'amylose contre 70 à 80% d'amylopectine. L'amylose est un polymère linéaire d'un degré de polymérisation moyen en nombre supérieur à 100 dont les résidus glucosyl sont liés en α -1,4[10]. Il a une masse molaire moyenne de 10^5 à 10^6 g.mol⁻¹. Il possède d'excellentes propriétés filmogènes. Grâce à cette molécule, l'amidon peut former des films solides, transparents, isotropes et inodores. Contrairement à l'amylopectine, l'amylose est soluble dans l'eau bouillante[16].

L'amylopectine est un polymère composé de molécules de glucose liées en α -1,4 avec des ramifications assurées grâce à des liaisons α -1,6 toutes les 20 unités de glucose. La masse molaire de l'amylopectine est de l'ordre de 10^6 à 10^8 g.mol⁻¹. Généralement il y a deux types de chaînes dans l'amylopectine : des chaînes courtes (de degré de polymérisation d'environ 15) et des chaînes plus longues (de degré de polymérisation d'environ 45)[17]. Concernant la forme physique, à l'état natif, les grains d'amidon se présentent sous forme de granules semi-cristallins. Les granules sont constitués de zones amorphes et cristallines organisées en feuillettes et présentent un degré de cristallinité compris entre 20 et 45%. L'amylose et les ramifications de l'amylopectine sont situées dans la partie amorphe alors que les chaînes courtes de l'amylopectine sont les principaux composants de la zone cristalline. Ainsi la cristallinité de l'amidon dépend de sa teneur en amylopectine. La cristallinité de l'amidon a une forte influence sur les propriétés physiques et chimiques de ses films[18].

Les grains d'amidon sont insolubles dans l'eau froide à cause des liaisons par pont hydrogène qui maintiennent les chaînes ensemble. En revanche le chauffage d'une suspension d'amidon détruit la structure cristalline grâce à laquelle les groupes hydroxyles de l'amylose et de l'amylopectine interagissent avec les molécules d'eau. Cela produit une solubilisation partielle de l'amidon. Si la suspension est en excès dans l'eau ou dans un autre solvant capable de former des liaisons par pont hydrogène, le chauffage à des températures entre 65°C et 100°C provoque une gélatinisation irréversible (déstructuration) de l'amidon. Ce processus est indispensable pour former des solutions homogènes, il est fortement influencé par le type de solvant et par le ratio amidon/solvant. La gélatinisation conduit à des changements irréversibles de l'amidon tels que la perte de cristallinité, l'absorption d'eau et le gonflement des granules.

c. La chitine et le chitosane

La chitine serait le polysaccharide le plus abondant après la cellulose. Elle joue un rôle structural essentiel pour de nombreuses espèces. Elle constitue notamment les cuticules externes des insectes, l'exosquelette des crustacés, l'endosquelette des céphalopodes (calamars...) ou encore la paroi des champignons. Le motif principal de la chitine a une structure identique à celui de la cellulose à l'exception du groupe d'acétamide à la place du groupe hydroxyle lié au deuxième carbone du résidu glucosyle. Le chitosane est le dérivé de la chitine obtenu par la désacétylation partielle dans un milieu alcalin. En effet, c'est un copolymère constitué de β -1,4N-acétyl-D-glucosamine et de β -1,4 D-glucosamine qui représente en général plus de 60% de sa composition. Le chitosane est souvent caractérisé par le degré de désacétylation et par sa masse moléculaire. Son principal intérêt pour les films et les revêtements comestibles réside dans ses activités antibactériennes et antifongiques[19]. Son caractère cationique peut aussi permettre des interactions avec divers éléments chargés négativement pour ensuite incorporer ou délivrer des composés actifs.

Ses propriétés antimicrobiennes proviendraient notamment des interactions électrostatiques entre les fonctions amines libres du chitosane (sous leur forme $-\text{NH}_3^+$ à pH acide) qui interagiraient avec les résidus chargés négativement de la paroi bactérienne, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur [20-22]. L'efficacité bactéricide du chitosane dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être classés en 4 catégories : l'espèce microbienne cible, les facteurs intrinsèques du chitosane tels que sa masse moléculaire, son degré de désacétylation et sa concentration, les propriétés physiques du film ou de la solution formant le film et finalement les conditions environnantes comme la température ou le pH [20, 23, 24].

No *et al.*[25] ont étudié l'activité antibactérienne du chitosane sur 4 souches de bactéries Gram-négatives et 7 souches de bactéries Gram-positives. Ils ont observé que le chitosane présente un effet bactéricide plus important contre les bactéries Gram-positives. Concernant l'influence de la masse moléculaire sur la concentration minimale inhibitrice du chitosane, il est difficile de tirer une conclusion générale car plusieurs auteurs ont rapporté qu'elle variait en fonction de la bactérie cible (Gram-positive ou Gram-négative)[25, 26]. En revanche les études menées sur l'activité antibactérienne en fonction du pH sont en accord sur le fait qu'une diminution du pH augmente l'activité inhibitrice du chitosane [20, 25, 27].

Des films ou des revêtements à base de chitosane ont été proposés pour la protection des qualités sensorielles de morceaux de mangue[28] et pour retarder la croissance microbienne sur la surface de tranches de carottes, fromage et saucisson [29].

I.1.1.2. Les protéines

Les protéines avec leurs valeurs nutritives peuvent constituer des matières intéressantes pour élaborer des films ou des revêtements comestibles. Les protéines sont des polymères polypeptidiques dont 20 au moins acides α -aminés naturels différents constituent l'unité monomérique. Les acides α -aminés possèdent deux groupes fonctionnels liés à un atome de carbone central : un groupe carboxyle $-\text{COOH}$ et un groupe amine $-\text{NH}_2$. En revanche, chacun des vingt acides aminés possède une chaîne latérale R qui lui est propre. Elle peut être apolaire (hydrophobe), polaire (hydrophile), neutre, chargée positivement ou négativement à pH 7. Cette diversité structurale différencie les protéines des polysaccharides et confère aux protéines une multitude de fonctions chimiques[30].

Les chaînes macromoléculaires constituant les protéines sont donc composées par une succession d'acides aminés liés les uns aux autres par des liaisons peptidiques. Ces chaînes polypeptidiques peuvent aussi se lier entre elles, soit par des liaisons covalentes : les ponts disulfures, soit par des interactions non-covalentes : les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les interactions hydrophobes et les liaisons de Van der Waals. Les caractéristiques structurales d'une protéine résultent d'un équilibre entre ces différentes interactions qui assurent le maintien de la conformation d'une protéine. On distingue jusqu'à 4 niveaux de structure des protéines : La **structure primaire** est l'ordre dans lequel s'enchaînent les acides aminés qui confèrent à chaque protéine ses propriétés distinctives. La structure primaire des protéines n'est pas le seul facteur conditionnant leur configuration spatiale dans un environnement donné.

- La **structure secondaire** correspond à la conformation locale de la structure primaire. Principalement 3 motifs se distinguent dans la structure secondaire des protéines : l'hélice α , le feuillet plissé β et la pelote statique (randomcoil).
- La **structure tertiaire** représente un assemblage tridimensionnel des structures secondaires, permettant une stabilité thermodynamique maximale de la protéine. La stabilité de ce niveau supérieur d'organisation est assurée par des liaisons intra-chaînes telles que les liaisons hydrogènes, les interactions de Van

der Waals, ioniques ou hydrophobes, ou encore des liaisons covalentes (ponts disulfure). La structure tertiaire définit la fonction d'une protéine. Selon leur structure tertiaire, les protéines peuvent se diviser en protéines globulaires et en protéines fibreuses.

- La structure quaternaire est l'association de molécules protéiques qui peuvent être identiques ou différentes pour les protéines multimériques constituées de plusieurs chaînes protéiques.

Les principales structures sont présentées sur la figure 2. Cette organisation peut être modifiée par des paramètres physiques d'environnement ou des agents chimiques (température, pression, irradiation, traitement acide ou alcalin, traitement mécanique...). La maîtrise de la conformation des protéines permet de moduler les propriétés physiques et mécaniques des films de protéines[31].

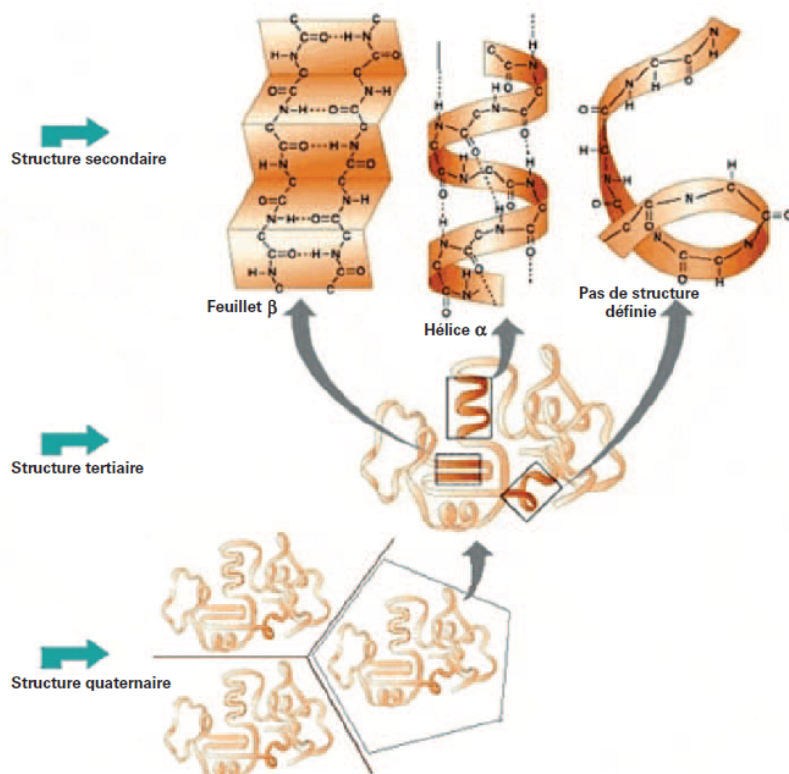


Figure 3 : Représentation schématique des différentes structures des protéines[10]

Les protéines destinées à l'élaboration des films plastiques peuvent être d'origine végétale (soja, gluten, zéine ...) ou animale(collagène, gélatine, caséines, protéines de lactosérum...)[31].

Les protéines représentent une catégorie de biopolymères très intéressante pour la fabrication de films comestibles. Le chapitre 2 y sera consacré.

I.1.1.3. Les composites

Les films composites comestibles sont obtenus à partir d'une combinaison d'hydrocolloïdes et de lipides. Les lipides ont de très bonnes propriétés barrières à l'eau, ils sont comestibles et biodégradables, cependant ils manquent de forces cohésives ce qui nécessite l'utilisation d'un hydrocolloïde comme matrice pour former des films. La cire d'abeille (« beeswax »), les monoglycérides acétylés, les alcools gras et les acides gras sont des exemples de lipides employés en combinaison avec les hydrocolloïdes. Les lipides sont dispersés dans un réseau formé par des polysaccharides ou des protéines pour former une émulsion homogène stable, qui donne par la suite un film homogène. Les films composites peuvent aussi être constitués de deux couches superposées dont une est à base d'hydrocolloïdes et l'autre à base de lipides. Ces films sont alors appelés films bicouche. Combiner les hydrocolloïdes avec les lipides permet de tirer avantage des bonnes propriétés barrières aux gaz des hydrocolloïdes et des bonnes propriétés barrières à la vapeur d'eau des lipides [32].

Une augmentation de la concentration en lipides ou de la taille des gouttelettes dispersées dans l'émulsion rend les films plus opaques tandis qu'une diminution de la taille des gouttelettes [33] et une meilleure dispersion améliorent l'ensemble des propriétés des films[34].

Wu *et al.*[35]ont emballé sous vide des boulettes de viande de bœuf précuites avec des films composites pour un stockage réfrigéré. Ils ont montré que les films à base d'amidon et d'alginate comportant de l'acide stéarique diminuent la perte d'eau pendant le stockage. Ils ont également rapporté que des films contenant du tocophérol ont diminué l'oxydation des lipides dans la viande. Arcan *et al.*[36] ont utilisé les films à base de zéine et de cire pour libérer de manière contrôlée du lysozyme.

I.1.2. Procédés de fabrication des films

Il existe deux types de procédés pour la fabrication des films ; la voie humide et la voie sèche.

- La voie humide ou voie solvant

Cette technique consiste à former un film par séchage d'une solution filmogène. Tous les composants de la solution filmogène doivent être dissous ou dispersés d'une façon homogène dans un solvant[1]. Il faut souligner que les films fabriqués sont entièrement comestibles lorsqu'aucun additif non alimentaire ne leur est ajouté.

Les films et les enrobages comestibles peuvent être formés par l'un des mécanismes suivants [37] :

- La coacervation simple : un hydrocolloïde dispersé dans l'eau est précipité ou subit un changement de phase après évaporation du solvant (séchage), après addition d'un non-électrolyte hydrosoluble dans lequel l'hydrocolloïde est insoluble (par exemple l'éthanol), après modification du pH ou addition d'un électrolyte provoquant un effet de « salting out » ou un pontage.
- La coacervation complexe : deux solutions d'hydrocolloïdes des charges opposées sont mélangées, provoquant ainsi l'interaction et la précipitation du complexe de polymères.
- La gélification ou coagulation thermique : le chauffage de la macromolécule, qui entraîne sa dénaturation, est suivi par une gélification (cas de l'amidon) ou une précipitation, ou encore un refroidissement d'une dispersion de l'hydrocolloïde provoquant la gélification (cas de la gélatine).

Dans la préparation des films par la voie humide une étape de dégazage est souvent effectuée pour éliminer les bulles susceptibles d'apparaître ultérieurement dans le film. Enfin, le film ou l'enrobage est formé par application de la solution/dispersion préparée sur la surface d'une plaque ou d'un produit. Pour la production d'un film préformé, la solution est étalée sur une plaque et le film est décollé après le séchage. Les enrobages, en revanche, nécessitent une application directe des solutions filmogènes sur le produit à enrober sous une forme liquide par l'étalement au pinceau, la pulvérisation, l'immersion, etc. [30].

- La voie sèche : thermoformage et extrusion

Certains hydrocolloïdes ayant une légère humidité présentent un comportement semblable aux thermoplastiques dans les procédés thermomécaniques tels que le moulage par compression et l'extrusion[38]. Ce mode de fabrication pour les films comestibles est de plus en plus documenté dans la littérature (tableau 2). Cependant une production efficace avec des équipements conventionnels d'extrusion, encore trop rarement étudiée, améliorerait certainement la commercialisation des films comestibles[30]. Ces procédés permettent en effet une transformation rapide avec des faibles taux d'humidité et des températures élevées [38]. Ils permettent ainsi d'éviter les deux étapes suivantes: rajout et élimination de solvant lors du séchage, qui rendent la voie solvant lente et coûteuse[30].

Concernant la transformation des agro-polymères par les procédés thermomécaniques, il est important de noter que les plastifiants ont un rôle indispensable. Les plastifiants, en réduisant les forces intermoléculaires, augmentent la mobilité des chaînes polymériques et abaissent la température de transition vitreuse du matériau. En conséquence, les films obtenus sont souples et facilement manipulables[39].

Tableau 2 : Récapitulatif des études sur la fabrication des films par des procédés thermomécaniques

| Biopolymère employé | Procédé | Référence |
|-----------------------------|-------------------------|------------------|
| Gluten de blé | Moulage par compression | [40] |
| Gluten de blé | Moulage par compression | [41-43] |
| Gluten de blé | Moulage par compression | [44] |
| Amidon | Extrusion | [45] |
| Gélatine | Extrusion | [46] |
| Protéine de soja + gélatine | Extrusion | [47] |
| Protéine de soja | Extrusion | [48] |
| Protéines du lactosérum | Extrusion | [49] |
| Caséinate de sodium | Extrusion-gonflage | [50] |

I.1.3. Propriétés physico-chimiques des films comestibles

I.1.3.1. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des films comestibles sont liées principalement aux forces de cohésion qui sont mises en jeu entre les chaînes polymériques. Ces forces dépendent de la structure, de la morphologie et de la masse moléculaire du matériau filmogène [37]. Logiquement, les facteurs qui influencent cette cohésion structurale du matériau auront un impact direct sur les propriétés mécaniques des films comestibles.

Des additifs peuvent permettre de changer le degré de cohésion des agro-polymères. L'utilisation des plastifiants, comme indiqué précédemment, est indispensable à la formation de films souples. Tout en restant indispensable à l'étape de transformation, le plastifiant change dramatiquement les propriétés mécaniques des films. La présence d'un plastifiant va augmenter la mobilité des chaînes polymériques en augmentant l'espace intermoléculaire. Ceci va améliorer la flexibilité du film final avec un allongement à la rupture nettement plus élevé, un module élastique et une contrainte à la rupture plus faibles[51]. Parmi les plastifiants les plus utilisés dans les films comestibles, on peut citer : les polyols (comme le glycérol, le sorbitol ou les polyéthylène glycols), les oligosaccharides (comme le saccharose, le glucose ou le xylose) et les lipides et leurs dérivés (comme les phospholipides, les acides gras ou certains surfactants). L'eau aussi est un plastifiant très utilisé mais il est plus difficilement maîtrisable pour les agro-polymères qui sont souvent de nature hydrophile. Arvanitoyannis a mis en évidence l'influence des polyols et/ou des sucres sur les propriétés mécaniques des films comestibles à base de mélanges amidon/caséinate de sodium[52, 53], chitosane/gélatine[54], ou méthyl cellulose/ cellulose microcristalline / amidon [55, 56]. Il a démontré que quel que soit le système filmogène, le module élastique et la contrainte à la rupture des films comestibles ont considérablement diminué avec l'ajout de plastifiants. Il a également souligné que ce dernier conduisait à une chute de la température de transition vitreuse (T_g) des films. La T_g est un point critique pour le comportement du polymère : il est « rigide » pour une température inférieure à la T_g , et « souple » pour une température supérieure à T_g [37]. En revanche, plusieurs auteurs ont rapporté que le taux de plastification est plus fortement influencé par le type de plastifiant que par la quantité ajoutée dans la formulation (figure 3)[57, 58].

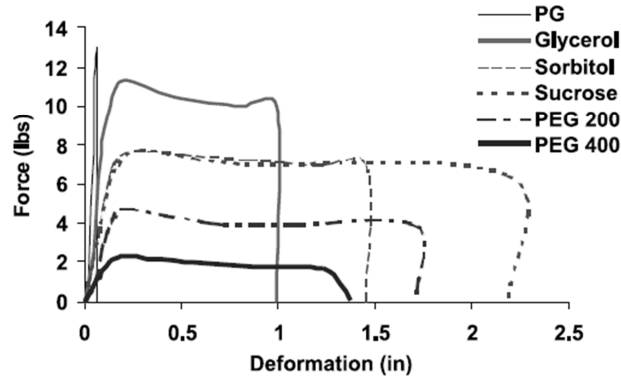


Figure 4 : Courbes force-déformation obtenues pour des plastifiants variés dans des films à base de β -lactoglobuline[57].

Tableau 3 : Différents plastifiants utilisés pour l'étude montrée dans la figure 3. La présentation de la masse molaire (MW), la formule et la structure ainsi que le nombre d'atomes d'oxygène présent dans la formule[57].

| Plastifiant | MW | Formule & structure | nombre d'atomes d'oxygène |
|-------------------------------|-----|---|---------------------------|
| Propylène glycol (PG) | 76 | $C_3H_8O_2$, chaîne linéaire | 2 |
| Glycérol | 92 | $C_3H_8O_3$, chaîne linéaire | 3 |
| Sorbitol | 182 | $C_6H_{14}O_6$, chaîne linéaire | 6 |
| Polyéthylène glycol (PEG 200) | 200 | $H(OCH_2-CH_2)_4OH$, chaîne linéaire | 5 |
| Saccharose | 342 | $C_{12}H_{22}O_{11}$, structure cyclique | 11 |
| Polyéthylène glycol (PEG 400) | 400 | $H(OCH_2-CH_2)_8OH$, chaîne linéaire | 9 |

De plus la relation entre le taux de plastifiant et la diminution de T_g n'est pas toujours linéaire et une augmentation de la quantité de plastifiant ne conduira pas obligatoirement à un changement de T_g au-delà d'une certaine concentration. Ce phénomène peut être expliqué par un excès du plastifiant qui produit des agrégats. Au-delà d'une concentration seuil : ils ne sont plus capables de changer la structure tridimensionnelle des polymères filmogènes. Il est fréquent d'observer cette absence de plastification dans des systèmes plastifiés avec plusieurs types de plastifiant dont un est souvent l'eau. Fabra *et al.*[59] ont démontré l'absence de

plastification par l'eau à haute teneur en humidité sur des systèmes à base de caséinate de sodium (figure 4).

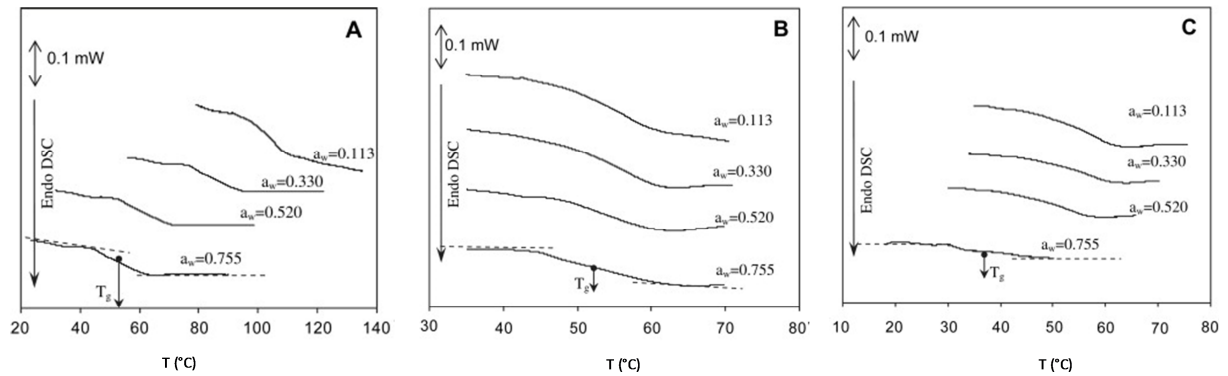


Figure 5 : Thermogrammes de DSC montrant la T_g à différentes teneurs en humidité (a_w) pour les films à base de caséinate de sodium (A), caséinate de sodium plastifié à 23% (m glycérol/m protéine) glycérol (B) et caséinate de sodium plastifié avec 23% de glycérol et 33% d'acide oléique (m lipide /m protéine) (C)[59]

Au contraire, l'addition d'un agent réticulant va provoquer des résultats opposés par rapport à un plastifiant. Une augmentation dans le taux de réticulation du matériau va renforcer la cohésion structurale et donnera des films rigides avec un module élastique et une contrainte à la rupture élevés. Galiotta *et al.*[60] ont clairement montré par des analyses thermomécaniques dynamiques l'influence d'un agent réticulant (formaldéhyde) en comparaison avec celle d'un plastifiant sur les propriétés mécaniques de films à base de protéine de lactosérum (figure 5).

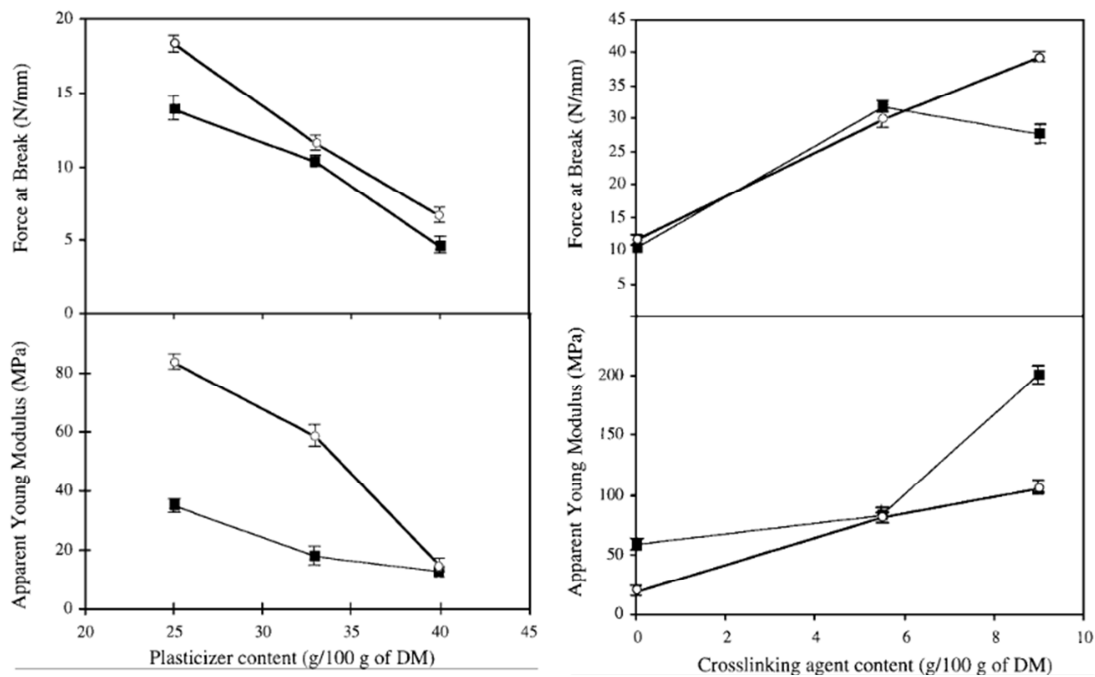


Figure 6 : Effet de la teneur en glycérol de films à base de protéine de lactosérum (à gauche). Effet de la teneur en formaldéhyde (agent réticulant) de films à base de protéine de lactosérum plastifiés à 33% de glycérol (à droite) sur la résistance à la rupture et le module de Young. Conditions de test : 20°C et 59,1% HR (○) ou 20°C et 75% HR (■)[60].

Une autre approche pour faire varier les propriétés mécaniques des films comestibles est de modifier la masse molaire des polymères filmogènes. Une diminution de la masse molaire va créer plus de groupes terminaux dans la chaîne des polymères et aussi plus de volumes libres. C'est pourquoi, la masse molaire d'un polymère peut jouer un rôle identique à celui d'un plastifiant pour les films comestibles. En général, une diminution de la masse moléculaire se traduit par une amélioration de la flexibilité des films[39].

Les paramètres du procédé d'élaboration des films (type de procédé, choix du solvant, pH, vitesse/température de séchage ou de refroidissement, etc.) peuvent aussi influencer les propriétés mécaniques des films. Par exemple, il a été rapporté que la résistance à la rupture de films comestibles à base de gluten est fortement dépendante de la concentration en gluten et du pH de la solution filmogène[61]. Finalement, pour les films comestibles préparés par voie humide, l'évaporation du solvant est une étape durant laquelle une immobilisation des molécules du polymère se produit, ainsi que le refroidissement pour les films préparés par voie sèche (par compression par exemple). En conséquence une évaporation du solvant ou un

refroidissement trop rapides des films peuvent se traduire par une cohésion insuffisante[37]et donc une diminution du module élastique des films.

I.1.3.2. Propriétés barrières aux gaz

La conservation d'un produit alimentaire emballé dans un film plastique dépend principalement du maintien de ses qualités d'origine en le protégeant contre des influences extérieures dégradantes. Ceci est rendu possible grâce aux propriétés barrières du matériau d'emballage. Les propriétés barrières, et en conséquence la capacité de protection d'un emballage, proviennent principalement de la perméabilité aux gaz et à la vapeur d'eau qui influencent fortement la qualité du produit. Par exemple, une perte d'eau peut conduire à un assèchement indésirable de l'aliment ou un gain d'eau peut entraîner une augmentation de l'activité de l'eau (a_w). Au-delà de $a_w=0,8$ les risques sanitaires liés à la à un développement de micro-organismes indésirables sont élevés[62].

L'oxygène est un autre paramètre très important à contrôler pour les aliments d'origine animale et végétale. Sa fixation sur le produit est irréversible. Elle peut oxyder des lipides et provoquer la rancidité, surtout si l'emballage permet de transmettre la lumière[62]. Son absence, quant à elle, peut amener à une anaérobiose. La conservation des qualités (physique, chimique, sanitaire, organoleptique) d'un aliment est assurée lorsque tous changements de goût, de couleur et d'odeur sont empêchés. Si une atmosphère modifiée est appliquée à l'intérieur de l'emballage, sa composition en CO_2 et/ou N_2 doit être maintenue[62]. Il est ainsi impératif de connaître la perméabilité du film polymérique aux gaz de l'environnement qui peuvent influencer sur la conservation du produit alimentaire.

La perméabilité est définie comme la transmission de pénétrants au travers du matériau [37]. Le principe fondamental de la perméation, illustré figure 6, repose sur le mécanisme d'adsorption/diffusion-dissolution/désorption.

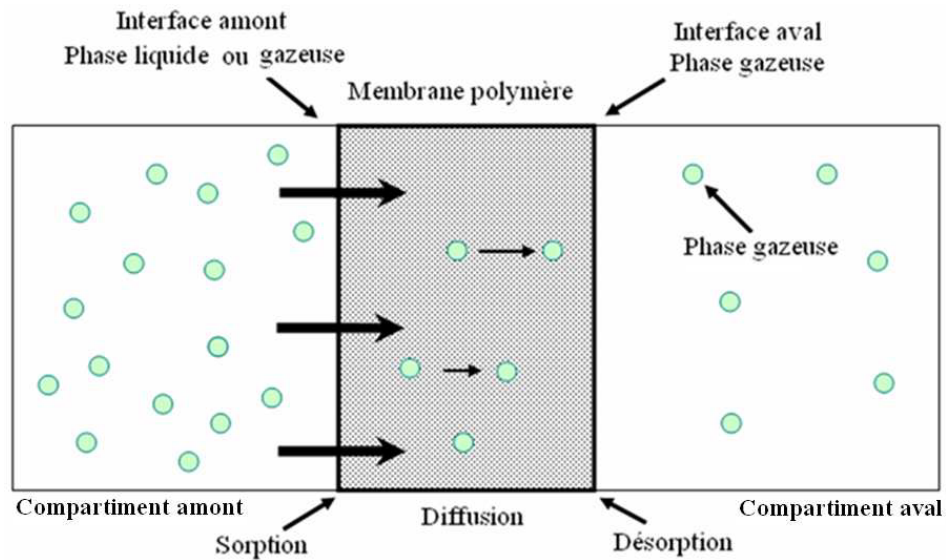


Figure 7 : Principe de la perméation[63]

Dans le cas idéal d'un matériau homogène présentant de faibles interactions avec les molécules diffusantes, la perméabilité (P) est égale au produit de (S) par (D)

$$P = D \cdot S \quad \text{Équation 1}$$

- S : le coefficient de solubilité représentant la dissolution des molécules du pénétrant au sein de la matrice polymère
- D : le coefficient de diffusivité représentant la diffusion des molécules de pénétrant au sein de la matrice polymère

Dans la pratique, P est mesuré à partir du flux en régime stationnaire :

$$P = \frac{J_{eq} \cdot L}{\Delta p} \quad \text{Équation 2}$$

$$\Delta Q = A \cdot J_{eq} \cdot \Delta t \quad \text{Équation 3}$$

avec, J_{eq} , le flux aval par unité de temps et de section à l'équilibre de perméation,

L , l'épaisseur du film,

Δp , la différence de pression entre le compartiment amont et le compartiment aval,

ΔQ , la quantité de gaz dans les conditions standard de température et de pression (STP) qui a traversé pendant l'intervalle de Δt à flux constant,

A, la section du film.

Les paramètres structuraux des polymères filmogènes peuvent jouer un rôle crucial sur la solubilité des pénétrants dans les films et leurs diffusivités à travers ceux-ci. Par exemple le volume libre, la cristallinité, la polarité, l'orientation et la réticulation du polymère peuvent être cités parmi les paramètres qui influencent grandement la diffusivité et donc la perméabilité. D'autre part, la taille, la forme, la polarité du diffusant, vont également influencer la perméabilité du film (la solubilité du diffusant est dépendante de ces paramètres)[62].

Une augmentation du volume libre entraîne une amélioration de la diffusivité et donc de la perméabilité. La notion de volume libre est souvent liée à la plastification de polymères filmogènes et donc à leurs T_g . En se basant sur les travaux de Psomiadou *et al.*[56], Dole *et al.*[64] ont illustré (figure 7) l'effet de la plastification sur la perméabilité aux gaz des films à base de glucides.

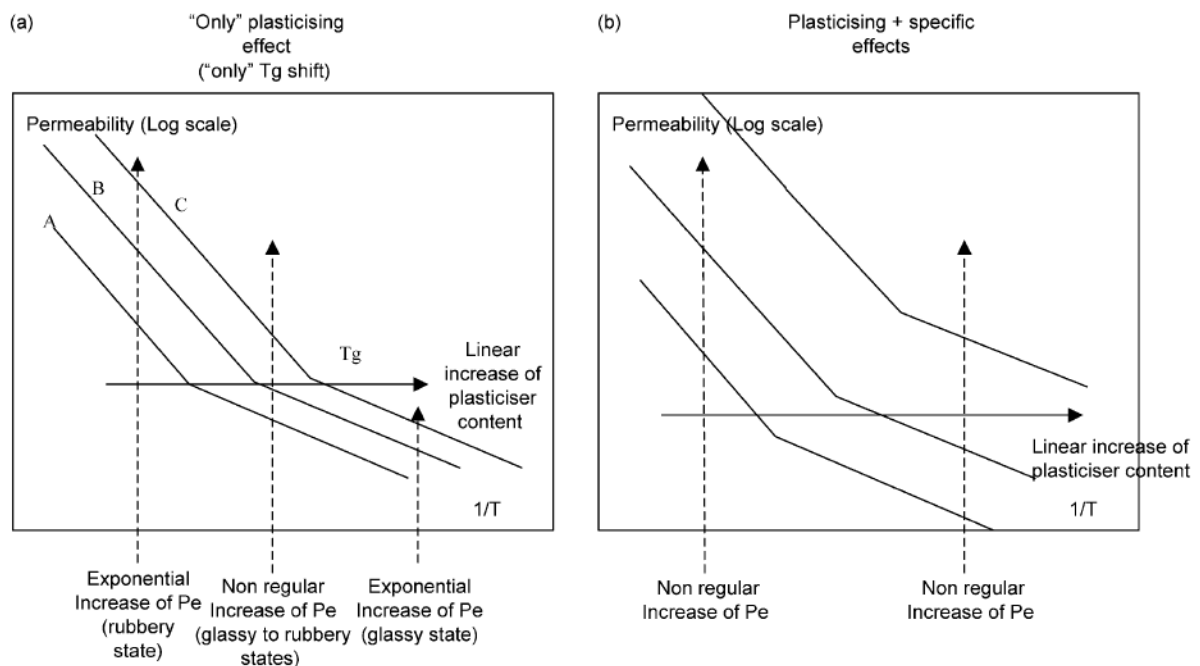


Figure 8 : Illustration de l'effet de la plastification sur la perméabilité (Pe). Courbes schématiques (A)-(B)-(C) représentant les taux de plastifiant dans l'ordre croissant[64].

Les mêmes auteurs ont expliqué que le taux de plastifiant a un impact plus prononcé au-dessus de la T_g , puisque l'énergie d'activation de la perméabilité est supérieure dans cette

zone de température. Dans l'illustration (la perméabilité de la loi Arrhenius) ils ont également comparé l'influence d'un plastifiant modèle sur la perméabilité (figure 8a) et d'un plastifiant qui permet de développer des interactions spécifiques avec le polymère filmogène. Ce dernier engendre des variations non-classiques en perméabilité (figure 8b). Il a notamment, été rapporté qu'en dehors d'une certaine fourchette de concentrations, les polyols peuvent provoquer une anti-plastification qui conduit à une chute en diffusivité au lieu d'une augmentation [65].

La cristallinité est un autre facteur qui joue sur les propriétés barrières des agropolymères semi-cristallins (notamment des glucides). Dans un polymère semi-cristallin, la perméabilité dépend du degré de cristallinité puisque la perméabilité aux gaz de la phase cristalline est considérée comme nulle. La perméabilité d'un tel système peut s'exprimer par la relation suivante :

$$P = \frac{X_a D_a S_a}{\tau \delta} \text{Équation 4}$$

avec, X_a , la fraction volumique

D_a , le coefficient de diffusion de la phase amorphe,

S_a , le coefficient de solubilité de la phase amorphe,

τ , un facteur lié à l'orientation (à la longueur et à la section du trajet de diffusion) du polymère,

δ , un facteur lié au volume libre (la mobilité des segments de chaînes liés aux cristallites) du polymère.

Ainsi, la perméabilité décroît, lorsque la cristallinité augmente[62]. Arvanitoyannis *et al.*[53] ont montré l'influence de la cristallinité sur la perméabilité à l'O₂ des films comestibles à base de mélanges d'amidon de maïs et de caséinate de sodium, plastifiés avec de l'eau (figure 8).

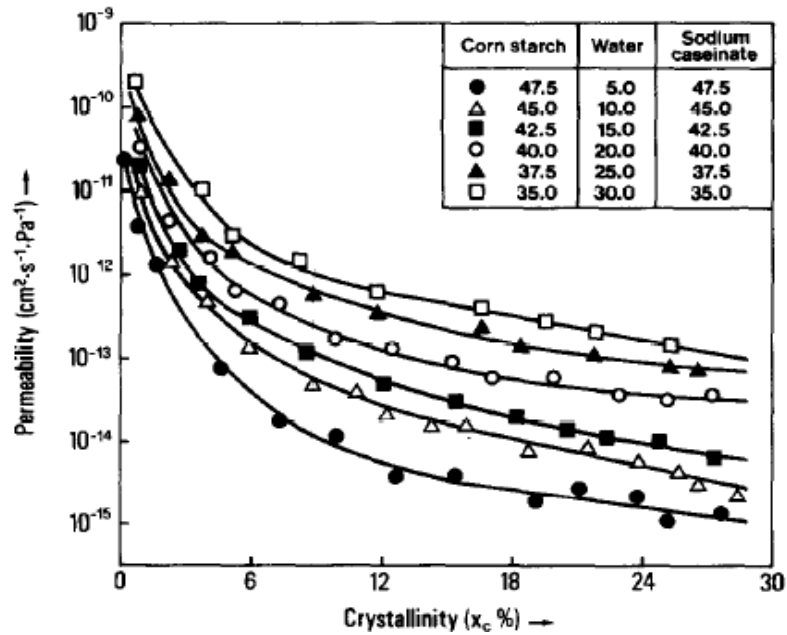


Figure 9 : Perméabilité à l'O₂ de films comestibles à base d'amidon de maïs et de caséinate de sodium (1 : 1 w/w) en fonction de la cristallinité développée (X_c %) durant le stockage[53].

La diffusion et la solubilité du pénétrant à travers les films comestibles dépendent aussi de la polarité des polymères filmogènes et de celle des molécules diffusantes. La présence des groupes polaires dans un film comestible donne lieu à des interactions avec un diffusant polaire. Un tel film en conséquence peut être une bonne barrière pour les gaz non polaires, alors qu'il sera perméable à l'eau. Les bonnes propriétés barrière aux gaz non polaires à l'état sec des films à base de protéines peuvent ainsi être expliquées par leur nature polaire. En revanche, cette nature rend ces films sensibles à l'humidité. En effet, étant donné que l'eau plastifie les polymères ayant des groupements polaires, la diffusivité à travers ces films va croître avec l'humidité relative de l'atmosphère environnante.

La température et la pression partielle du diffusant peuvent aussi éventuellement influencer la perméabilité si des interactions existent entre le polymère filmogène et les molécules diffusantes. Dans ce cas, la perméabilité augmente quand la différence de pression partielle du diffusant augmente. Cela est dû à l'augmentation du coefficient de diffusion ainsi qu'à l'augmentation de la solubilité du pénétrant qui sert de plastifiant dans le polymère. Les isothermes de sorption de l'eau peuvent mettre ce dernier phénomène en évidence. La figure 9 présente les isothermes de sorption de l'eau de films comestibles à base de pullulane et/ou de caséinate de sodium plastifiés à différents taux de sorbitol [66].

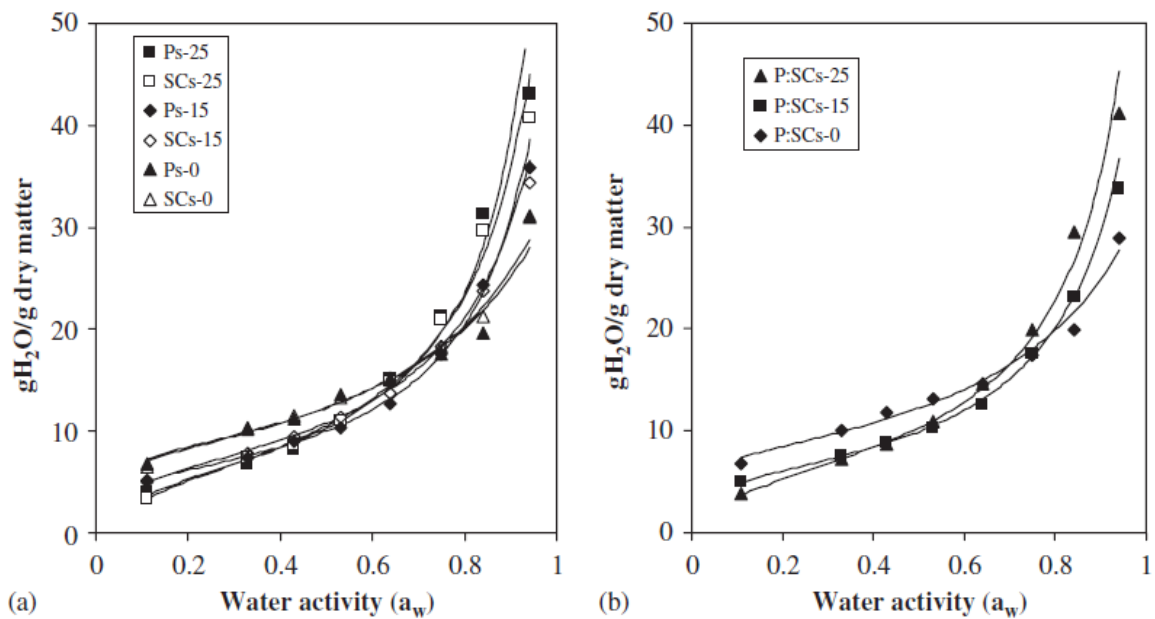


Figure 10 :(a) Isotherme de sorption de l'eau (à 25°C) de films comestible à base de pullulane (P) ou de caséinate de sodium (SC). (b) Isotherme de sorption de l'eau (à 25°C) de films comestible à base de mélanges de pullulane et de caséinate de sodium (P: SC)(s-0) pour les films préparés sans plastifiant ; (s-15) pour les films préparés avec 15% de sorbitol ; (s-25) pour les films préparés avec 25% de sorbitol. Les symboles présentent les points expérimentaux et les lignes solides le modèle de GAB appliqué[66].

En l'absence d'interaction, les concentrations absorbées du pénétrant dans le film sont très faibles et directement proportionnelles à la pression appliquée par le pénétrant.

I.1.4. Intérêts et limites à leur utilisation

I.1.4.1. Dans le domaine alimentaire

Il existe plusieurs avantages à l'utilisation des films comestibles dans le domaine alimentaire :

Les films comestibles peuvent emballer des petites portions de produits en dosettes individuelles comme le café, le thé, le cacao, la soupe déshydratée, ou encore les ingrédients et additifs alimentaires [67, 68]. Ils peuvent également séparer différentes parties dans le produit, par exemple, les fruits et la pâte dans un gâteau. Ce type d'applications offre des possibilités intéressantes de formulation et de préparation de l'aliment pour les individus et les

industriels[68]. Il faut également noter qu'un enrobage comestible peut aussi dans les cas où ils sont consommés avec l'aliment permettre la suppression des déchets d'emballage primaire.

L'utilisation des films et enrobages comestibles nécessite cependant des systèmes d'emballages secondaires pour des raisons d'hygiène et de manutention. En tant qu'emballage primaire, ils peuvent cependant permettre, grâce à leurs propriétés barrières aux gaz ou arômes, de réduire les emballages complexes multicouches secondaires en couche simple qui se recycle parfaitement[6, 69]. Notamment, les enrobages sur les fruits et les légumes prêt à l'emploi peuvent fournir une perméabilité sélective aux gaz (O_2/CO_2 ou O_2/H_2O) qui permet la respiration en limitant la déshydratation pendant le stockage[32].

Une amélioration de l'aspect de surface (le brillant) et du toucher (diminution du collant) peut être apportée grâce aux propriétés des films et enrobages comestibles à base d'hydrocolloïdes. Contrairement à ceux formés à partir de matières grasses ou de cire, qui possèdent souvent un aspect opaque, glissant et un goût de bougie, les films à base d'hydrocolloïdes sont généralement transparents, inodores et sans goût. La transparence d'un polymère est dépendante de sa morphologie mais indépendante de la structure ou de la masse moléculaire du matériau[37].

Les films et les enrobages peuvent également servir à maintenir une concentration élevée en colorants, en arômes, en épices ou en composés de flaveur, etc. Ce procédé peut aussi être mis à profit pour réaliser des films et enrobages comestibles enrichis par divers nutriments et vitamines [37, 67].

Les films et les enrobages peuvent aussi constituer des supports potentiels d'agents actifs (antimicrobiens, antioxydants, piégeant l'oxygène ou l'éthanol ou encore émetteurs d'éthanol). Les films actifs peuvent ainsi prolonger la durée de conservation d'un aliment en assurant la sécurité, la qualité nutritionnelle et sensorielle[70].

A côté de ces intérêts multiples, l'utilisation des biopolymères pour les emballages comestibles est soumise à des limitations. Les aliments emballés avec les films à base de protéines animales peuvent devenir bloquants vis-à-vis des végétariens. En plus, certains biopolymères sont de potentiels allergènes. Par exemple, des protéines comme le gluten, les caséines peuvent poser des problèmes d'allergie chez le consommateur[70, 71]. Pour éviter cela, un étiquetage adapté sur l'emballage pour informer de son contenu est nécessaire[30].

La comestibilité des films est dépendante de la formulation et du procédé de fabrication. Afin de garder leur comestibilité, les ingrédients doivent être de qualité alimentaire ce qui limite le choix des solvants à l'eau et l'éthanol[72].

Le caractère hydrophile des films comestibles rend leurs propriétés barrières aux gaz fortement dépendantes de l'humidité relative. Cela est un inconvénient pour les applications alimentaires car les légumes et les fruits possèdent généralement une activité de l'eau très élevée[32].

Jusqu'à présent, les prix relativement élevés des films comestibles notamment à cause de l'extraction coûteuse des biopolymères employés ou les modes de fabrication aux prix élevés (voie solvant par exemple), limitent encore grandement leur utilisation et leur commercialisation dans le secteur alimentaire.

I.1.4.2. Dans le domaine non alimentaire

Dans les exemples présentés ici, la nature des films ne change pas, ils sont toujours comestibles mais cette propriété n'est pas utilisée. Les films comestibles sont non-polluants parce qu'ils proviennent de polymères naturels entièrement renouvelables. En conséquence, ils contribuent à la protection de l'environnement[68]. Ce type d'emballages donne une image plus écologique au produit. Il est ainsi possible d'obtenir des labels « verts » pour l'emballage afin d'attirer les consommateurs qui portent un intérêt croissant aux « produits verts »[73]. Les films comestibles biodégradables peuvent également trouver des applications dans le domaine de l'agriculture notamment en tant que film de paillage[74].

De nombreuses applications des films comestibles dans les domaines biomédicaux et pharmaceutiques sont également possibles [75]. Les biopolymères employés pour la fabrication de ces films sont généralement non-cytotoxiques et biocompatibles. Ces films peuvent avoir des applications en servant de support en ingénierie tissulaire, comme revêtement des pansements ou encore pour la libération contrôlée d'agents [76-79]. Les revêtements pourront donner un toucher non-collant aux médicaments ou encore séparer les différents composés d'une capsule[75].

Les films comestibles à base de certaines protéines sont imprimables. Ils sont utilisés comme revêtement des papiers afin de donner une meilleure apparence, diminuer la perméabilité à l'eau[80] et rendre le papier résistant aux matières grasses[81].

Cependant, les applications non-alimentaires des films comestibles sont limitées par les propriétés mécaniques relativement faibles et la sensibilité à l'eau [82].

I.2. Focus sur les films à base de protéines

I.2.1. Les différentes protéines employées

I.2.1.1. Collagène et gélatine

Le collagène est la protéine animale la plus abondante. Elle se trouve dans le cartilage, la peau, les tissus conjonctifs et les os. C'est une protéine fibreuse, constituée de trois chaînes polypeptidiques. Le maintien de ces chaînes qui forment une triple hélice est assuré par des liaisons hydrogènes. Chaque chaîne a une masse molaire d'environ 100kDa. Elle est constituée principalement de glycine, proline et hydroxyproline. Les films de collagène sont les films comestibles à base de protéines les plus aboutis commercialement. Ils ont été traditionnellement utilisés pour préparer les boyaux comestibles de saucisses. Ils ont, en grande partie, remplacé les boyaux intestinaux des saucisses. Ils apportent les propriétés mécaniques nécessaires à ces produits à base de viande. En plus ils constituent une bonne barrière à l'oxygène et à l'humidité. Ces films ont été employés pour réduire le transfert de gaz et d'humidité dans les viandes[83].

La gélatine est quant à elle issue de la dénaturation thermique ou de la dégradation physique et chimique de la structure du collagène. Sa masse moléculaire varie de 3 à 200 kDa [84]. C'est une protéine semi-cristalline qui a une grande affinité avec l'eau[31]. Les films à base de gélatine sont rapportés comme de excellents barrières aux gaz, aux composés volatiles ainsi qu'aux rayons ultraviolets [85, 86].

Les propriétés des films de gélatine sont dépendantes de la source de la protéine. Par exemple la gélatine de la peau de requin est moins barrière à la vapeur d'eau que celle provenant d'autres poissons[87]. De nombreux auteurs [87, 88] ont proposé l'insertion des composés naturels hydrophobes dans des solutions filmogènes de collagène (figure 10) afin de réduire le caractère hydrophile et la perméabilité à la vapeur d'eau des films formés. Tongnuanchan *et al.*[88] ont utilisé des surfactants afin d'assurer une distribution homogène des huiles essentielles dans le réseau protéiques de collagène. Ils ont suggéré que l'utilisation des films contenant le couple approprié de surfactant/huile essentielle (figure 10c) peut être

envisageable dans le domaine de l'emballage alimentaire grâce à leurs propriétés antioxydantes.

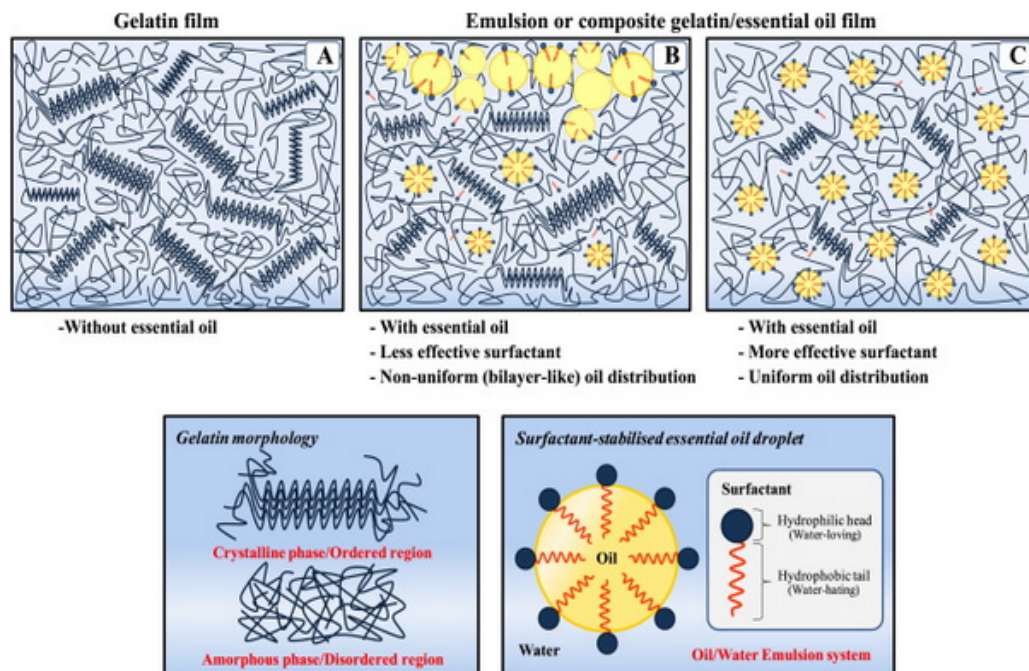


Figure 11 : Illustration simplifiée des réseaux protéiques à base de collagène sans (A) ou avec des huiles essentielles en présence de surfactants non-appropriés (B) et appropriés (C)[88].

I.2.1.2. Zéine de maïs

La zéine est un sous-produit de la mouture humide de maïs. Elle est obtenue par la précipitation de gluten de maïs extrait. La zéine se classe parmi les prolamines, qui sont solubles dans les solutions hydro-alcooliques à forte teneur en alcool. Elle est la principale protéine de réserve du grain de maïs, dans lequel elle s'accumule sous la forme de corps protéiques qui se lient par des ponts disulfure. Ces derniers peuvent être coupés en présence des agents réducteurs (ex. ions sulfite). L'extraction de la zéine reposant sur les différences de masse moléculaire, de solubilité et de charges des protéines, la zéine se divise en 3 groupes de protéines distinctes : l' α -zéine (75% à 80% de toute la zéine), la β -zéine (10% à 15% de la zéine totale), et la γ -zéine (5% à 10% de toute la zéine). Les zéines présentent une forte teneur en acides aminés apolaires: leucine, alanine et proline et une structure secondaire ayant des surfaces hydrophobes. Cela la rend insoluble dans l'eau. De plus, la présence de la glutamine et de la cystéine favorise respectivement les liaisons hydrogène et disulfure entre les corps

protéiques qui assurent la stabilité structurale de la zéine et renforcent l'insolubilité dans l'eau [89-91].

Plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation des films à base de zéine en tant qu'emballages comestibles actifs [92-94]. Unalan *et al.* [94] ont incorporé des agents actifs (lysozyme et EDTA) dans des revêtements à base de zéine pour enrober des boulettes de viande de bœuf congelées. L'application de ces revêtements a prolongé significativement la durée de conservation et la couleur de la viande. Rakotonirainy *et al.* [95] ont utilisé avec succès les films à base de zéine pour emballer des brocolis sous atmosphère modifiée. Arcan *et al.* [96] ont proposé les films à base de zéine pour un relargage contrôlé de deux agents actifs (le lysozyme et la catéchine) à la fois. Ils ont rapporté que l'insertion des acides gras en présence de lécithine a ralenti significativement la libération initiale des agents actifs. Ils ont expliqué ces résultats par une formation des microsphères dans la matrice protéique et l'encapsulation des composés actifs (figure 11). Ces films ayant des propriétés antimicrobiennes ainsi qu'antioxydantes ont été proposés pour des applications d'emballage actif alimentaire.

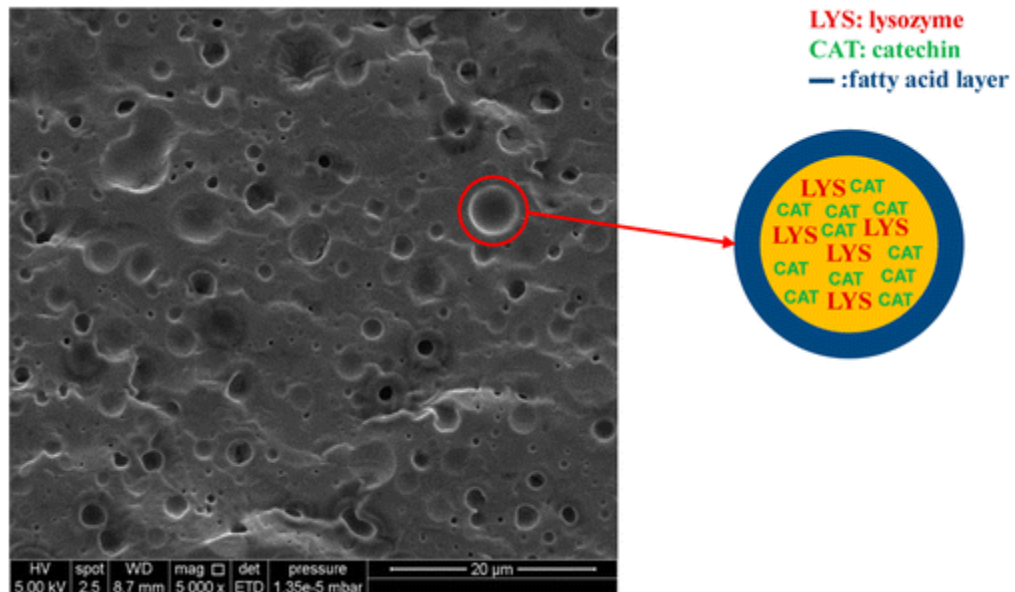


Figure 12 : Cliché de films composites à base de zéine, d'acides gras et de lécithine, incorporés avec du lysozyme et de la catéchine en tant qu'agents actifs : Présentation schématique de microsphères formées dans la matrice protéique[96].

I.2.1.3. Gluten de blé

Le gluten de blé est la fraction protéique obtenue après extraction des grains d'amidon. Il est principalement constitué de deux protéines, représentant 85% de protéines totales de la farine de blé : la gliadine (20 à 50 kDa) et la gluténine (environ 250 kDa). La gliadine a une structure globulaire contrairement à la gluténine qui a une structure en pelote statistique [97]. Ce sont ces protéines insolubles qui donnent à la farine des propriétés visco-élastiques [31]. Les gliadines sont responsables des propriétés élastiques de la farine. Elles agissent comme une charge diminuant les interactions entre les macromolécules de gluténines qui sont à l'origine du caractère visqueux [41].

Les gliadines sont solubles dans l'alcool, et les gluténines sont solubles, ou du moins dispersables, dans l'acide dilué ou dans des solutions basiques [97]. De nombreux auteurs ont étudié l'influence du pH sur les propriétés des films obtenus par la dispersion du gluten dans une solution aqueuse d'éthanol à différents pH [61, 98, 99].

Des revêtements de gluten ont été utilisés sur le papier cellulosique afin d'élaborer des films d'emballage sous atmosphère modifiés [100-102]. L'efficacité de ces emballages pour la conservation du persil frais [100], des champignons de Paris [101] et des fraises [102] a été démontrée. Barron *et al.* [103] ont comparé le film à base de gluten (figure 12b) avec un autre film hydrophile à base de copolymère polyéther - polyamide (Pebax®) (figure 12c) et un film microporeux non-sélectif (figure 12a). Ils ont appliqué les films pour conserver des champignons sous atmosphère modifiée. Suite à une évaluation de concentration en O₂ et en CO₂ durant le stockage à 10°C, 93% HR, ils ont pu montrer que seuls les films hydrophiles assurent une concentration faible de gaz dans l'espace tête des champignons grâce à leur perméabilité sélective. De plus, parmi les films hydrophiles, le film de gluten a proposé la meilleure sélectivité (figure 12).

Les films actifs antimicrobiens de gluten ont également été étudiés. Dawson *et al.* [104] ont incorporé un agent antimicrobien, la nisine, dans des films de gluten. Ils ont fabriqué des films par voie solvant et par compression. Ils ont montré que les films fabriqués par les deux méthodes possèdent une activité antimicrobienne avec une efficacité supérieure pour les films élaborés par la voie solvant.

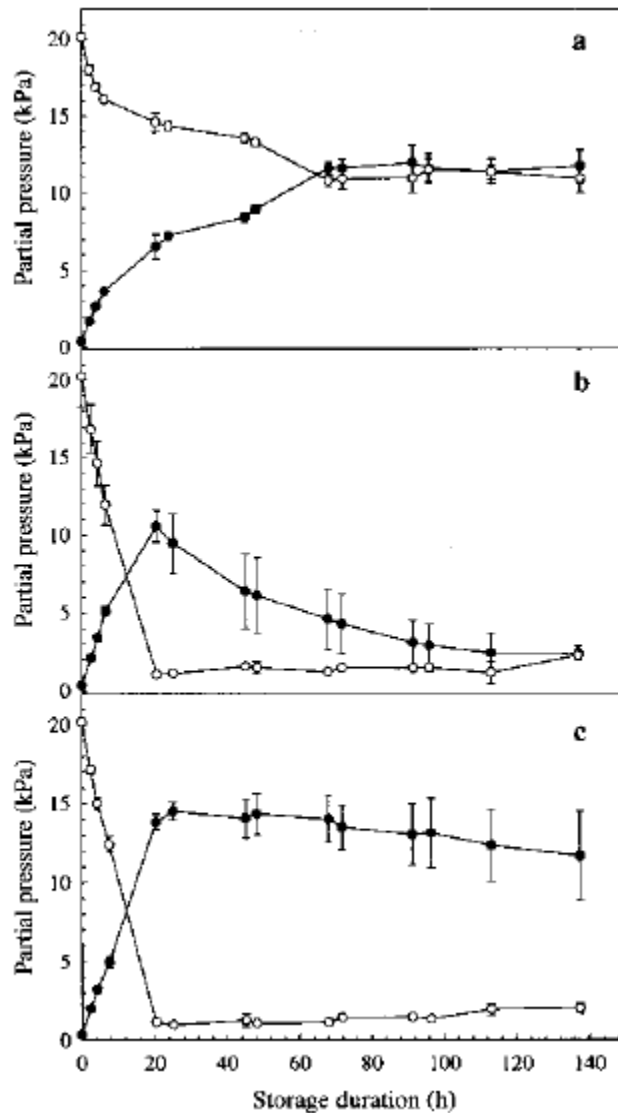


Figure 13 : Changement en fonction de temps de stockage (10°C et 92% HR) de la composition des gaz dans l'espace de tête de champignons emballés par des films variés : (a) film microporeux non-sélectif, (b) film de gluten de blé, (c) film Pebax® (copolymère polyéther - polyamide) (○ pression partielle en O₂, ● pression partielle en CO₂) [103]

I.2.1.4. Protéines de soja

La teneur en protéines dans le soja (38-44%) est plus élevée que la teneur en protéines des grains de céréales (8-15%) [7]. La protéine de soja utilisée dans l'industrie alimentaire est classifiée selon son niveau de pureté. La farine de soja déshuilée (DSF) contient entre 50-59% de protéines. Par une purification plus avancée de la DSF, on obtient un concentré de protéines de soja ayant entre 65 et 72% de protéines et finalement, un isolat de protéines de soja contient plus de 90% de protéines [97].

La majorité des protéines de soja est constituée de globulines qui se solubilisent dans les solutions salines à pH neutre. Ces protéines globulaires sont classifiées par leur taux de sédimentation relative. La protéine de soja contient quatre fractions dont les plus importantes sont : 7S (conglycinine) et 11S (glycinine). A l'inverse de la glycinine qui contient 20 ponts disulfures intramoléculaires, la conglycinine à cause de sa faible teneur en acide aminés soufrés contient seulement 2 à 3 ponts disulfures [7].

Les films de soja peuvent se former dans des conditions alcalines et acides. Les traitements thermiques et chimiques (changement de pH) peuvent influencer le processus de la formation de film, notamment par la formation des ponts disulfures dans la structure des films séchés. Gennadios *et al.*[98] ont montré que les films formés dans des conditions alcalines (pH de 8 à 10) ont des propriétés mécaniques et barrières meilleures que les films formés dans des conditions acides (pH de 1 à 3).

Les films à base de protéines de soja sont capables de réduire, l'absorption d'huile dans la pâte à biscuit pendant la friture [105]. Ils diminuent également l'oxydation des lipides et la perte d'eau pendant le stockage de filets de saumon [106] ou dans les boulettes de viande rouges précuites [107].

Des films de SPI (« soy protein isolates ») contenant des agents actifs naturels ont aussi été étudiés [108, 109]. Des films actifs contenant de la nisine ont montré une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* sur des viandes cuites prêtes à consommer [108]. L'efficacité des films actifs à base de SPI a également été rapportée pour la conservation des crevettes cuites [109]. En effet la durée de conservation a été prolongée de 12 jours grâce à ces films. González *et al.* [110] ont combiné les films à base d'acide poly lactique (PLA) et des films de SPI contenant ou pas la natamycine afin de produire des films multicouches (SPI-PLA) biodégradables antimicrobiens. Ils ont prouvé l'efficacité des films multicouches (PLA-SPI) sans ou avec conservateur sur les tranches de pomme par rapport aux films de polypropylène (PP). La figure 13 montre que les films de PLA-SPI sans conservateur retardent l'apparition des moisissures par rapport aux films de PP. De plus, les films multicouches de PLA-SPI contenant le conservateur ont protégé les fruits jusqu'à 55 jours contre la moisissure.

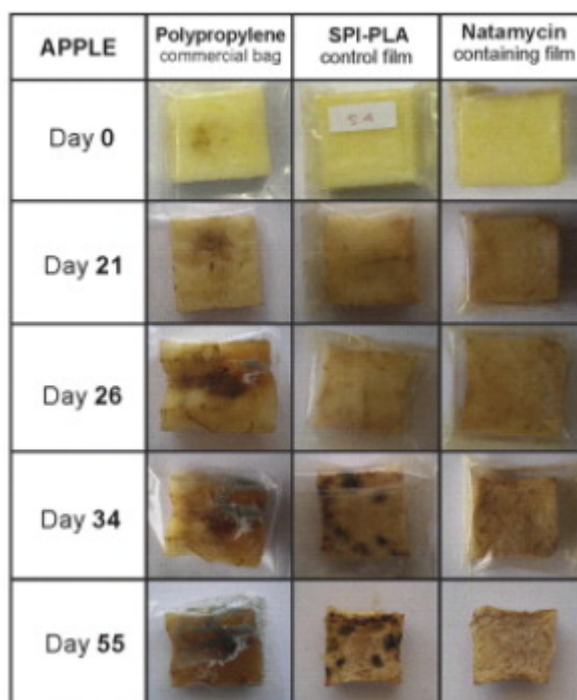


Figure 14 : Analyses visuelles de tranches de pomme emballées avec un film de polypropylène, un film multicouche (SPI-PLA) et un film multicouche (SPI-PLA) contenant de la natamycine [110].

I.2.1.5. Protéines de lait

Selon le *Codex alimentarius* (norme 206-1999), le lait est la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur. Le décret du 25 mars 1924 indique que la définition « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache [111]. Le lait entier cru est composé (tableau 4) de différentes phases dont l'équilibre est instable :

- une phase aqueuse stable : la phase dispersante contenant en solution des molécules de sucre, des ions et des composés azotés.
- une suspension colloïdale constituée des micelles de caséines. La stabilité de cette phase est assurée par une répulsion électrostatique de micelles chargées négativement dans le lait frais. Les facteurs extérieurs tels que la neutralisation des charges négatives peuvent déstabiliser cette phase en entraînant

l'agglutination des micelles de caséine puis la séparation du liquide aqueux dispersant. C'est la coagulation du lait.

- des globules gras en émulsion dans la phase aqueuse.
- des bactéries sous forme végétative ou sporulée, en suspension stable.

Tableau 4 : Composition d'un litre de lait [111]

| | | | |
|-------------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Eau | 900 à 910 g | | |
| Extrait sec | 125 à 135 g | | |
| Matière grasse | 35 à 45 g | | |
| Lactose | 47 à 52 g | | |
| Matières azotées | 30 à 36 g | 100 % | |
| Caséine | 24 à 28 g | 77 à 78 % | 100 % |
| Caséine α s1 | 9 à 11 g | | 36 % |
| Caséine β | 9 à 11 g | | 34 % |
| Caséine K | 3 à 4 g | | 13 % |
| Caséine α s2 | 3 à 4 g | | 10 % |
| Caséine γ 1, 2, 3 | 1 à 2 g | | 7 % |
| Protéines sériques | 5 à 7 g | 17 à 18 % | 100 % |
| B-Lactoglobuline | 2 à 4 g | | 50 % |
| A-Lactalbumine | 1 à 1,5 g | | 22 % |
| Sérum albumine bovine | 0,1 à 0,4 g | | 5 % |
| Immunoglobulines | 0,6 à 1,0 g | | 12 % |
| Protéase peptones | 0,6 à 1,8 g | | 10 % |
| Azote non protéique | | | |
| Créatine, Urée, Acides aminés | 1,5 g | 5 à 6 % | |
| Minéraux | 8,5 à 9 g | | |
| Calcium | 1,2 à 1,25 g | | |
| Phosphate | 0,95 g | | |

Les protéines laitières, parmi toutes les protéines alimentaires, sont parmi les mieux caractérisées du fait de leur importante consommation en qualité d'aliment et de la facilité de séparation des composants majeurs (micelles de caséines et protéines sériques)[112]. Même si au début, avec les caséines, l'usage des protéines laitières était plutôt industriel qu'alimentaire (colles, plastiques, etc.) aujourd'hui l'industrie agro-alimentaire est le premier secteur d'activités utilisateur de protéines laitières, en raison de leurs nombreuses fonctionnalités[113]. Les structures primaires et tridimensionnelles des 6 principales protéines du lait (caséines α s1, α s2, β et κ , β -lactoglobuline et α -lactalbumine) sont connues. Il devient

ainsi plus aisé de relier ces structures au comportement physico-chimique et fonctionnel et de prédire les propriétés d'un ingrédient dans un aliment déterminé en fonction des conditions de préparation[114].

Les protéines du lait peuvent être subdivisées en deux grandes catégories : les protéines du lactosérum et les caséines, qui correspondent à deux formes structurales très différentes. Ainsi les propriétés fonctionnelles et les techniques d'extraction utilisées pour ces deux groupes ne sont pas les mêmes. Les principales propriétés fonctionnelles des protéines du lait sont résumées sur le tableau 5.

Tableau 5 : Principales propriétés fonctionnelles des protéines du lait [114].

| Propriétés | Caséines | Protéines du lactosérum |
|---------------------------------|--|--|
| Solubilité | Insolubles à pH 4,6 | Très solubles à tous les pH. Insolubles à pH=5 si thermo-dénaturées |
| Viscosité | Solutions très visqueuses à pH neutre et alcalin. Viscosité minimale au pHi (4,6) | Solutions peu visqueuses sauf si thermo-dénaturées |
| Hydratation | Rétention d'eau élevée avec formation de colle à forte concentration. Minimale au pHi | Rétention d'eau s'accroissant avec la dénaturation |
| Gélification | Pas de gélification thermique sauf en présence de calcium. Gélification de la micelle par la chymosine | Thermo-gélification à partir de 70°C : influence du pH et des sels |
| Propriétés émulsifiantes | Excellentes propriétés émulsifiantes surtout à pH neutre et alcalin | Bonnes propriétés émulsifiantes sauf à pH 4 à 5 si thermo-dénaturation |
| Propriétés moussantes | Bon foisonnement mais faible stabilité des mousses $\kappa > \beta > \alpha_{s1}$ | Bon foisonnement et excellente stabilité des mousses β -lactoglobuline > α -lactalbumine |
| Rétention d'arômes | Bonne rétention | Rétention très variable avec l'état de dénaturation |

a. Les protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum sont aussi appelées protéines du "petit-lait", protéines sériques ou encore, protéines solubles car elles ne précipitent pas lors de la coagulation du lait, après ajout de chymosine (présure) ou lors de l'acidification. Elles constituent environ 20% des protéines totales laitières[83]. Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie fromagère. Parmi les techniques de fractionnement pour obtenir les protéines à partir de lactosérum, peuvent être citées : l'ultrafiltration, la filtration sur gel ou encore la précipitation des complexes protéiques tels que les complexes avec la carboxyméthylcellulose et les polyphosphates [115]. Les paramètres de ces procédés peuvent être ajustés afin d'extraire les protéines de lactosérum à des taux de pureté variables [116]. Les concentré de protéines du lactosérum (« whey protein concentrate » WPC) sont produits industriellement à une teneur en protéines comprise entre 25% et 80% tandis que l'isolat de protéines du lactosérum (« whey protein isolate » WPI) en contient plus de 90%. Les procédés pour la purification des différentes protéines sériques sont accompagnés d'un coût de production extrêmement élevé. De ce fait, très peu d'études se sont focalisées sur la mise en œuvre de films comestibles à base des protéines majeures du lactosérum (α -lactalbumine et β -lactoglobuline)[67, 116, 117], la plupart des études étant effectuées avec des protéines sériques en mélanges comme dans les concentrats ou les isolats de protéines sériques.

Les protéines du lactosérum se répartissent en 5 groupes: la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, les immunoglobulines, la sérumalbumine et la lactoferrine avec des taux de distributions théoriques de respectivement 52, 20, 12, 7, et 9% [117]. Ce sont majoritairement des protéines globulaires dont la structure spatiale est peu influencée par le pH et les sels mais qui présentent une grande sensibilité aux traitements thermiques[114].

Ces protéines contiennent dans leur structure primaire beaucoup d'acides aminés soufrés qui peuvent former des ponts disulfures ou bien être sous la forme de groupes thiols libres. La dénaturation thermique au-delà de 65°C rompt leur structure globulaire en une conformation de type « pelote statique ». Cette dénaturation thermique peut s'accompagner de l'oxydation des groupements sulfhydriles, de l'échange de ponts disulfures et de modifications des interactions hydrophobes [67, 114, 117].

Les films à base de protéines du lactosérum peuvent être fabriqués à partir de solutions aqueuses, avec ou sans dénaturation thermique. Dans le cas d'une dénaturation thermique, la

formation des films est assurée par des interactions hydrophobes et l'établissement de ponts disulfures intermoléculaires. Dans le cas des films à base de protéines natives (n'ayant pas subi une dénaturation thermique), la cohésion est maintenue principalement par des liaisons par pont hydrogène et des interactions hydrophobes puisque les protéines natives conservent leur structure globulaire [118]. Les films obtenus par les deux méthodes sont transparents et possèdent des propriétés barrières à l'eau similaires si la solution préparée à pH i. En revanche la solubilité et les propriétés mécaniques sont différentes pour les deux types de films. La structure ouverte des protéines dénaturées ayant un caractère hydrophobe donne des films insolubles dans l'eau avec une tenue mécanique supérieure à celle des films obtenus à partir des protéines natives qui, eux, sont hydrosolubles [119].

Les films comestibles et antimicrobiens à base de protéines du lactosérum ont été étudiés par plusieurs auteurs. Cagri *et al.* ont utilisé des films actifs comme enveloppes sur des hot dog [120] et sur des saucissons [121] pour contrôler la croissance de *Listeria monocytogenes*, d'*Escherichia coli* et de *Salmonella enterica*. Des revêtements comestibles formés avec ces protéines ont réduit le brunissement enzymatique de pommes pré-coupées [122, 123].

b. Les caséines et les caséinates

Les caséines sont des protéines synthétisées uniquement par les glandes mammaires. Elles représentent environ 80% (30-35g/L) des protéines totales du lait [124] et sont structurées en superstructures sphériques volumineuses formant la micelle de caséine dont le diamètre moyen généralement admis est voisin de 180 nm. La taille des micelles peuvent varier entre 30nm-600nm en fonction de l'espèce de mammifère, de la saison, du stade de lactation et des divers traitements du lait [125]. La figure 14 représente les clichés obtenus par microscopie électronique par transmission des micelles de caséine dans le lait maternel (humain) et bovin. Les micelles de caséine [117] sont constituées de plusieurs centaines de monomères. On peut distinguer 4 types de caséines : α_{s1} (23,6 kDa), α_{s2} (25,2 kDa), β (24 kDa), κ (19 kDa), avec une distribution respective d'environ 38%, 10%, 36% et 13% [124]. Les proportions des différentes caséines dans le lait peuvent varier d'une espèce à l'autre (tableau 6). Les micelles contiennent également une partie minérale (8% du poids sec) comportant 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium [125].

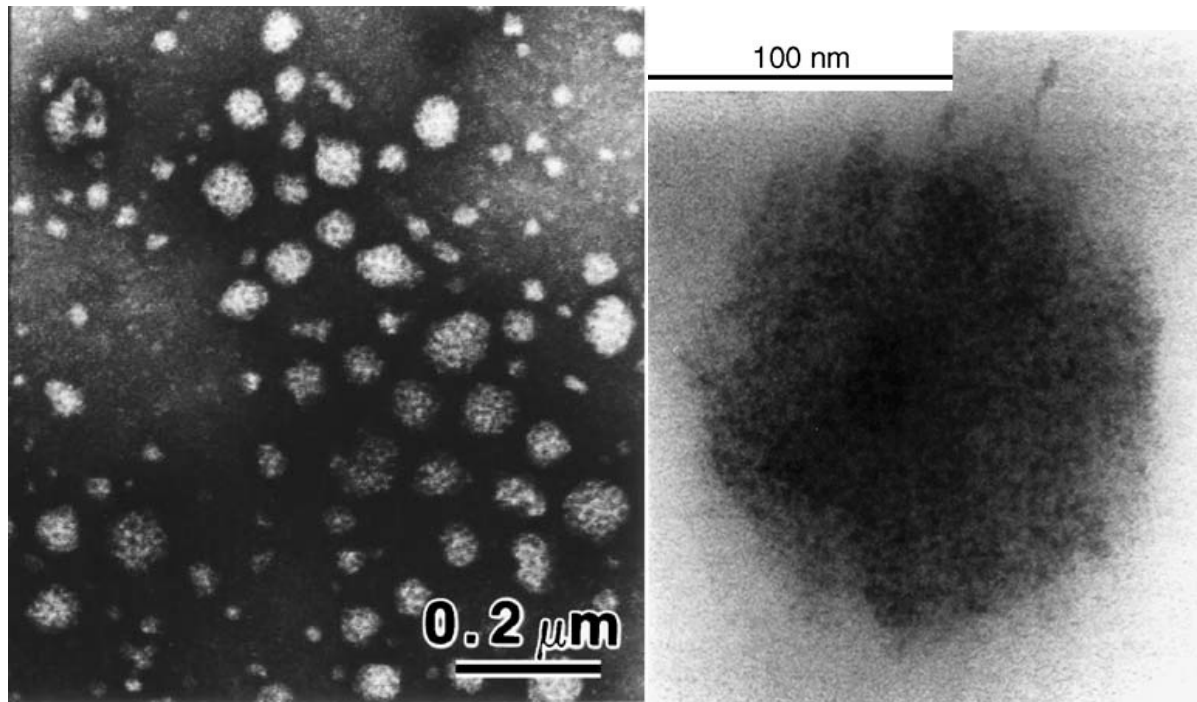


Figure 15 :Clichés obtenus par microscopie électronique par transmission de micelles de caséine dans le lait maternel (à gauche) et dans le lait bovin (à droite) [126]

Tableau 6 : Proportion des différentes caséines dans le lait de quatre mammifères (d'après les données de Ono et al. ,1989)

| % (m/m) caséines | α_s ($\alpha_{s1} + \alpha_{s2}$) | β | κ |
|-------------------------|---|---------------------------|----------------------------|
| Bovines | 49,6 | 37,3 | 13,1 |
| Caprines | 50,5 | 43,2 | 6,2 |
| Ovines | 48,5 | 38,1 | 13 |
| Equines | 58,0 | 42 | Pas identifié |

Les caséines α_s sont sensibles aux ions calcium. Elles précipitent à pH=7 en présence de $<0,4$ M de Ca^{2+} . Leur teneur en proline qui a une distribution uniforme sur la structure primaire, réduit la conformation tridimensionnelle en hélice[127]. De plus, les résidus hydrophiles et phosphorylés des caséines α_s ont une distribution plus régulière par rapport à la caséine β . Cela leur donne plus de charges négatives à pH neutre et un caractère moins hydrophobe par rapport à la caséine β [125]. De ce fait, les caséines α_s ont moins tendance à former des agrégats en absence de calcium[127].

L'hydrophobicité de la caséine β est la plus forte de toutes les caséines. C'est aussi la protéine où la répartition d'une zone hydrophobe (C-terminale) et d'une zone hydrophile (N-terminale) est la plus marquée. La région N-terminale de la caséine β a un caractère très hydrophile dû aux résidus phosphorylés et aux groupes carboxyliques. La caséine β a une forte proportion de résidus de proline répartis assez régulièrement le long de la chaîne peptidique[125]. Cette teneur en résidus prolyl donne à la caséine β une conformation en pelote gaussienne (« randomcoil »)[114, 117, 124, 125, 127]. La caséine β est très amphiphile et forme des agrégats dans des solutions aqueuses. Ce sont des fausses micelles ayant un cœur hydrophobe et une surface très hydrophile[127].

La caséine κ est la seule de toutes les caséines qui soit glycosylée. La partie correspondant au glycomacropéptide (C-terminale) est de nature très hydrophile et donne un caractère très amphiphile à la protéine. La perte de ce pôle hydrophile stabilisant, notamment lors de l'hydrolyse par la chymosine, cause la précipitation des micelles. La partie N-terminale est légèrement cationique et au contraire très hydrophobe[125].

Les caséines majeures α_{s1} et β n'ayant pas de structure tridimensionnelle stabilisée par des ponts disulfures, rendent la micelle en solutions très stable à la chaleur, mais en revanche, très sensible au pH et aux cations divalents[128]. Cette sensibilité est due au caractère amphiphile des caséines et aux régions phosphorylées qui sont chargées négativement à pH neutre. La surface de la micelle est très hydrophile, en raison d'une grande richesse de la périphérie en caséine κ ; cela lui confère des propriétés d'hydratation exceptionnelles ainsi qu'une excellente aptitude à la fixation sur la membrane des globules gras du lait[114].

Les caséines se distinguent des protéines globulaires et fibrillaires avec leur propriété physique. Elles sont dipolaires et amphiphiles avec une structure spatiale en random-coil. Elles possèdent de très bonnes propriétés en tant que surfactants grâce à leur caractère amphiphile et d'excellentes propriétés filmogènes grâce à leur flexibilité moléculaire élevée. Elles ont aussi une résistance à la dénaturation thermique assez remarquable contrairement aux protéines du lactosérum, qui sont thermolabiles.

En plus de ces atouts technologiques, les caséines sont attractives grâce à leur qualité nutritionnelle. Elles sont facilement digestibles grâce à leur structure ouverte « rondon-coil » à l'état native, c'est ce qui assure leur valeur (accessibilité) nutritive. De plus, leur propriétés sensorielles et leur potentiel pour protéger convenablement les aliments du milieu environnant rendent les caséines intéressantes pour des applications de revêtements et de films comestibles[124].

Selon leur mode d'extraction et de purification, plusieurs types de caséine existent [117, 125]:

- La caséine acide est obtenue par précipitation du lait écrémé à pH=4,6 par un acide (minéral ou lactique). Elle perd sa structure micellaire native par élimination des minéraux (Ca, phosphates) et du citrate. Son utilisation nécessite une solubilisation à un pH différent de pH=4,6.
- La caséine présure provient de la coagulation enzymatique de la caséine micellaire par le chymosine (présure). Dans le coagulum obtenu, le calcium reste lié et rend la caséine insoluble à pH neutre.
- Les caséinates sont obtenus par neutralisation à pH 6,7 des caséines acides à l'aide de sels alcalins (sodium, potassium, ammonium ou calcium) suivi d'une pasteurisation puis un séchage par atomisation. Le caséinate obtenu prend le nom du sel utilisé (caséinate de sodium, caséinate de potassium...).

La caséine acide et la caséine présure sont insolubles dans l'eau tandis que les caséinates (Na^+ , K^+ , NH_4^+) sont complètement solubles à un pH>5,5. Les solutions de caséinate ayant une concentration de 10 à 15% de protéine peuvent être préparées pour des pH allant de 6 à 8. Au-delà de 15% de protéine, la viscosité augmente rapidement. 20% de protéine est la concentration maximale pour la préparation d'une solution[128].

Les films et les enrobages comestibles à base de caséine et de caséinate ont été beaucoup étudiés dans la littérature. Les enrobages ont été appliqués sur les fruits et légumes entiers ou pré coupés tels que des carottes, des courgettes, des pommes, des tranches de céleri et des agrumes [129-132]. Des enrobages à base de caséines et de lipides ont permis de réduire le blanchiment et la déshydratation des carottes [129]. Des enrobages à base de caséinate de calcium obtenus par réticulation ont diminué la perte d'eau dans des tranches de céleri et de courgette [130, 131]. Dans les cas les plus favorables, la durée de stockage a été prolongée de 20 jours pour des fruits agrumes enrobés par des formulations de caséine[132].

Les études plus récentes ont également montré l'efficacité des films à base de caséinates contenant des agents actifs contre la croissance de micro-organismes indésirables. Des films à base de caséinate de sodium contenant de la nisine ont été proposés afin de surmonter les problèmes de contamination de fromages durant le stockage [133, 134]. Mendes de Souza *et al.*[135] ont fabriqué des films réticulés à base de caséinate de sodium pour la libération contrôlée du lysozyme. Ils ont pu réduire la vitesse de libération de l'agent pour permettre de

conserver plus longtemps des aliments périssables. Sanchez-Gonzales *et al.*[136] ont même introduit dans des films de caséinate de sodium des bactéries lactiques qui produisent des bactériocines. Ces films ont pu totalement inhiber la croissance de *Listeria innocua* pendant une semaine de stockage dans des conditions de réfrigération. Enfin, Arrieta *et al.*[137] ont introduit du carvacrol dans des films à base de caséinate de calcium et de sodium. Ils ont utilisé avec succès ces films antimicrobiens pour inhiber la croissance d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*. Une étude récente réalisée dans le laboratoire où la présente thèse également s'est déroulé a démontré la possibilité de fabriquer des films comestibles à base de caséinate de sodium par des méthodes conventionnelles de la plasturgie : extrusion bi-vis et extrusion-gonflage [50]. La fabrication en continu à grande échelle de ces films est intéressante pour envisager leur commercialisation en tant qu'emballage.

I.2.2. Les caractéristiques

I.2.2.1. Propriétés mécaniques

Les films comestibles à base de protéines semblent avoir une résistance et un allongement à la rupture plus faibles que les films synthétiques comme la plupart des films à base de polysaccharides. Cependant, pour des taux de plastification réduits des films à base de protéines, certaines valeurs obtenues pour la résistance à la rupture et le module élastique se rapprochent des valeurs obtenues pour les films de polyéthylène (PE) et de polypropylène (PP). En revanche, l'élongation de ces films est une ou deux fois inférieure à celle des films de PE ou de PP [30]. Il est à noter que les propriétés mécaniques des films à base d'agropolymères doivent être comparées dans des conditions environnantes (humidité relative et température) contrôlées. L'eau est un plastifiant efficace et la sorption d'eau dans les agropolymères peut varier en fonction de la température. Le taux de plastification et donc les propriétés mécaniques des films peuvent être dramatiquement modifiées par l'humidité relative et la température.

Afin d'améliorer les propriétés mécaniques des films comestibles à base de protéines, les paramètres de fabrication des films sont souvent modifiés. Des méthodes variées ont été adoptées par différents auteurs: des changements de pH ou de solvant, l'utilisation d'enzymes des traitements thermiques ont par exemple, été appliqués pour améliorer la résistance à la rupture des films.

Il a été démontré qu'un traitement thermique augmente généralement la rigidité et diminue la flexibilité des films comestibles à base de protéines. Ali *et al.*[138] ont démontré qu'il existe une relation linéaire croissante entre la température appliquée et la résistance à la rupture de films à base de gluten de blé. Cependant, l'influence du temps d'exposition est exponentielle. Contrairement à l'amélioration de la résistance à la rupture, la capacité à l'allongement des films baisse suite aux traitements thermiques (figure 15). Des résultats similaires ont aussi été communiqués pour des films à base de protéines de soja [139, 140] ainsi que des films à base de protéines de lactosérum [141, 142]. Cet effet est expliqué par une réticulation induite par le traitement thermique. Par exemple pour les protéines contenant la cystéine, les thiols (SH) et les ponts disulfures (S-S) jouent un rôle important dans la structure du réseau protéique. Hernandez-Munoz *et al.* [143] ont étudié l'influence de traitements thermiques sur des films à base de gluten, enrichis en gliadine, ou enrichis en gluténine. Ils ont démontré que le changement en propriétés mécaniques de ces films se produit à des températures qui entraînent des réactions d'échange thiols/ponts disulfures. En conséquence, au-delà d'une certaine température, les propriétés mécaniques cessent de varier et se stabilisent.

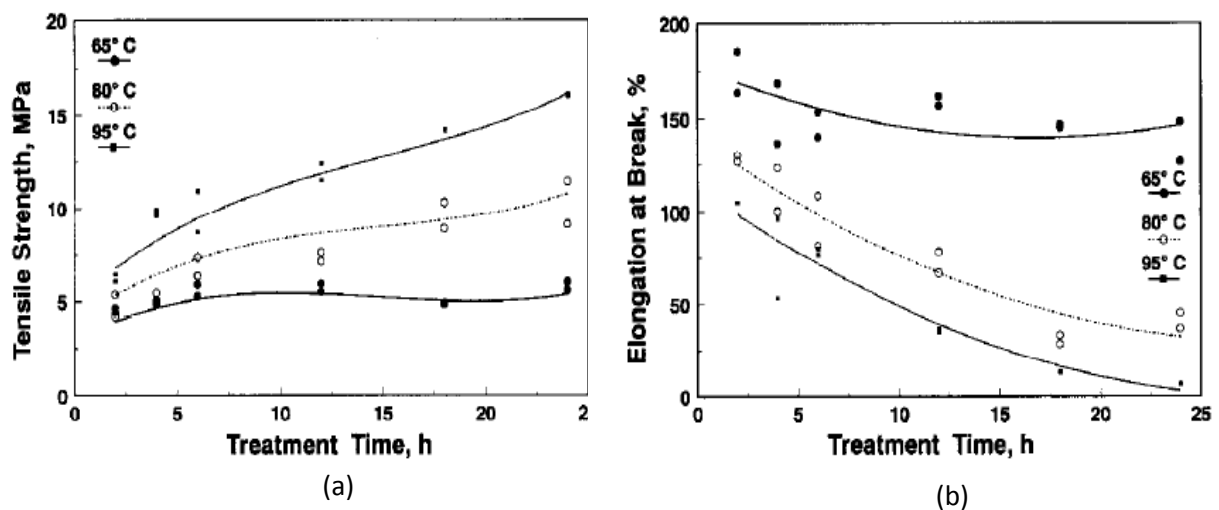


Figure 16 :Résistance (a) et élongation (b) à la rupture de films à base de gluten de blé en fonction de la durée et de la température (65°C, 80°C et 95°C) des traitements thermiques appliqués[138].

Le pH est un autre facteur qui influence significativement les propriétés finales des films à base de protéines. Gennadios *et al.* [98] ont rapporté que la protéine de gluten de blé (pHi=4,5) et la protéine de soja (pHi=7,6) se dispersent difficilement aux pH proches du point isoélectrique (pHi). Concernant les films, ils montrent une flexibilité nettement meilleure s'ils sont formés à des pHs supérieurs au pHi.

L'utilisation d'enzymes comme la transglutaminase entraîne la polymérisation de protéines en induisant la formation de liaisons covalentes, et peut permettre d'augmenter la résistance à la rupture des films [144]. Chambi *et al.*[145] ont signalé que la réticulation par la transglutaminase des films à base de caséine et de gélatine améliore notablement l'allongement à la rupture. Ils notent également que l'amélioration de la résistance ou de l'allongement à la rupture par l'enzyme sont grandement dépendantes de l'intensité de réticulation créée dans le réseau filmogène.

Il existe d'autres traitements tels que l'irradiation gamma et ultraviolet. Ces traitements ont été appliqués pour améliorer la résistance mécanique de films à base de protéines de soja [146], de gluten de blé, de zéine de maïs, d'ovalbumine [147] ou de caséinate de calcium [148]. Les améliorations de la résistance observées sont attribuées principalement à la formation de liaisons covalentes entre résidus tyrosine.

1.2.2.2. Propriétés barrières aux gaz

Les films plastiques en polyoléfine (LDPE, HDPE, etc.) sont connus pour avoir de bonnes propriétés barrières à la vapeur d'eau mais leurs propriétés barrières sont faibles en ce qui concerne l'oxygène. C'est généralement l'inverse en ce qui concerne les films comestibles à base de protéines. Pour des taux de plastifiants et d'humidité faibles, les films à base de protéines sont comparables aux films d'EVOH et de PVDC en ce qui concerne les propriétés barrières à l'O₂ [30]. Par contre, ils sont très mauvais en termes de barrière à l'humidité.

Le caractère polaire des protéines est un facteur déterminant pour les propriétés barrières aux gaz de leurs films. Les films comestibles à base de protéines ont des propriétés barrières aux substances polaires telles que la vapeur d'eau faibles et inversement des propriétés barrières aux substances non-polaires telles que l'O₂ et le CO₂ élevées. Comme indiqué précédemment, les plastifiants, tels que l'eau, augmentent la perméabilité des films protéiques. Les propriétés barrières aux substances polaires mais aussi aux substances non-polaires de leurs films diminuent avec l'augmentation du taux de plastification et d'humidité

relative. De nombreux travaux sont effectués sur les paramètres de fabrication des films pour améliorer leurs propriétés barrières aux gaz ou encore pour diminuer la dépendance à l'humidité relative de ces propriétés. Beaucoup d'auteurs ont testé l'efficacité des substances non ou peu polaires, comme les acides gras ou les cires, afin de rendre les films moins sensibles à l'humidité relative tout en améliorant les propriétés mécaniques comme la flexibilité[149]. Fabra *et al.*[150]ont ajouté des mélanges d'acide oléique et de cire d'abeille à des taux variés dans des films à base caséinate de sodium. La quantité incorporée de mélanges de lipides était de l'ordre de 33% pour tous les films sauf le témoin (contrôle) (sans lipides). Ils ont démontré que la perméabilité à la vapeur d'eau des films a considérablement diminué. La perméabilité est ainsi devenue beaucoup moins dépendante de la concentration d'eau dans ces films (figure 16).

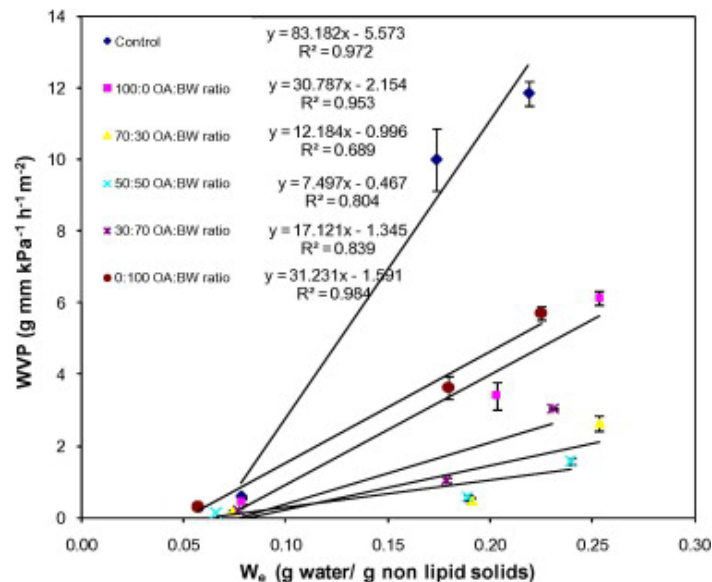


Figure 17 : Perméabilité à la vapeur d'eau en fonction de la fraction massique d'eau à l'équilibre dans les films. Pour les films à base de caséinate de sodium sans lipides (témoin) et pour les films à base de caséinate de sodium contenant 33% de mélanges de lipide (acide oléique – cire d'abeille, 100 :0 ; 70 :30 ; 50 :50 ; 30 :70 ; 0 :100)[150]

La nature hydrophobe des lipides apporte aux films à base de protéines une amélioration des propriétés barrières à l'eau. En revanche, elle pose un inconvénient sur les propriétés barrières aux gaz polaires : O₂ ou CO₂. Fabra *et al.*[150] ont observé que l'ajout de lipides a grandement augmenté la perméabilité des films à l'O₂ et au CO₂ (figure 17).

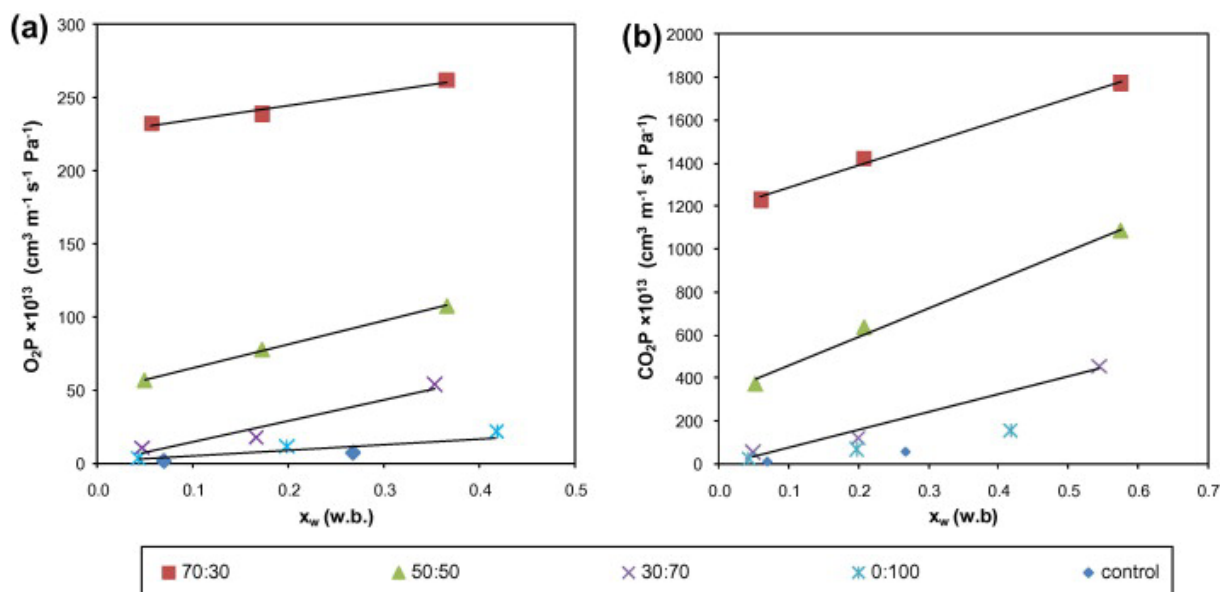


Figure 18 : Perméabilité à l'O₂ (a) et au CO₂ (b) en fonction de la fraction massique d'eau à l'équilibre dans les films. Pour les films à base de caséinate de sodium sans lipides (témoin) et pour les films à base de caséinate de sodium contenant 33% de mélanges de lipides (acide oléique – cire d'abeille, 70 :30 ; 50 :50 ; 30 :70 ; 0 :100) [150]

Les propriétés barrières aux gaz des films à base de protéines sont influencées par les traitements cités dans le chapitre précédent. En effet, toutes interventions sur la structure du réseau protéique ont forcément des conséquences sur la perméabilité. La réticulation provoquée par le traitement thermique des films à base de protéines de lactosérum, de soja, ou de protéines de gluten ont diminué [140, 141, 143] la perméabilité à la vapeur d'eau. Cela est dû à la flexibilité réduite des films suite à la formation de liaisons covalentes. Ce type de traitement, contrairement à l'ajout de substances hydrophobes, diminue la perméabilité aux gaz polaires mais aussi aux gaz apolaires. Cela est dû à la diminution des volumes libres dans la structure qui impacte négativement la diffusion à travers les films. De même, la réticulation par induit par un changement de pH peut renforcer les propriétés barrières des films à base de protéines [151].

L'irradiation gamma a été aussi efficace pour diminuer la perméabilité à la vapeur d'eau des films à base de protéines de lait [148, 152]. Cependant, l'irradiation UV n'a pas influencé la perméabilité à la vapeur d'eau des films à base de gluten, de zéine et de caséinate de sodium [147].

I.3. Les films comestibles antimicrobiens

I.3.1. Quels agents antimicrobiens pour fonctionnaliser des films comestibles ?

Avant tout, d'un point de vue réglementaire, toutes substances destinées à être libérées dans les denrées alimentaires ou dans leur environnement sont considérées comme des ingrédients (Directive CE n° 1935/2004) et donc doivent être autorisées comme additifs pour les aliments destinés à être en contact. L'utilisation d'agents antimicrobiens non-alimentaires est possible uniquement dans le cas où l'agent est immobilisé sur le polymère filmogène[153]. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons sur les conservateurs de qualité alimentaire puisque les systèmes d'emballages en question sont comestibles.

Les emballages antimicrobiens peuvent être classés en 2 groupes :

- ceux contenant des agents actifs qui migrent délibérément vers la surface des denrées alimentaires.
- ceux qui sont efficaces contre une contamination potentielle sur la surface des aliments sans migration éventuelle de l'agent actif. Ces derniers contiennent des agents actifs immobilisés sur le polymère filmogène ou bien le polymère filmogène possède lui-même un caractère antimicrobien(exemple du chitosane)[154]. Ces deux groupes d'emballages antimicrobiens seront discutés plus en détail dans le chapitre suivant (3.2).

De nombreuses substances antimicrobiennes peuvent être intégrées dans les films comestibles afin de créer des systèmes d'emballages comestibles et antimicrobiens. Elles peuvent être regroupées en fonction de leur nature (i.e. les agents obtenus par synthèse chimique, les agents naturels)[153], mais aussi en fonction de leur volatilité (en distinguant les agents volatils (le carvacrol par exemple) des non-volatils (le lysozyme ou la nisine par exemple)[155]. Dans ce document, nous allons donc diviser les agents antimicrobiens selon leurs modes de migrations : en effet, la migration des agents volatils des emballages ou enrobages comestibles vers les aliments ne suit pas les mêmes mécanismes que celle des agents non-volatils.

Le tableau 7 présente des exemples d'agents antimicrobiens volatils utilisés pour fonctionnaliser des films comestibles.

Tableau 7 : Les exemples d'agents antimicrobiens volatils de qualité alimentaire (adapté depuis Han [70])

| <i>Agents antimicrobiens volatils d'origine chimique</i> | |
|--|--|
| Gaz | Dioxyde de carbone, azote, ozone, dioxyde de soufre |
| Alcool | Ethanol |
| Esters | Esters de l'acide dicarbonique, <i>p</i> -biphényl, esters de l'acide hydroxybenzoïque |
| Les composés phénoliques | Biphényl, <i>o</i> -phénylphénol, thiabendazole. |
| <i>Agents antimicrobiens volatils d'origine naturelle</i> | |
| Les huiles essentielles et les extraits des plantes | Cannelle, clou de girofle, ail, gingembre, citron, moutarde, origan, poivre, thym |
| Arômes phénoliques | Aldéhyde cinnamique, thymol, menthol, eugénol, vanilline |
| Phyto-composés | Phyto-phénols, saponines, flavonoïdes, catéchine |
| Acides gras | Acide laurique, acide palmitoléique |

Concernant les agents volatils, la libération est principalement contrôlée par la diffusion à travers l'emballage et la pression partielle de vapeur à la saturation. L'agent initialement présent dans le film comestible vaporise dans l'atmosphère inerte de l'emballage, arrive sur la surface de l'aliment et finalement doit être absorbé par l'aliment.

La libération contrôlée de l'agent actif est très importante pour maintenir une concentration qui est supérieure à la concentration minimale d'inhibition des micro-organismes cibles à la surface de l'aliment. Cette libération est grandement dépendante de la volatilité de l'agent actif qui est dominée par les interactions chimiques entre le polymère filmogène et l'agent actif. Afin de contrôler la volatilité de l'antimicrobien, plusieurs techniques sont proposées comme par exemple, les films comestibles multicouches ou encore l'encapsulation[156]. Almenar *et al.*[156] ont encapsulé l'hexénal, un composé naturel volatil ayant un effet fongicide dans des β -cyclodextrines afin de contrôler sa libération.

Parmi les agents antimicrobiens hautement volatils, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les esters et certains composés naturels de plantes peuvent être utilisés. Les acides gras, les huiles essentielles sont des agents antimicrobiens relativement moins volatils. L'efficacité

contre des bactéries Gram positives ainsi que dans une moindre mesure des bactéries Gram négatives d'huiles essentielles extraites d'épices ou de plantes/herbes aromatiques a été démontrée par de nombreux auteurs qui les ont incorporées[157, 158]ou pas [159, 160] dans des films comestibles. En revanche, ces auteurs ont réalisé des études par simulation en mettant l'agent antimicrobien en contact direct avec l'aliment. Almenar *et al.* ont utilisé un agent antimicrobien naturel volatil (la 2-nonanone) pour renforcer l'efficacité des systèmes d'emballages non-comestibles sous atmosphère modifiée[161].

Les avantages dans l'utilisation des composés volatils comme agents antimicrobiens, sont notamment :

- Premièrement, leur efficacité sans contact direct avec l'aliment emballé[162]. Becerril *et al.*[163] ont démontré que des extraits de cannelle et d'origan sont efficaces en phase vapeur (figure 18) mais aussi en contact direct (figure 19).

- Deuxièmement, leur capacité à pénétrer dans des matrices variées et la possibilité d'utilisation avec succès pour des aliments peu transformés tels que la viande hachée[164] ou des petits fruits comme les fraises [165].

- Enfin, la facilité d'acceptation par le consommateur et par les autorités réglementaires puisque ce sont principalement des extraits naturels d'épices ou d'herbes [153].

Cependant, il y a quelques inconvénients comme notamment la manipulation difficile des agents actifs hautement volatils. Durant le procédé de fabrication, l'évaporation des agents volatils peut conduire à une atmosphère non-respirable dans l'unité de production. De plus, certains extraits de plantes peuvent diffuser des odeurs intenses en déséquilibrant l'arôme naturel de l'aliment [166], limitant ainsi leur utilisation à une très petite variété d'applications.

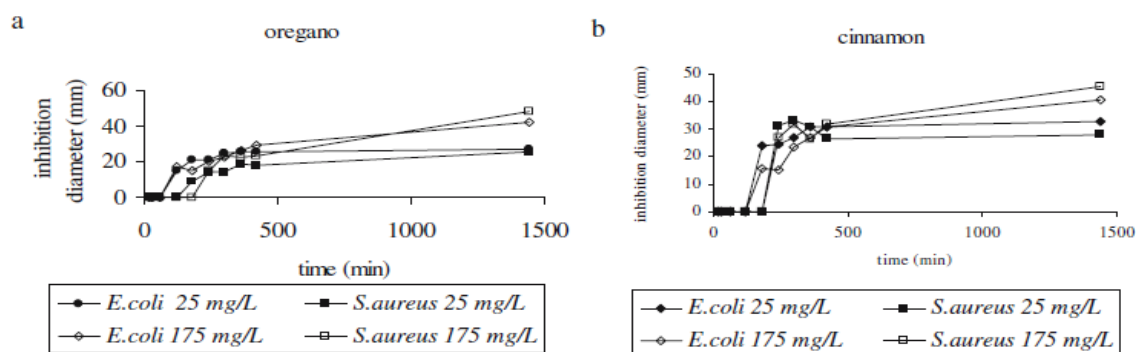


Figure 19 : Diamètres d'inhibition obtenus en milieu de culture gélosé ensemencé par des bactéries *E.coli* ou *S.aureus* en fonction du temps d'exposition aux huiles essentielles d'origan (a) et de cannelle (b) en phase vapeur[163]

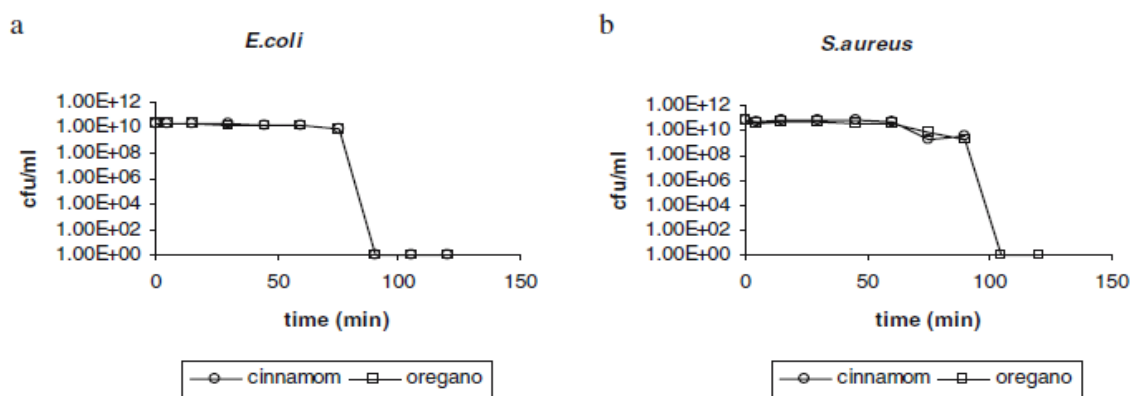


Figure 20 : Nombre de bactéries viables en milieu de culture gélosé ensemencé par *E.coli*(a) ou *S.aureus*(b) en fonction du temps de contact direct avec un emballage contenant des huiles essentielles d'origan et de cannelle[163]

Le présent manuscrit insistera d'avantage sur la présentation des agents antimicrobiens non-volatils car d'une part une partie des agents antimicrobiens volatils risquerait d'être perdue lors de l'élaboration des films par extrusion-gonflage qui est la voie d'élaboration des films à base de caséines développée à l'IMP et envisagée dans le cadre de cette thèse et que d'autre part le laboratoire BioDyMIA a développé jusqu'à présent une expertise sur l'élaboration de matériaux antimicrobiens intégrant des actifs non-volatils tels que la nisine.

Les sorbates, les benzoates, diverses enzymes et les bactériocines peuvent être comptés parmi les agents antimicrobiens non-volatils. Le tableau 8 présente des exemples d'agents antimicrobiens non-volatils fréquemment utilisés pour fonctionnaliser des films comestibles.

**Tableau 8 : Exemples d'agents antimicrobiens non-volatils de qualité alimentaire
(adapté d'après Han [70])**

| <i>Agents antimicrobiens non-volatils d'origine chimique</i> | |
|---|---|
| Sels | Chlorure de sodium |
| Acides organiques | Acide formique, acide acétique, acide propionique, acide sorbique et leurs sels |
| <i>Agents antimicrobiens non-volatils d'origine naturelle</i> | |
| Extraits à partir de l'œuf | Lysozyme, ovotransferrine, ovoglobuline |
| D'origine laitière | Lactoferrine, lactoglobulines, lactoperoxydase, lactolipides |
| Bactériocines | nisine |

Pour ces composés non volatils, un contact direct entre l'emballage et l'aliment est nécessaire. Pour cela, ils doivent initialement être positionnés soit dans les films d'emballage, soit entre l'emballage et la surface de l'aliment. S'ils sont appliqués sous forme de revêtement sur l'aliment, le transfert de masse des agents non-volatils destinés à migrer vers l'aliment est dépendant de la diffusivité et de la solubilité de l'agent dans l'aliment. S'ils sont intégrés dans les films comestibles, dans ce cas, le transfert de masse est dépendant de la diffusivité à travers ces films, de la solubilité sur la surface de l'aliment et de la diffusivité dans l'aliment (notamment de la surface vers le cœur). Afin d'assurer une concentration supérieure à la concentration minimale d'inhibition des micro-organismes cibles de l'agent à la surface de l'aliment, il est important de maintenir une cinétique de transfert appropriée à la cinétique de croissance microbienne. Par conséquent, dans un but de compréhension et d'optimisation, beaucoup d'auteurs ont étudié la cinétique de relargage des agents antimicrobiens non-volatils [36, 92, 167-171]. Les tests de relargage ont majoritairement été effectués dans l'eau. Moditsi *et al.*[171] ont étudié la migration vers l'eau du sorbate de potassium et celle de la natamycine incorporé dans des films comestibles à base de protéines de lactosérum. Ils ont mis en évidence que le pH de fabrication des films et l'ajout de chlorure de sodium dans la solution filmogène influencent inversement le coefficient de diffusion de chaque agent antimicrobien. Bierhalz *et al.*[168] ont observé que les films à base d'alginate étaient plus adaptés que les films à base de pectine pour l'élaboration de films comestibles antimicrobiens avec de la natamycine. Ouattara *et al.*[172] ont observé que le relargage dans l'eau d'acide acétique à

partir de films à base de chitosane était plus rapide que celui de l'acide propionique. Ces travaux donnent un bon aperçu sur le fonctionnement des films comestibles antimicrobiens contenant des agents non-volatils. En revanche, il s'avère que l'efficacité de certains agents, notamment des bactériocines comme la nisine [173], dans des milieux aqueux ou dans l'agar peut être très différente de celle dans les aliments. Cela est notamment dû à la complexité des matrices alimentaires[174]. Les phénomènes d'adsorption de la nisine sur les composants de l'aliment ont fait l'objet de plusieurs travaux [175, 176].

Le lysozyme a été l'un des agents antimicrobiens de nature protéique les plus utilisés pour la fabrication de films comestibles antimicrobiens. Son activité antimicrobienne a été démontrée contre les bactéries Gram-positives comme *Listeria monocytogenes* dans des films comestibles à base de protéines de petit pois ou d'amidon [170]. Il a également été combiné avec d'autres agents comme la nisine, l'acide laurique, l'albumine ou l'EDTA dans des films à base de zéine pour pouvoir cibler une plus grande variété de micro-organismes pathogènes présents dans les aliments [93, 177].

Finalement, les films comestibles antimicrobiens dans lesquels les agents antimicrobiens sont immobilisés peuvent aussi être obtenus grâce aux interactions ioniques et covalentes entre l'agent et le polymère filmogène. L'application de cette dernière méthode nécessite l'utilisation de polymères filmogènes et d'agents antimicrobiens ayant des groupes fonctionnels. Des exemples d'agents antimicrobiens portant des groupes fonctionnels sont des peptides, des enzymes, des acides organiques. Dans ce type d'emballages comestibles antimicrobiens, les agents ne migrent pas dans l'emballage puisqu'ils sont liés de façon covalente à la structure du polymère filmogène[178]. En conséquence ils doivent être en contact direct avec l'aliment. L'immobilisation des agents antimicrobiens est plus utilisée pour la fabrication de revêtements comestibles antimicrobiens [179-181] que pour la fonctionnalisation des films comestibles indépendants. Cette méthode a été plus fréquemment appliquée dans des films alimentaires non-comestibles [182-184]. Par exemple, Appendini *et al.*[184]ont immobilisé du lysozyme dans des films à base de PVOH, de nylon et de triacétate de cellulose.

Concernant, les agents antimicrobiens immobilisés, des micro-organismes bio-protecteurs (comme par exemple des bactéries lactiques bactériocinogènes) peuvent aussi être employés. Ces agents sont immobilisés dans des revêtements comestibles pour une sécrétion et donc une libération en continue de bactériocines vers l'aliment [185, 186].Par exemple *Lactococcus lactis subs plactis* immobilisé dans une matrice à base d'alginate et de protéine de lactosérum

a été efficace pour inhiber les souches de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Kocuria varians*, et *Pediococcus acidilactici*. Il a été observé que les bactéries lactiques immobilisées pouvaient assurer une production suffisante de nisine pour inhiber la croissance microbienne dès 4h d'incubation à 35°C[185].

Les avantages et les inconvénients de l'utilisation des agents antimicrobiens non-volatils sont nombreux. L'intégration de ces agents antimicrobiens ne complexifie pas forcément l'itinéraire technologique d'élaboration de ces emballages si leur insertion dans le système peut se réaliser directement dans la formulation des mélanges maîtres. Un autre avantage de l'incorporation de ces agents antimicrobiens dans la masse de l'emballage plutôt que leur pulvérisation à la surface des aliments peut résider dans le relargage contrôlé de ces agents antimicrobiens de la matrice polymérique de l'emballage vers la surface des matrices alimentaires en contact direct : un relargage contrôlé permet de maintenir plus durablement une concentration efficace de ces agents antimicrobiens à la surface des aliments qui est la zone la plus sensible pour les contaminations microbiennes post-process d'élaboration de l'aliment. L'inconvénient majeur par rapport aux emballages ou enrobages intégrant des agents antimicrobiens volatils ,réside précisément dans la nécessité d'un contact direct avec la surface des aliments qui doivent donc avoir une surface relativement continue et une forme régulière sans trop d'aspérités[153]. Cette condition est cependant remplie par de nombreux aliments périssables (morceaux de viande, filets de poisson, intercalaire à insérer entre les produits tranchés etc...). Pour les produits de formes plus irrégulières, comme les crevettes cuites entières ou certains fruits, leur enrobage par des solutions filmogènes intégrant l'agent antimicrobien reste cependant une alternative envisageable.

Dans le cas où l'agent antimicrobien est fixé sur le polymère, l'agent actif ne diffuse pas vers l'aliment et ne se dissout pas dans l'aliment. Cela permet de minimiser la quantité de l'agent à insérer dans l'emballage mais ne permet une efficacité antimicrobienne qu'à l'interface emballage-aliment. Cela permet de disposer de matériaux d'emballages qui ne soient pas vecteurs des micro-organismes altérants ou pathogènes sensibles aux agents antimicrobiens incorporés. D'un point de vue réglementaire, si l'emballage n'est pas consommé, les agents antimicrobiens incorporés ne doivent pas forcément être des additifs ou ingrédients alimentaires. Aujourd'hui, les matériaux plastiques incorporant de l'argent comme agent antimicrobien à l'intérieur de certains réfrigérateurs correspondent à ce cas de figure cependant bien différent du contexte des emballages ou enrobages comestibles qui nous

intéresse dans le cadre de ce travail de thèse. D'un point de vue marketing, ces matériaux actifs non relargueurs de composés antimicrobiens peuvent présenter l'avantage de préserver la possibilité d'apposer la mention « sans conservateur » sur les produits conditionnés[153].

I.3.2. Modes d'adjonction de ces agents antimicrobiens

La plupart du temps, durant la conservation des aliments solides et semi-solides emballés, la contamination microbienne se produit à la surface des aliments. Selon la méthode d'incorporation et la nature de l'agent actif, l'activité antimicrobienne peut exister dans le film d'emballage ou dans l'atmosphère à l'intérieur de l'emballage (espace de tête « head space »). Dans tous les cas, l'agent actif doit être transféré vers la surface de l'aliment afin d'y inhiber la croissance microbienne. Par conséquent, le développement des méthodes d'incorporation d'agents actifs adaptées puis l'étude du transfert de ces agents des emballages dans lesquels ils sont incorporés vers les aliments conditionnés sont des étapes indispensables pour obtenir des systèmes antimicrobiens efficaces. Majoritairement, deux modes d'adjonction d'agents actifs peuvent être cités :

- L'incorporation directe dans la formulation avant l'élaboration par voie solvant ou par voie fondue des films comestibles.
- Les voies de fonctionnalisation antimicrobienne postérieures à l'élaboration des films comestibles. (comme par exemple l'application de revêtements antimicrobiens, la fixation ou l'adsorption de l'agent actif).

Si des agents antimicrobiens sont directement incorporés durant le procédé de fabrication, certains paramètres comme la température ou le pH doivent être optimisés en fonction de l'agent antimicrobien. Les films comestibles antimicrobiens sont très souvent fabriqués par voie humide. Dans ce cas, les agents antimicrobiens sont dissous dans la solution filmogène avant le casting. Il est préférable que les agents antimicrobiens possèdent une bonne solubilité afin d'obtenir une dispersion homogène. Aussi, il convient de maîtriser les interactions qui peuvent s'établir entre l'agent antimicrobien et les polymères filmogènes afin d'éviter une éventuelle perte d'activité antimicrobienne[70]. Cela a encore été constaté très récemment par Bayarri *et al.*[187]. Ils ont observé une corrélation inverse entre la formation des agrégats dans des solutions filmogènes à base de pectine faiblement méthoxylée et l'activité enzymatique du lysozyme (figure 20). En effet, la concentration en polymère filmogène impacte la formation de complexes pectine/lysozyme de tailles variées. Ainsi la taille des

complexes influence inversement la turbidité des solutions filmogènes et l'activité enzymatique du lysozyme probablement en gênant l'accès du lysozyme à ses substrats.

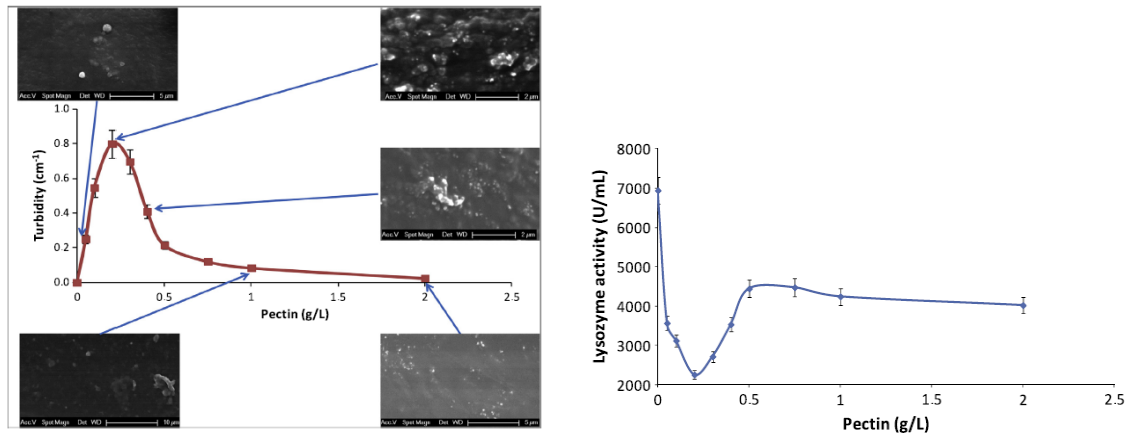


Figure 21 : Influence de la concentration en pectine faiblement méthoxylée (LM) dans la solution filmogène contenant du lysozyme sur la turbidité (à gauche) et sur l'activité enzymatique du lysozyme (à droite) [187]

Pour l'efficacité des systèmes comestibles antimicrobiens préparés par voie humide : le pH et l'utilisation de co-solvants peuvent être des facteurs critiques. Martinez *et al.*[188] ont étudié l'influence du pH et de l'hydrophobicité sur l'efficacité de films comestibles à base de protéines de lactosérum incorporant de la nisine et/ou de la glucoseoxydase. Il a été observé que les films préparés à pH = 5,5 étaient plus performants que ceux préparés à pH= 8,5 en termes d'activité antimicrobienne. Cela a été attribué à l'hydrophobicité renforcée du polymère qui avait une influence positive sur l'activité antimicrobienne des films.

Dans le cas de la voie sèche, les agents antimicrobiens ont subi des traitements à hautes températures et pressions. Les conditions de procédés doivent être optimisées afin de minimiser la dégradation/dénaturation de certains agents antimicrobiens en particulier ceux qui sont sensibles à la température et au cisaillement associés aux traitements thermomécaniques employés en plasturgie comme l'extrusion. Généralement, les agro-polymères ont des températures de transformation plus basses que les plastiques conventionnels. Malgré cela, au vu de la thermosensibilité de certains agents antimicrobiens, cela reste des procédés à hautes températures. Nam *et al.*[45] ont incorporé du lysozyme avec de l'amidon de petits pois et des proportions variables d'eau directement dans une extrudeuse bi-vis. Ils ont noté une dépendance importante de l'activité enzymatique résiduelle du

lysozyme en fonction de la température d'extrusion (figure 21). D'autres auteurs ont fabriqué des films par compression. Ture *et al.*[189] ont incorporé le sorbate de potassium dans des films comestibles à base de gluten de blé afin de fabriquer les films comestibles antimicrobiens. Martinez *et al.*[40] ont utilisé l'acide formique et l'huile essentielle d'origan comme agents antimicrobiens dans une matrice de gluten de blé. Contrairement à Nam *et al.*, ils n'ont pas cherché à quantifier une perte potentielle de l'efficacité de ces agents après les procédés de transformation. Les films fonctionnalisés ont tous montré des activités antimicrobiennes dans des milieux gélosés ensemencés. Il faut aussi souligner que la sensibilité des agents antimicrobiens aux cisaillements ou aux traitements thermiques est différente selon leur nature. Le lysozyme étant une enzyme, donc une protéine globulaire avec une stabilité de sa conformation limitée, il ne sera par exemple pas influencé de la même manière que le sorbate de potassium par un traitement thermique.

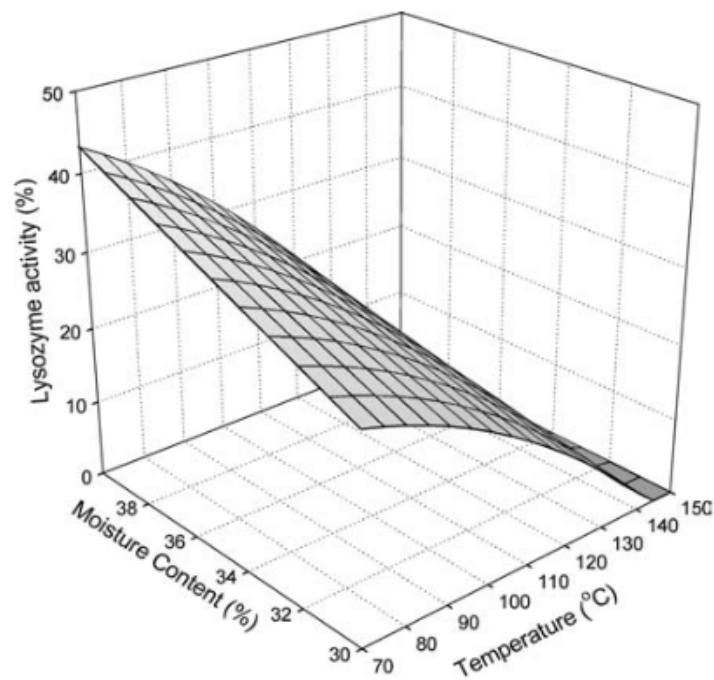


Figure 22 : Activité enzymatique résiduelle du lysozyme dans les films comestibles à base de protéine de petits pois en fonction de la température de l'extrusion bi-vis et de la quantité d'eau introduite comme plastifiant dans les mélanges avant extrusion[45].

La fonctionnalisation des films par des agents antimicrobiens peut se réaliser postérieurement à l'élaboration de films comestibles : cela devient même indispensable quand

les agents en question sont perdus (par évaporation pour certains agents antimicrobiens très volatils) ou inactivés (cas de certaines protéines et certains peptides antimicrobiens) lors des procédés d'élaboration des films par voie fondue. Parmi les techniques variées, l'application des revêtements antimicrobiens, la fixation ou l'adsorption de l'agent actif sur les films préfabriqués peuvent être citées. Pour ce mode de fonctionnalisation, les films comestibles préparés peuvent tout simplement être trempés dans une solution aqueuse d'agent actif pour une fixation physique. Les facteurs comme la durée du bain ou l'affinité (les interactions ioniques, les liaisons par pont hydrogène, les interactions hydrophobes etc.) entre l'agent antimicrobien et le polymère filmogène auront une influence sur la quantité d'agent antimicrobien liés et donc l'efficacité antimicrobienne des films finaux [179]. Ce mode de fonctionnalisation va facilement libérer les agents actifs si les interactions sont faibles entre l'agent et la surface des films et inversement si les interactions sont fortes. L'utilisation d'agents intermédiaires, notamment des enzymes catalysant la formation de liaisons covalentes peut même être envisagée pour fixer des agents antimicrobiens à la surface des films comestibles mais alors ceux-ci ne seront pas relargués vers la surface des aliments en contact. Le choix de la méthode d'immobilisation des agents actifs à la surface des films est primordial : en effet, l'immobilisation de certains agents actifs peut leur faire perdre leur activité antimicrobienne (par exemple si une liaison covalente est établie avec un résidu d'acide aminé d'une enzyme antimicrobienne nécessaire à son action antimicrobienne ou tout simplement s'il y a un encombrement stérique de l'enzyme immobilisée qui empêche l'accès à ses substrats...) A noter qu'en cas d'une fixation importante, l'agent peut perdre son activité due à une inactivation biologique ce qui est le cas notamment pour les enzymes.

Lian *et al.*[179] ont illustré les différentes méthodes qui existent pour l'immobilisation des enzymes (Figure 22).

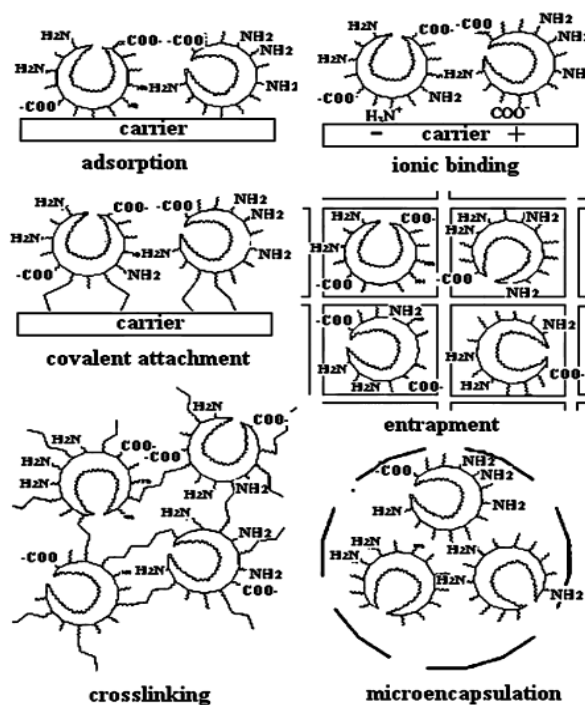


Figure 23 : Présentation schématique de différentes méthodes d'immobilisation des enzymes[179].

I.3.3. Effets de l'adjonction de composés antimicrobiens sur les propriétés générales (mécaniques, barrière, organoleptiques) d'emballages comestibles

L'addition d'agents actifs peut générer une hétérogénéité dans la structure des films comestibles. Les propriétés mécaniques (l'élongation, la résistance à la rupture, le module d'élasticité), les propriétés physiques (la perméabilité à la vapeur d'eau, la perméabilité aux gaz/aux arômes, les isothermes de sorption, la résistance à la graisse), les propriétés optiques (la transparence, la couleur, la brillance), les propriétés organoleptiques (le toucher, l'odeur et le goût) définissent la performance des films comestibles d'emballages. L'insertion d'agents antimicrobiens ne doit pas influencer ces propriétés de manière négative [70].

Il est suggéré que la similarité des structures entre l'agent antimicrobien à incorporer et le polymère filmogène est un facteur important pour les propriétés traditionnelles des films comestibles antimicrobiens. D'après Han[70], les agents antimicrobiens hydrosolubles ne changeront pas dramatiquement les propriétés physiques des films à base de protéines hydrosolubles alors que leur influence sur les propriétés des films à base de

protéines non-hydrosolubles peuvent être significatives. Cela peut également expliquer la diminution des propriétés en traction (la résistance et le module de Young) en cas d'utilisation des huiles essentielles comme agent actif dans des matrices à base d'hydrocolloïdes[157, 190-192]. Sanchez-Gonzalez *et al.*[190] ont observé que l'ajout d'huiles essentielles dans les films à base d'HPMC ou de chitosane fait diminuer la résistance à la rupture et aussi la capacité d'élongation des films. Cela est probablement dû à une mauvaise compatibilité entre les agents lipophiles et les polymères filmogènes hydrophiles. Les auteurs ont notamment remarqué que la taille des gouttelettes formées dans les émulsions filmogènes varie en fonction de la teneur en huile essentielle, ce qui se traduit par un changement de la cohésion structurelle aux teneurs les plus élevées. Ghasemlou *et al.*[157] ont aussi observé que la concentration des huiles essentielles est déterminante sur la significativité des changements de propriétés mécaniques des films à base d'amidon de maïs. D'autre part, Atarés *et al.*[191, 192] ont démontré par des travaux successifs que cette altération des propriétés mécaniques dépend des polymères filmogènes. Par exemple, pour la même teneur en extrait de cannelle, les films à base de caséinate de sodium [191] perdent significativement les propriétés en traction alors que pour les films à base de protéines de soja[192], la diminution n'est pas significative. Cela s'explique par le fait que les films à base caséinate de sodium sont initialement plus rigides que ceux à base protéines de soja.

Le caractère hydrophobe des agents peut aussi faire varier les propriétés barrières des films comestibles. Par exemple, les huiles essentielles[157] ou les extraits éthanoliques des résines [193] ajoutés dans les films à base d'hydrocolloïdes ont une tendance à diminuer la perméabilité à la vapeur d'eau et à augmenter la perméabilité à l'O₂ du fait de leur nature hydrophobe. L'importance des variations peut dépendre encore une fois de la concentration des huiles essentielles incorporées. Par exemple, la perméabilité à la vapeur d'eau des films à base d'HPMC diminue avec une augmentation en fraction massique de l'extrait éthanolique de propolis dans des solutions filmogènes (figure 23)[193].

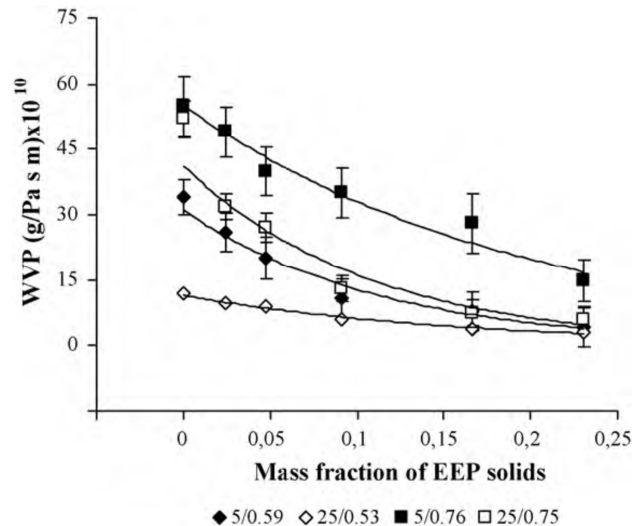


Figure 24 : Perméabilité à la vapeur d'eau de films à base de HPMC en fonction de la fraction massique de l'extrait éthanolique de propolis dans la solution filmogène. Les courbes représentant les conditions de mesure, dans l'ordre décroissant vertical : 5°C/59% HR ; 25°C/53% HR ; 5°C/76% HR ; 25°C/ 75% HR

De même Resa *et al.*[194] ont rapporté que la nisine et la natamycine ont diminué l'hydrophilie des films à base d'amidon de tapioca. Cela est probablement dû au caractère plus hydrophobe de la nisine et de la natamycine comparativement à l'amidon.

Si l'ajout des agents antimicrobiens modifie considérablement la structure du réseau protéique, par exemple le volume libre ou la cristallinité, les propriétés physiques des films sont influencées. Bourbon *et al.*[195] ont démontré que les agents antimicrobiens de nature peptidique ayant des masses molaires différentes influencent différemment les propriétés mécaniques et barrières des films à base de chitosane. L'agent avec la plus grande masse moléculaire a joué le rôle d'un plastifiant et augmenté le volume libre dans la structure filmogène. Atarès *et al.*[14] ont rapporté que certains acides organiques se comportent comme des agents réticulants pour l'HPMC et diminuent la perméabilité à l'O₂ des films.

Finalement, les agents antimicrobiens peuvent aussi affecter la transparence, la couleur, la brillance des films comestibles. L'intensité des changements de ces propriétés est aussi influencée par le caractère chimique des agents et leur concentration comme expliqué précédemment pour les propriétés mécaniques et barrières. La transparence des films contenant des huiles essentielles est par exemple dépendante de la taille des gouttelettes d'huiles essentielles et leur distribution dans l'émulsion filmogène[190]. De plus, la rugosité ou le caractère hydrophobe dû à l'ajout d'agents antimicrobiens peuvent diminuer la brillance initiale des films [193, 194].

I.3.4. Intérêts et limites à l'efficacité antimicrobienne des films comestibles antimicrobiens

Afin de conclure, voici un bilan sur l'efficacité antimicrobienne des films comestibles :

- ❖ Les films comestibles antimicrobiens peuvent permettre une libération contrôlée d'agents actifs. Ces films prolongent alors la durée de conservation des aliments et réduisent la quantité d'agents actifs à insérer dans l'emballage en comparaison à une application directe de l'agent sur l'aliment.
- ❖ Les films permettant une activité grâce à la phase en vapeur d'un agent volatil ou grâce à la fixation d'un agent volatil assurent une protection même sans contact direct avec l'aliment.
- ❖ Dans certains cas, l'ajout d'agents actifs peut influencer de manière négative les propriétés organoleptiques, mécaniques ou physico-chimiques des films comestibles.
- ❖ Lorsque les procédés de fabrication consistent en des traitements thermiques ou thermomécaniques, les agents thermosensibles tels que les agents volatils ou les agents peptidiques, peuvent perdre leur activité antimicrobienne.

I.4. Références bibliographiques

1. Jung H. Han, A.G., *Edible films and coatings: a review*, in *Innovations in Food Packaging*. 2005, Elsevier Academic Press. p. 239-259.
2. Gontard, S.G.N., *Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics*, in *Innovations in Food Packaging*. 2005, Elsevier Academic Press. p. 263-275.
3. Krochta, J.M. and C. De Mulder-Johnston, *Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities*. *Food Technology*, 1997. **51**(2): p. 61-74.
4. *Règlement (CE) N° 1935/2004 DU PARLEMENT EUROPEEN ET DU CONSEIL du 27 octobre 2004 concernant les matériaux et objets à entrer en contact avec des denrées alimentaires et abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE*. 2004, Journal officiel de l'Union européenne.
5. *REGLEMENT (UE) N° 10/2011 DE LA COMMISSION du 14 janvier 2011 concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires*. 2011, Journal officiel de l'Union européenne.
6. Miller, K.S. and J.M. Krochta, *Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review*. *Trends in Food Science & Technology*, 1997. **8**(7): p. 228-237.
7. Bourtoom, T., *Edible films and coatings: characteristics and properties*. *International Food Research Journal*, 2008. **15**(3): p. 237-248.
8. Petersen, K., et al., *Potential of biobased materials for food packaging*. *Trends in Food Science & Technology*, 1999. **10**(2): p. 52-68.
9. Tharanathan, R.N., *Biodegradable films and composite coatings: past, present and future*. *Trends in Food Science & Technology*, 2003. **14**(3): p. 71-78.
10. Jarroux, N., *Les biopolymères : différentes familles, propriétés et applications*, in *Techniques de l'ingénieur*. 10/10/2008.
11. Turhan, K.N. and F. Sahbaz, *Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films*. *Journal of Food Engineering*, 2004. **61**(3): p. 459-466.
12. Vargas, M., et al., *Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008. **48**(6): p. 496-511.
13. Balasubramaniam, V.M., et al., *The effect of edible film on oil uptake and moisture retention of a deep-fat fried poultry product*. *Journal of Food Process Engineering*, 1997. **20**(1): p. 17-29.
14. Atares, L., R. Perez-Masia, and A. Chiralt, *The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almonds*. *Journal of Food Engineering*, 2011. **104**(4): p. 649-656.
15. Chen, G., et al., *Development and characterization of food packaging film from cellulose sulfate*. *Food Hydrocolloids*, 2014. **35**: p. 476-483.
16. Cha, D.S. and M.S. Chinnan, *Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004. **44**(4): p. 223-237.
17. Jbilou, F., *Elaboration de matériaux à base de farine de maïs : évaluation et compréhension des relations entre structure et cinétique de biodégradation*, in *Génie Biologique*. 2011, Université Claude Bernard Lyon 1.

18. Jimenez, A., et al., *Edible and Biodegradable Starch Films: A Review*. Food and Bioprocess Technology, 2012. **5**(6): p. 2058-2076.
19. Elsabee, M.Z. and E.S. Abdou, *Chitosan based edible films and coatings: A review*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2013. **33**(4): p. 1819-1841.
20. Devlieghere, F., A. Vermeulen, and J. Debevere, *Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables*. Food Microbiology, 2004. **21**(6): p. 703-714.
21. Peng, Y.F., et al., *Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan*. Carbohydrate Research, 2005. **340**(11): p. 1846-1851.
22. Yang, T.C., C.C. Chou, and C.F. Li, *Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives*. International Journal of Food Microbiology, 2005. **97**(3): p. 237-245.
23. Aider, M., *Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review*. Lwt-Food Science and Technology, 2010. **43**(6): p. 837-842.
24. Leceta, I., et al., *Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films*. Journal of Food Engineering, 2013. **116**(4): p. 889-899.
25. No, H.K., et al., *Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **74**(1-2): p. 65-72.
26. Zheng, L.Y. and J.A.F. Zhu, *Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights*. Carbohydrate Polymers, 2003. **54**(4): p. 527-530.
27. Dutta, P.K., et al., *Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications*. Food Chemistry, 2009. **114**(4): p. 1173-1182.
28. Chien, P.J., F. Sheu, and F.H. Yang, *Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit*. Journal of Food Engineering, 2007. **78**(1): p. 225-229.
29. Moreira, M.D., et al., *Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami*. Journal of Food Science, 2011. **76**(1): p. M54-M63.
30. Krochta, J.M., *Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities*, in *Protein-based films and coatings*. 2002. p. 1-41.
31. Rouilly, A. and L. Rigal, *Agro-materials: A bibliographic review*. Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews, 2002. **C42**(4): p. 441-479.
32. Olivas, G.I. and G.V. Barbosa-Canovas, *Edible coatings for fresh-cut fruits*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. **45**(7-8): p. 657-670.
33. Perez-Gago, M.B. and J.M. Krochta, *Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(2): p. 996-1002.
34. Debeaufort, F., et al., *Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films*. Journal of Membrane Science, 2000. **180**(1): p. 47-55.
35. Wu, Y., et al., *Moisture loss and lipid oxidation for precooked ground-beef patties packaged in edible starch-alginate-based composite films*. Journal of Food Science, 2001. **66**(3): p. 486-493.
36. Arcan, I. and A. Yemenicioglu, *Development of flexible zein-wax composite and zein-fatty acid blend films for controlled release of lysozyme*. Food Research International, 2013. **51**(1): p. 208-216.

37. Gontard, N. and S. Guilbert, *Bioemballage: technologies et propriétés de matériaux comestibles et/ou biodégradable d'origine agricole.*, in *Emballage et Conservation des Produits Alimentaires*, M. Mathlouti, Editor. 1996, Polytechnica: Paris. p. 181-208.
38. VM Hernandez-Izquierdo, J.K., *Thermoplastic processing of proteins for film formation-A review*. Journal of Food Science, 2008.
39. Rungsinee sothornvit, J.M.K., *Plasticizers in edible films and coatings*, in *Innovations in food packaging*, J.H. Han, Editor. 2005. p. 403-428.
40. Martinez, I., et al., *Development of protein-based bioplastics with antimicrobial activity by thermo-mechanical processing*. Journal of Food Engineering, 2013. **117**(2): p. 247-254.
41. Jerez, A., et al., *Rheology and processing of gluten based bioplastics*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **26**(2-3): p. 131-138.
42. Jerez, A., et al., *Egg white-based bioplastics developed by thermomechanical processing*. Journal of Food Engineering, 2007. **82**(4): p. 608-617.
43. Jerez, A., et al., *Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing*. Rheologica Acta, 2007. **46**(5): p. 711-720.
44. Pommet, M., et al., *Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials*. Journal of Cereal Science, 2005. **42**(1): p. 81-91.
45. Nam, S., et al., *Extrusion of pea starch containing lysozyme and determination of antimicrobial activity*. Journal of Food Science, 2007. **72**(9): p. E477-E484.
46. Hanani, Z.A.N., et al., *Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion*. Journal of Food Engineering, 2012. **113**(4): p. 606-614.
47. Guerrero, P., et al., *Extrusion of soy protein with gelatin and sugars at low moisture content*. Journal of Food Engineering, 2012. **110**(1): p. 53-59.
48. Zhang, J., P. Mungara, and J. Jane, *Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets*. Polymer, 2001. **42**(6): p. 2569-2578.
49. Hernandez-Izquierdo, V.M. and J.M. Krochta, *Thermal Transitions and Heat-sealing of Glycerol-plasticized Whey Protein Films*. Packaging Technology and Science, 2009. **22**(5): p. 255-260.
50. Belyamani, I., F. Prochazka, and G. Assezat, *Production and characterization of sodium caseinate edible films made by blown-film extrusion*. Journal of Food Engineering, 2014. **121**: p. 39-47.
51. Banker, G.S., *FILM COATING THEORY AND PRACTICE*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1966. **55**(1): p. 81-&.
52. Arvanitoyannis, I. and C.G. Biliaderis, *Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends*. Food Chemistry, 1998. **62**(3): p. 333-342.
53. Arvanitoyannis, I., E. Psomiadou, and A. Nakayama, *Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol .1*. Carbohydrate Polymers, 1996. **31**(4): p. 179-192.
54. Arvanitoyannis, I.S., A. Nakayama, and S. Aiba, *Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties*. Carbohydrate Polymers, 1998. **37**(4): p. 371-382.

55. Arvanitoyannis, I. and C.G. Biliaderis, *Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch*. Carbohydrate Polymers, 1999. **38**(1): p. 47-58.
56. Psomiadou, E., I. Arvanitoyannis, and N. Yamamoto, *Edible films made from natural resources; Microcrystalline cellulose (MCC), methylcellulose (MC) and corn starch and polyols .2*. Carbohydrate Polymers, 1996. **31**(4): p. 193-204.
57. Sothornvit, R. and J.M. Krochta, *Plasticizer effect on mechanical properties of beta-lactoglobulin films*. Journal of Food Engineering, 2001. **50**(3): p. 149-155.
58. Debeaufort, F. and A. Voilley, *Methylcellulose-based edible films and coatings .1. Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer content*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(3): p. 685-689.
59. Fabra, M.J., P. Talens, and A. Chiralt, *Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions*. Food Hydrocolloids, 2010. **24**(4): p. 384-391.
60. Galletta, G., et al., *Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents*. Journal of Dairy Science, 1998. **81**(12): p. 3123-3130.
61. Gontard, N., S. Guilbert, and J.L. Cuq, *EDIBLE WHEAT GLUTEN FILMS - INFLUENCE OF THE MAIN PROCESS VARIABLES ON FILM PROPERTIES USING RESPONSE-SURFACE METHODOLOGY*. Journal of Food Science, 1992. **57**(1): p. 190-&.
62. B. Jasse , A.M.S., M. Mathlouthi, *Pérméabilité et structure dans les matériaux d'emballage polymères*, in *Emballage et conservation des produits alimentaires*, M. Mathlouthi, Editor. 1996, Polytechnica. p. 1-24.
63. SABARD, M., *Etude de films PA6 et nanocomposites: Effet des conditions de procédés et des nanocharges sur la morphologie et les propriétés de sorption à l'eau et à l'éthanol*, in *Ingénierie des matériaux polymères*. 2011, Université Claude Bernard Lyon 1: Lyon, France.
64. Dole, P., et al., *Gas transport properties of starch based films*. Carbohydrate Polymers, 2004. **58**(3): p. 335-343.
65. Gaudin, S., et al., *Antiplasticisation and oxygen permeability of starch-sorbitol films*. Carbohydrate Polymers, 2000. **43**(1): p. 33-37.
66. Kristo, E. and C.G. Biliaderis, *Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate-pullulan bilayers and blends*. Food Hydrocolloids, 2006. **20**(7): p. 1057-1071.
67. Khwaldia, K., et al., *Milk proteins for edible films and coatings*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004. **44**(4): p. 239-251.
68. Debeaufort, F., J.A. Quezada-Gallo, and A. Voilley, *Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1998. **38**(4): p. 299-313.
69. Frederic Debeaufort, J.-A.Q.-G., and Andree Voilley, *Edible films and coatings as aroma barriers*, in *Protein-Based Films and Coatings*, A. Gennadios, Editor. 2002, CRC Press
70. Han, J.H., *Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents*, in *Protein-Based Films and Coatings*, A. Gennadios, Editor. 2002, CRC Press.
71. Baldwin, E.A., M.O. Nisperoscarriedo, and R.A. Baker, *USE OF EDIBLE COATINGS TO PRESERVE QUALITY OF LIGHTLY (AND SLIGHTLY) PROCESSED PRODUCTS*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1995. **35**(6): p. 509-524.

72. Peyron, A., *L'enrobage et les produits filmogènes : un nouveau mode d'emballage*. Viandes et produits carnés, 1991. **12**(2): p. 41-46.
73. Devlieghere, F., L. Vermeiren, and J. Debevere, *New preservation technologies: Possibilities and limitations*. International Dairy Journal, 2004. **14**(4): p. 273-285.
74. de Graaf, L.A. and P. Kolster, *Industrial proteins as a green alternative for 'petro' polymers: Potentials and limitations*. Macromolecular Symposia, 1998. **127**: p. 51-58.
75. Palmieri, A., *Overwiev of pharmaceutical coatings*, in *Edible coatings and films to improve food quality*, R.H. Elizabeth A Baldwin, Jihne Bai, Editor. 2012, CRC Press. p. 373-380.
76. Vaz, C.M., et al., *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 Materials Science-Materials in Medicine, 2003. **14**(9): p. 789-796.
77. Vaz, C.M., et al., *Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **65A**(1): p. 60-70.
78. Coviello, T., et al., *Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*. Journal of Controlled Release, 2007. **119**(1): p. 5-24.
79. Sandolo, C., et al., *Characterization of polysaccharide hydrogels for modified drug delivery*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 2007. **36**(7): p. 693-700.
80. Khwaldia, K., *WATER VAPOR BARRIER AND MECHANICAL PROPERTIES OF PAPER-SODIUM CASEINATE AND PAPER-SODIUM CASEINATE-PARAFFIN WAX FILMS*. Journal of Food Biochemistry, 2010. **34**(5): p. 998-1013.
81. Park, H.J., et al., *Grease resistance and mechanical properties of isolated soy protein-coated paper*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2000. **77**(3): p. 269-273.
82. Audic, J.L., B. Chaufer, and G. Daufin, *Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review*. Lait, 2003. **83**(6): p. 417-438.
83. BELYAMANI, I. and F. PROCHAZKA, *Développement d'un matériau thermoplastique, biodégradable et hydrosoluble à base d'une protéine du lait* in *Chimie et science des matériaux*. 2011, Université Jean Monnet: France.
84. Cooksey, M.L.K., *Edible films and coatings from animal-origin proteins*, in *Innovations in food Packaging*. 2005, Elsevier Academic Press. p. 301-312.
85. Hoque, M.S., S. Benjakul, and T. Prodpran, *Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(5): p. 1085-1097.
86. Jongjareonrak, A., et al., *Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper*. Food Hydrocolloids, 2006. **20**(4): p. 492-501.
87. Limpisophon, K., M. Tanaka, and K. Osako, *Characterisation of gelatin-fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin*. Food Chemistry, 2010. **122**(4): p. 1095-1101.
88. Tongnuanchan, P., S. Benjakul, and T. Prodpran, *Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants*. Food Hydrocolloids, 2014. **41**: p. 33-43.
89. Ma, Y.L., et al., *Preparation of zein-based membranes and their pervaporation for ethanol aqueous solution*. Desalination, 2012. **299**: p. 70-78.

90. DiGioia, L., *Obtention et etude de biomatériaux a base de protéines de maïs*, in *Science des aliment*. 1998, Ecole National Supérieur Agronomique de Montpellier: Montpellier.
91. Hsu, B.L., et al., *Structural investigation of edible zein films/coatings and directly determining their thickness by FT-Raman spectroscopy*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(13): p. 5089-5095.
92. Gucbilmez, C.M., A. Yemenicioglu, and A. Arslanoglu, *Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA*. *Food Research International*, 2007. **40**(1): p. 80-91.
93. Mecitoglu, C., et al., *Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging*. *Food Research International*, 2006. **39**(1): p. 12-21.
94. Unalan, I.U., F. Korel, and A. Yemenicioglu, *Active packaging of ground beef patties by edible zein films incorporated with partially purified lysozyme and Na(2)EDTA*. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011. **46**(6): p. 1289-1295.
95. Rakotonirainy, A.M., Q. Wang, and G.W. Padua, *Evaluation of zein films as modified atmosphere packaging for fresh broccoli*. *Journal of Food Science*, 2001. **66**(8): p. 1108-1111.
96. Arcan, I. and A. Yemenicioglu, *Controlled Release Properties of Zein-Fatty Acid Blend Films for Multiple Bioactive Compounds*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014. **62**(32): p. 8238-8246.
97. Pérez-Gago, M.B., *Protein-based films and coatings*, in *Edible Coatings and films to improve food quality*, E.A.B.R.H.J. Bai, Editor. 2012, CRC press. p. 13-79.
98. Gennadios, A., et al., *EFFECT OF PH ON PROPERTIES OF WHEAT GLUTEN AND SOY PROTEIN ISOLATE FILMS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993. **41**(11): p. 1835-1839.
99. Kayserilioglu, B.S., et al., *Mechanical and biochemical characterisation of wheat gluten films as a function of pH and co-solvent*. *Starch-Starke*, 2001. **53**(8): p. 381-386.
100. Guillaume, C., et al., *Gas transfer properties of wheat gluten coated paper adapted to eMAP of fresh parsley*. *Journal of Food Engineering*, 2013. **119**(2): p. 362-369.
101. Guillaume, C., et al., *Biobased packaging for improving preservation of fresh common mushrooms (*Agaricus bisporus* L.)*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010. **11**(4): p. 690-696.
102. Thibaut Cagnon, A.M., Pascale Chalier, Carole Guillaume, Nathalie Gontard, *Fresh food packaging design : A requirement driven approach applied to strawberries and agro-based materials*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013. **20**: p. 299-298.
103. Barron, C., et al., *Modified atmosphere packaging of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus* L.) with hydrophilic films*. *Journal of Food Science*, 2002. **67**(1): p. 251-255.
104. Dawson, P.L., et al., *Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method*. *Food Research International*, 2003. **36**(9-10): p. 959-968.
105. Albert, S. and G.S. Mittel, *Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product*. *Food Research International*, 2002. **35**(5): p. 445-458.
106. Sathivel, S., *Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss, and lipid oxidation of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage*. *Journal of Food Science*, 2005. **70**(8): p. E455-E459.
107. Wu, Y., et al., *Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coatings and films*. *Journal of Food Science*, 2000. **65**(2): p. 300-304.

108. Theivendran, S., N.S. Hettiarachchy, and M.G. Johnson, *Inhibition of Listeria monocytogenes by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters*. Journal of Food Science, 2006. **71**(2): p. M39-M44.
109. Ouattara, B., et al., *Combined effect of gamma irradiation, ascorbic acid, and edible coating on the improvement of microbial and biochemical characteristics of ground beef*. Journal of Food Protection, 2002. **65**(6): p. 981-987.
110. Gonzalez, A. and C.I.A. Igarzabal, *Soy protein - Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging*. Food Hydrocolloids, 2013. **33**(2): p. 289-296.
111. Sredzinski, J.-J.S.A.L.N., *Protéines laitières*. Technique de l'ingénieur, 2010.
112. Swaisgood, H.E., *Chemistry of milk protein*, in *Developments in Dairy Chemistry*. 1982: North Carolina.
113. Southward, C.R., *Uses of casein and caseinates*, in *Developements in dairy chemistry-4 Functional milk proteins*, P.F.Fox, Editor. 1986, Elsevier applied science. p. 173-244.
114. D Lorient, B.C., JL Courthaudon, *connaissance nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés Lait*, 1991. **71**: p. 141-171.
115. Krochta, T.H.M.J.M., *Milk protein based edible films and coatings*. Food Technologie, 1994: p. 97-103.
116. MORR, C.V., *Functional properties of milk proteins and their use as food ingredients.*, in *Developments in dairy chemistry*. 1982. p. 375-399.
117. Chen, H., *Functional properties and applications of edible films made of milk proteins*. Journal of Dairy Science, 1995. **78**(11): p. 2563-2583.
118. Pérez-Gago M.B. , J.M.K., *Formation and properties of whey protein films and coatings*, in *Protein-Based Films and Coatings*, A. Gennadios, Editor. 2002, CRC Press. p. 159-180.
119. Perez-Gago, M.B., P. Nadaud, and J.M. Krochta, *Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films*. Journal of Food Science, 1999. **64**(6): p. 1034-1037.
120. Cagri, A., et al., *Inhibition of Listeria monocytogenes on hot dogs using antimicrobial whey protein-based edible casings*. Journal of Food Science, 2003. **68**(1): p. 291-299.
121. Cagri, A., Z. Ustunol, and E.T. Ryser, *Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films*. Journal of Food Science, 2002. **67**(6): p. 2317-2324.
122. Perez-Gago, M.B., et al., *Effect of solid content and lipid content of whey protein isolate-beeswax edible coatings on color change of fresh-cut apples*. Journal of Food Science, 2003. **68**(7): p. 2186-2191.
123. Perez-Gago, M.B., M. Serra, and M.A. del Rio, *Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings*. Postharvest Biology and Technology, 2006. **39**(1): p. 84-92.
124. Chen, H., *Formation and properties of casein films and coatings*, in *Protein-Based Films and Coatings*, A. Gennadios, Editor. 2002, CRC Press. p. 181-211.
125. Cayot P, L.D., *Structure et technofonctions des protéines du lait*. 1998, Paris: Tec&Doc Lavoisier.
126. Farrell, H.M., et al., *Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?* Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2006. **11**(2-3): p. 135-147.

127. Kinsella, J.E., *Milk proteins: Physicochemical and functional properties*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1984. **21**(3): p. 197-262.
128. Mulvihill DM, P.F., *Physico-chemical and functional properties of milk proteins*, in *Developments in dairy chemistry*. 1989. p. 131-172.
129. Roberto J.Avena-Bustillos, L.A.C.-Z., John M.Krochta, Mikal E. Saltveit, *Application of casein-lipid edible film emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots* Postharvest Biology and Technology, 1994. **4**: p. 319-329.
130. Roberto de Jesús Avena-Bustillos , J.M.K., *Optimization of edible coating formulations on zucchini to reduce water loss*. Journal of Food Engineering, 1994. **21**(2): p. 197-214.
131. AvenaBustillos, R.D., J.M. Krochta, and M.E. Saltveit, *Water vapor resistance of red delicious apples and celery sticks coated with edible caseinate-acetylated monoglyceride films*. Journal of Food Science, 1997. **62**(2): p. 351-354.
132. Alam, M.D.S. and S. Paul, *Efficacy of casein coating on storage behaviour of kinnow*. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2001. **38**(3): p. 235-238.
133. Cao-Hoang, L., et al., *Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control Listeria in artificially contaminated cheese*. Food Microbiology, 2010. **27**(7): p. 940-944.
134. Cao-Hoang, L., et al., *Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin-incorporated sodium caseinate films*. Food Control, 2010. **21**(9): p. 1227-1233.
135. de Souza, P.M., et al., *Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme*. Food Hydrocolloids, 2010. **24**(4): p. 300-306.
136. Sanchez-Gonzalez, L., J.I.Q. Saavedra, and A. Chiralt, *Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria*. Food Control, 2014. **35**(1): p. 200-206.
137. Arrieta, M.P., et al., *Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol*. Journal of Food Engineering, 2014. **121**: p. 94-101.
138. Ali, Y., V.M. Ghorpade, and M.A. Hanna, *Properties of thermally-treated wheat gluten films*. Industrial Crops and Products, 1997. **6**(2): p. 177-184.
139. Gennadios, A., et al., *Heat curing of soy protein films*. Transactions of the Asae, 1996. **39**(2): p. 575-579.
140. Kim, K.M., et al., *Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures*. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology, 2002. **35**(2): p. 140-145.
141. Miller, K.S., M.T. Chiang, and J.M. Krochta, *Heat curing of whey protein films*. Journal of Food Science, 1997. **62**(6): p. 1189-1193.
142. Amin, S. and Z. Ustunol, *Solubility and mechanical properties of heat-cured whey protein-based edible films compared with that of collagen and natural casings*. International Journal of Dairy Technology, 2007. **60**(2): p. 149-153.
143. Hernandez-Munoz, P., R. Villalobos, and A. Chiralt, *Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions*. Food Hydrocolloids, 2004. **18**(4): p. 647-654.
144. Motoki, M., et al., *ALPHA-S1-CASEIN FILM PREPARED USING TRANSGLUTAMINASE*. Agricultural and Biological Chemistry, 1987. **51**(4): p. 993-996.
145. Chambi, H. and C. Grosso, *Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase*. Food Research International, 2006. **39**(4): p. 458-466.

146. Gennadios, A., et al., *Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films*. Journal of Food Science, 1998. **63**(2): p. 225-228.
147. Rhim, J.W., et al., *Properties of ultraviolet irradiated protein films*. Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 1999. **32**(3): p. 129-133.
148. Lacroix, M., et al., *Physicochemical properties of calcium caseinate films cross-linked by gamma-irradiation*. Chemical Engineering Communications, 2002. **189**(10): p. 1389-1402.
149. Fabra, M.J., P. Talens, and A. Chiralt, *Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures*. Journal of Food Engineering, 2008. **85**(3): p. 393-400.
150. Fabra, M.J., et al., *Barrier properties of sodium caseinate films as affected by lipid composition and moisture content*. Journal of Food Engineering, 2012. **109**(3): p. 372-379.
151. Avenabustillos, R.J. and J.M. Krochta, *Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium cross-linking and lipid content*. Journal of Food Science, 1993. **58**(4): p. 904-907.
152. Ouattara, B., et al., *Use of gamma-irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films*. Radiation Physics and Chemistry, 2002. **63**(3-6): p. 821-825.
153. Han, J.H., *Antimicrobial packaging systems*, in *Innovations in food packaging*, J.H. Han, Editor. 2005, Elsevier. p. 80-107.
154. de Kruijf, N., et al., *Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects*. Food Additives and Contaminants, 2002. **19**: p. 144-162.
155. Lopez-Rubio, A., et al., *Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications*. Food Reviews International, 2004. **20**(4): p. 357-387.
156. Almenar, E., et al., *A new technique to prevent the main post harvest diseases in berries during storage: Inclusion complexes beta-cyclodextrin-hexanal*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **118**(2): p. 164-172.
157. Ghasemlou, M., et al., *Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils*. Carbohydrate Polymers, 2013. **98**(1): p. 1117-1126.
158. Emiroglu, Z.K., et al., *Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties*. Meat Science, 2010. **86**(2): p. 283-288.
159. Weerakkody, N.S., et al., *In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria*. Food Control, 2010. **21**(10): p. 1408-1414.
160. Santos, J.C., et al., *In vitro antimicrobial activity of essential oils from oregano, garlic, clove and lemon against pathogenic bacteria isolated from Anomalocardia brasiliensis*. Semina-Ciencias Agrarias, 2011. **32**(4): p. 1557-1564.
161. Almenar, E., et al., *Active package for wild strawberry fruit (Fragaria vesca L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(6): p. 2240-2245.
162. de Abreu, D.A.P., J.M. Cruz, and P.P. Losada, *Active and Intelligent Packaging for the Food Industry*. Food Reviews International, 2012. **28**(2): p. 146-187.
163. Becerril, R., et al., *Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against E-coli and S-aureus*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **388**(5-6): p. 1003-1011.

164. Nadarajah, D., J.H. Han, and R.A. Holley, *Inactivation of Escherichia coli O157 : H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate*. International Journal of Food Microbiology, 2005. **99**(3): p. 269-279.
165. Reddy, M.V.B., et al., *Characterization and use of essential oil from Thymus vulgaris against Botrytis cinerea and Rhizopus stolonifer in strawberry fruits*. Phytochemistry, 1998. **47**(8): p. 1515-1520.
166. Almenar, E., et al., *Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone*. Lwt-Food Science and Technology, 2009. **42**(2): p. 587-593.
167. Park, S.I., M.A. Daeschel, and Y. Zhao, *Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films*. Journal of Food Science, 2004. **69**(8): p. M215-M221.
168. Bierhalz, A.C.K., M.A. da Silva, and T.G. Kieckbusch, *Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications*. Journal of Food Engineering, 2012. **110**(1): p. 18-25.
169. da Silva, M.A., A.C.K. Bierhalz, and T.G. Kieckbusch, *Modelling natamycin release from alginate/chitosan active films*. International Journal of Food Science and Technology, 2012. **47**(4): p. 740-746.
170. Jose Fabra, M., L. Sanchez-Gonzalez, and A. Chiralt, *Lysozyme release from isolate pea protein and starch based films and their antimicrobial properties*. Lwt-Food Science and Technology, 2014. **55**(1): p. 22-26.
171. Moditsi, M., et al., *Modifying the physical properties of dairy protein films for controlled release of antifungal agents*. Food Hydrocolloids, 2014. **39**: p. 195-203.
172. Ouattara, B., et al., *Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films*. Journal of Food Science, 2000. **65**(5): p. 768-773.
173. Sobrino-Lopez, A. and O. Martin-Belloso, *Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products*. International Dairy Journal, 2008. **18**(4): p. 329-343.
174. Aly, S., et al., *The efficacy of nisin can drastically vary when produced in situ in model cheeses*. Food Microbiology, 2012. **32**(1): p. 185-190.
175. Chollet, E., et al., *Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity*. Food Control, 2008. **19**(10): p. 982-989.
176. Aasen, I.M., et al., *Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **87**(1-2): p. 35-43.
177. Hoffman, K.L., I.Y. Han, and P.L. Dawson, *Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA*. Journal of Food Protection, 2001. **64**(6): p. 885-889.
178. Ozdemir, M. and J.D. Floros, *Active food packaging technologies*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004. **44**(3): p. 185-193.
179. Lian, Z.X., et al., *Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings*. Process Biochemistry, 2012. **47**(2): p. 201-208.
180. Fang, T.J. and C.C. Lin, *Inhibition of Listeria monocytogenes on pork tissue by immobilized nisin*. Journal of Food and Drug Analysis, 1995. **3**(4): p. 269-274.
181. Le-Tien, C., et al., *Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2004. **39**: p. 189-198.
182. Conte, A., et al., *Immobilization of lysozyme on polyvinylalcohol films for active packaging applications*. Journal of Food Protection, 2006. **69**(4): p. 866-870.

183. Conte, A., et al., *Development of immobilized lysozyme based active film*. Journal of Food Engineering, 2007. **78**(3): p. 741-745.
184. Appendini, P. and J.H. Hotchkiss, *Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films*. Packaging Technology & Science 1997. **10**(5): p. 271-279.
185. Millette, M., W. Smoragiewicz, and M. Lacroix, *Antimicrobial potential of immobilized Lactococcus lactis subsp lactis ATCC 11454 against selected bacteria*. Journal of Food Protection, 2004. **67**(6): p. 1184-1189.
186. Scannell, A.G.M., et al., *Continuous production of lacticin 3147 and nisin using cells immobilized in calcium alginate*. Journal of Applied Microbiology, 2000. **89**(4): p. 573-579.
187. Bayarri, M., et al., *Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging*. Journal of Food Engineering, 2014. **131**: p. 18-25.
188. Murillo-Martinez, M.M., et al., *Antimicrobial Activity and Hydrophobicity of Edible Whey Protein Isolate Films Formulated with Nisin and/or Glucose Oxidase*. Journal of Food Science, 2013. **78**(4): p. M560-M566.
189. Ture, H., M. Gallstedt, and M.S. Hedenqvist, *Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate*. Food Research International, 2012. **45**(1): p. 109-115.
190. Sanchez-Gonzalez, L., et al., *Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan*. Journal of Food Engineering, 2011. **105**(2): p. 246-253.
191. Atares, L., J. Bonilla, and A. Chiralt, *Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils*. Journal of Food Engineering, 2010. **100**(4): p. 678-687.
192. Atares, L., et al., *Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils*. Journal of Food Engineering, 2010. **99**(3): p. 384-391.
193. Pastor, C., et al., *Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content*. Carbohydrate Polymers, 2010. **82**(4): p. 1174-1183.
194. Resa, C.P.O., R.J. Jagus, and L.N. Gerschenson, *Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2014. **40**: p. 281-287.
195. Bourbon, A.I., et al., *Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight*. Journal of Food Engineering, 2011. **106**(2): p. 111-118.

AVANT PROPOS

Avant Propos

La synthèse bibliographique a mis en évidence que si de très nombreux travaux concernent les films ou enrobages comestibles antimicrobiens, ceux-ci sont en général élaborés par voie solvant (« casting ») alors que les films plastiques préformés destinés au conditionnement des aliments sont élaborés par voie fondue (extrusion). Dans ce contexte, il a été récemment démontré que des films comestibles hydrosolubles à base de caséinates peuvent être élaborés par extrusion-gonflage (Belyamani *et al.*, 2014) qui est un procédé similaire à celui employé par les fabricants de films plastiques à l'échelle industrielle. Cela constitue une innovation prometteuse qui pourrait ouvrir la voie à des applications de ces films en réduisant les coûts de production. Dans le cadre de ces travaux de thèse, un premier objectif a consisté à évaluer s'il était possible d'incorporer dans la formulation de ces matériaux plastiques des agents antimicrobiens naturels ayant un statut d'ingrédient ou d'additif alimentaire (conservateur) pour obtenir des films actifs qui restent comestibles. Compte-tenu du fait que les températures d'extrusion bi-vis pour préparer les granulés thermoplastiques puis d'extrusion gonflage sont d'environ 80°C, il a été possible d'envisager d'incorporer des conservateurs naturels présentant une thermostabilité limitée dans des milieux riches en eau : le lysozyme (E 1105), la nisine (E 234) et la natamycine (E 235). Le lysozyme présente l'avantage par rapport à la nisine et à la natamycine d'être un enzyme dont l'activité résiduelle peut être mesurée de façon rapide et précise alors que les dosages des activités antimicrobiennes résiduelles de la nisine ou de la natamycine sont plus longs et moins précis.

Concernant le lysozyme, le cisaillement lors des traitements thermomécaniques d'élaboration des films peut tout comme la chaleur engendrer une dénaturation irréversible de la conformation active de cette protéine. Une étude a donc été conduite pour définir les couples formulation-procédé d'élaboration permettant de préserver l'activité du lysozyme, alors employé en tant que modèle de conservateur relativement thermosensible. Des études préalables (Nam *et al.* (2007) et très récemment Jbilou *et al.* (2014)) ont démontré qu'il est possible à la fois de plastifier des biopolymères comme l'amidon ou des agro-ressources de composition plus complexe comme la farine de maïs et de préserver l'activité du lysozyme à des températures de transformation excédant 100°C. Il est donc très probable que le procédé développé pour obtenir des films à base de caséinate de sodium puisse préserver une activité résiduelle suffisante du lysozyme incorporé pour obtenir des films présentant une activité antibactérienne. Cependant, l'effet du cisaillement et de la température sur la stabilité de

protéines telles que le lysozyme est rarement étudié. Ces effets peuvent avoir des effets dénaturants et conduire à l'inactivation du lysozyme. L'étude de la stabilité du lysosyme après les 2 étapes du procédé (extrusion bi-vis pour préparer les granulés et extrusion-gonflage pour obtenir des films) est donc très importante.

L'étude sur la stabilité du lysozyme constitue un « milestone » pour la littérature concernant la fabrication des films comestibles et actifs ainsi que pour cette thèse car elle conduit à une autre étude sur cette fois-ci l'insertion de la nisine et de la natamycine dans les formulations à base de caséinate avant extrusion. Comparé au lysozyme, il y a encore moins de publications disponibles sur l'incorporation de ces actifs dans des matériaux par voie fondue. La nisine et la natamycine sont des conservateurs appliqués souvent en suspension par pulvérisation ou par immersion sur les produits concernés. Cette procédure opérationnelle pourrait être améliorée du point de vue des règles d'hygiène et de sécurité pour les personnes opératrices ainsi que sur un plan économique pour les industriels. En effet, lorsque le mode de dépôt de la suspension active est la pulvérisation, une atmosphère chargée de particules actives peut mettre en cause la sûreté des conditions de travail dans l'unité de production. Quant au plan économique, les suspensions nécessitant une utilisation importante de solvant, doivent être séchées une fois appliquée sur le support. Cela se traduit par une perte d'énergie (application suivie d'une évaporation du solvant) et surtout de temps non-négligeable. Il est donc très encourageant de fabriquer par voie fondue des films préformés comestibles et hydrosolubles contenant la nisine ou la natamycine car ces films pourraient être déposés facilement sur les produits à enrober. Ces derniers peuvent garder une activité antimicrobienne après les étapes d'extrusion des films grâce à la température de transformation relativement faible du caséinate de sodium. En revanche, la stabilité lors des traitements thermiques et mécaniques des agents antimicrobiens étant variable, il est primordial de mesurer l'efficacité antimicrobienne des films après leur élaboration dans différentes conditions. La démonstration de la possibilité d'obtenir des films antimicrobiens par la voie traditionnelle d'élaboration industrielle des films plastiques lèverait ainsi un frein majeur à l'utilisation et à la commercialisation de ces films comestibles antimicrobiens.

A côté des caractéristiques actives antimicrobiennes, les propriétés classiques des films à base de caséinate de sodium fabriqués par voie fondue sont très importantes. Ce sont ces propriétés qui définissent les champs d'utilisation des films. Un emballage destiné à couvrir un aliment doit assurer les conditions de conservation de ce dernier. Par exemple la capacité d'un film à s'hydrater par l'humidité peut poser une difficulté pour le

conditionnement des aliments ayant des teneurs en eau élevées. En effet l'efficacité des films comestibles entant que matériaux d'emballage est définie par leurs caractéristiques physico-chimiques. De ce fait, une dernière étude est consacrée aux mesures des propriétés barrières et de sorptions d'eau des films à base de caséinate de sodium. La synthèse bibliographique du manuscrit a mis en évidence que les protéines sont des matières premières qui présentent de très bonnes propriétés barrières aux gaz notamment à l'oxygène. En revanche, il existe de nombreux paramètres qui peuvent influencer les propriétés physico-chimiques des films comestibles à base de protéines. Parmi ces derniers peuvent être cités: le type de solvant, le plastifiant, le type de procédés. En conséquence, l'effet de ces paramètres sur les isothermes de sorption de l'eau et la perméabilité aux gaz doit être étudié afin de proposer sur le marché des films thermoplastiques de caséinate de sodium entant que matériau d'emballage.

L'enjeu applicatif de ces travaux est donc de définir les conditions permettant d'obtenir des films antimicrobiens de caséinate de sodium par voie fondue et de caractériser leurs propriétés classiques. L'enjeu cognitif, d'autre part, est de comprendre comment et pourquoi les différents paramètres d'élaboration des films influencent la stabilité des agents actifs et les propriétés finales des films. Pour cela, dans un premier temps, la température d'extrusion du caséinate de sodium a été réduite le plus possible. Le lysozyme a ainsi pu être incorporé dans le matériau comestible plastifié par du glycérol ajouté en proportions variables. La transformation des matériaux actifs thermoplastiques de qualité alimentaire a été suivie par des caractérisations de leur composition chimique et de certaines de leurs propriétés physiques et bioactives. Dans un second temps, le profil de température optimisé par rapport à l'activité enzymatique résiduelle du lysozyme a été adopté pour incorporer la nisine ou la natamycine. Ensuite les propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de différents micro-organismes cibles des films ont été évaluées. Des propriétés variées, telles que la transparence ou la couleur, ont été étudiées afin de voir si l'ajout en concentration faible des actifs impactait les caractéristiques organoleptiques des films. Finalement, une étude a consisté à caractériser les propriétés de transport des gaz à travers les films élaborés. L'influence sur ces propriétés de variables comme l'utilisation ou non de l'éthanol, le mode de fabrication ou le taux de glycérol, a été étudié.

CHAPITRE II:

ACTIVE BIODEGRADABLE SODIUM CASEINATE FILMS MANUFACTURED BY BLOWN-FILM EXTRUSION: EFFECT OF THERMO-MECHANICAL PROCESSING PARAMETERS AND FORMULATION ON LYSOZYME STABILITY

BasakYilinCOLAK^{a,b,c,d}, Pierre PEYNICHOU^d, Sophie GALLAND^d, Nadia OULAHAL^d,
Gilles ASSEZAT^{a,b,c}, FrédéricPROCHAZKA^{a,b,c}, Pascal DEGRAEVE^{d,*}

^aUniversité de Lyon, F-69003, France

^bCNRS, UMR 5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, France

^cUniversité de Saint-Etienne, F-42023, Saint-Etienne, France

^dUniversité de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 - ISARA Lyon, Laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA, EA n°3733), IUT Lyon 1 site de Bourg en Bresse, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France

Chapitre II: Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability

Ce chapitre est rédigé sous forme d'une publication qui a été soumise au numéro spécial « Biopolymers and Blends » de la revue « Industrial Crops and Products ».

Cet article est consacré aux effets de la formulation et des procédés de transformation sur l'activité enzymatique d'un conservateur alimentaire, le lysozyme, ainsi que sur les propriétés mécaniques et la biodégradabilité des films à base de caséinate de sodium. Pour la fabrication des films, deux traitements thermomécaniques sont employés consécutivement : l'extrusion bi-vis pour obtenir des granulés et l'extrusion-gonflage pour obtenir les films. Concernant les procédés de transformation, la température d'extrusion bi-vis a été étudiée ainsi que la succession des traitements thermomécaniques. L'influence de chaque étape de transformation sur l'activité enzymatique a été déterminée. En ce qui concerne la formulation, l'influence du taux de glycérol injecté dans l'extrudeuse bi-vis a été étudiée. Son impact sur l'activité enzymatique résiduelle et sur les propriétés mécaniques des films a été mesuré. La biodégradabilité du caséinate de sodium à l'état natif et sous forme thermoplastique a également été évaluée.

Dans cette publication, une première partie bibliographique fournit une brève description des deux types de procédés fréquemment employés pour fabriquer des films comestibles. Le lysozyme, conservateur alimentaire, et le caséinate de sodium sont présentés.

La partie « Matériel et méthodes » décrit le mode de préparation des matériaux thermoplastiques et les méthodes pour caractériser leurs compositions ainsi que leurs propriétés finales.

Dans la partie « Résultats et discussions », les résultats des études préliminaires sur la composition des films et des granulés sont présentés. L'activité enzymatique résiduelle est déterminée après les différentes étapes de transformation et suite au stockage à température ambiante ou -20°C des films et des granulés pendant des durées variables. L'activité antimicrobienne des granulés actifs a donc aussi été caractérisée. Ensuite, les propriétés mécaniques des films en fonction des températures de transformation ou en fonction des taux de glycérol dans leur formulation mesurées dans des conditions d'humidité relative contrôlée

sont présentées. L'évaluation de la biodégradation ultime est réalisée. Les conclusions principales de cette étude peuvent être résumées par les points suivants :

- La température de la première extrusion et le taux de glycérol influencent significativement l'activité enzymatique résiduelle du lysozyme. En jouant seulement sur ces paramètres, l'activité enzymatique résiduelle de lysozyme dans les granulés, varie entre 10 et 41%.
- L'étape d'extrusion-gonflage qui suit impacte aussi l'activité enzymatique résiduelle du lysozyme. Elle baisse par exemple de 41% à 26% après avoir subi une deuxième transformation thermomécanique.
- Les granulés actifs présentant une activité enzymatique résiduelle égale à 38% de celle du lysozyme initialement introduit dans leur formulation, provoquent une inhibition complète de la croissance de *K.rhizophila* en milieu nutritif liquide.
- Les propriétés mécaniques des films sont majoritairement influencées par l'humidité relative environnante et le taux de glycérol mais pas par la présence du lysozyme à une concentration de 1%(m/m) dans la formulation.
- Les biodégradabilités ultimes du caséinate de sodium natif et du caséinate de sodium thermoplastique contenant ou non du lysozyme sont quasiment identiques. La présence de lysozyme actif dans les films n'altère donc pas leur biodégradabilité.

II.1. Introduction

The globalization of food markets and increasing concerns on food stability and control lead researchers and industrials to develop active and intelligent packaging materials. Edible films as carriers of active compounds are promising applications of active food packaging (Han and Gennadios, 2005). Antimicrobial edible films provide not only the opportunity to extend shelf-life of foods by preventing contamination or growth of unwanted microorganisms, but also provide the possibility to reduce environmental impact of conventional packaging materials (Chen, 1995; Krochta and De Mulder-Johnston, 1997; VM Hernandez-Izquierdo, 2008). Edible films can be obtained mainly by two processes. The “wet process” constitutes the preparation of a film-forming solution by homogeneous dispersion or solubilization of biopolymer and successive evaporation of the solvent on a substrate (Gontard and Guilbert, 1996). The “dry process” involves thermomechanical processes such as extrusion and compression molding. These methods are getting documented more and more in the literature for the elaboration of hydrocolloids-based biomaterials (Belyamani et al., 2014; Guerrero et al., 2012; Hanani et al., 2012; Hernandez-Izquierdo and Krochta, 2009; Jerez et al., 2005, 2007a, b; Martinez et al., 2013; Nam et al., 2007; Pommet et al., 2005; Ture et al., 2012; Zhang et al., 2001). Krochta (2002) suggested that an efficient production by conventional extrusion equipment would certainly encourage the commercialization of edible films. The difficulty still persists in elaboration of antimicrobial films by dry processes due to thermal sensitivity of antimicrobial agents such as enzymes. Del Nobile *et al.* (2009) published one of the rare studies challenging the fabrication of active films using recyclable and biodegradable polymers such as high density polyethylene (HDPE), polylactide (PLA) and polycaprolactone (PCL) by dry extrusion processes. Nam *et al.* (2007), on the other hand, successfully showed the possibility to obtain antimicrobial edible films formulated with pea starch and lysozyme by twin-screw extrusion process.

Lysozyme (E1105) is a widely used enzyme authorized for food preservation in Europe under Directive 1995/2/EC on food additives. It has also been accepted as an antimicrobial agent in casings and in ready-to-eat products by Food and Drug Administration (2000) in U.S.A. Lysozyme exhibits a strong antimicrobial activity against most Gram-positive and some Gram-negative bacteria. It damages peptidoglycans in bacterial cell wall by catalyzing hydrolysis of β -1-3 glycosidic linkages between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine. Lysozyme was used for the first time by Appendini and Hotchkiss

(1997) in antimicrobial films based on polyvinyl alcohol (PVOH), nylon, and cellulose triacetate. It has also been incorporated in chitosan films (Duan et al., 2008; Duan et al., 2007; Park et al., 2004; Yuceer and Caner, 2014), starch films (Jose Fabra et al., 2014; Nam et al., 2007) and zein based films (Arcan and Yemenicioglu, 2013; Gucbilmez et al., 2007; Mecitoglu et al., 2006; Unalan et al., 2011).

Proteins are very interesting biopolymers for edible films thanks to their good gas (Bourlieu et al., 2009; Cuq et al., 1998; Pochat-Bohatier et al., 2006) and aroma (Debeaufort et al., 2002) barrier properties under dry conditions. Sodium caseinate (NaC) is one of the most studied proteins in edible films due to its excellent film-forming properties and high nutritional value. Numerous antimicrobial agents including essential oils (Atares et al., 2010), organic acids (Arrieta et al., 2013; Arrieta et al., 2014), bacteriocins (Cao-Hoang et al., 2010a; Cao-Hoang et al., 2010b) and lysozyme (Mendes de Souza et al., 2010) have been incorporated into NaC films to obtain edible packaging films with enhanced protective functions. However, the method for film fabrication was mainly solution casting and studies on the production by thermo-plastic process of NaC films containing active compounds are still needed.

Recently, NaC-based edible thin films (~30µm) were prepared using blown-film-extrusion by (Belyamani et al., 2014). In the present study, we proposed to add lysozyme to NaC powder in the extrusion process in order to obtain antimicrobial films. Therefore, a systematic study of process and formulation parameters will aim at maximizing the residual enzymatic activity of lysozyme following extrusion and blowing. Thereafter, the antimicrobial activity against a lysozyme-sensitive bacterial strain, *Micrococcus luteus* of the most active materials will be assayed. To our knowledge, the present manuscript is the first one reporting the preparation of lysozyme-containing active NaC materials by thermo-mechanical processes.

II.1. Materials and methods

II.1.1. Materials

Sodium caseinate native powder was from EPI Ingredients (Ancenis, France) and chicken egg white lysozyme and glycerol were from Sigma-Aldrich (St Louis, Mo., USA).

II.1.2. Preparation of sodium caseinate pellets and films with or without (control) lysozyme

Sodium caseinate control pellets and films without lysozyme were prepared as described previously by Belyamani *et al.*(2014). For the elaboration of pellets containing lysozyme, a preliminary mixture of sodium caseinate powder and lysozyme to the desired concentration (1% w/w) was prepared. The powder mixture was shaken simply for 5 min in a closed plastic container to ensure the homogenization. This sodium caseinate-lysozyme mixture or sodium caseinate alone (control) were introduced directly in twin-screw extruder. Glycerol and water were used as plasticizer agents; the glycerol rate was evaluated according to following equation:

$$\% \textit{glycerol} = \frac{\textit{weight}_{\textit{glycerol}}}{\textit{weight}_{\textit{glycerol}} + \textit{weight}_{\textit{sodiumcaseinate}}} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Lysozyme containing pellets were then used to produce antimicrobial blown films with a blown-film-extruder (Diani, Italy). Pellets were conditioned till equilibrium in an environmental chamber at 80% RH (30°C) before extrusion-blowing. Residence times in twin-screw extruder and blown-film-extruder were 2.5 and 7 min, respectively.

Table 1 lists the composition of all samples studied with maximal processing temperatures and nomenclatures used.

Table 1: Nomenclature list presenting sodium caseinate (NaC), glycerol (G) and lysozyme (L) contents (expressed in %) of all samples with maximal processing temperatures.

| Nomenclature | Formulation | | | Process temperature | |
|--|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| | sodium caseinate % (w_G/w_{G+NaC}) | glycerol % (w_G/w_{G+NaC}) | lysozyme % (w_L/w_{L+NaC}) | twin-screw extrusion temperature (°C) | extrusion-blowing temperature (°C) |
| NaC | 100 | 0 | 0 | - | - |
| NaCG ₂₀ 100 | 80 | 20 | 0 | 100 | - |
| NaCG ₂₀ 85 | 80 | 20 | 0 | 85 | - |
| NaCG ₂₀ 65 | 80 | 20 | 0 | 65 | - |
| NaCG ₁₅ 65 | 85 | 15 | 0 | 65 | - |
| NaCG ₂₅ 65 | 75 | 25 | 0 | 65 | - |
| NaCG ₂₀ L ₁ 100 | 80 | 20 | 1 | 100 | - |
| NaCG ₂₀ L ₁ 85 | 80 | 20 | 1 | 85 | - |
| NaCG ₂₀ L ₁ 65 | 80 | 20 | 1 | 65 | - |
| NaCG ₁₅ L ₁ 65 | 85 | 15 | 1 | 65 | - |
| NaCG ₂₅ L ₁ 65 | 75 | 25 | 1 | 65 | - |
| NaCG ₂₀ 100-80 | 80 | 20 | 0 | 100 | 80 |
| NaCG ₂₀ 85-80 | 80 | 20 | 0 | 85 | 80 |
| NaCG ₂₀ 65-80 | 80 | 20 | 0 | 65 | 80 |
| NaCG ₁₅ 65-80 | 85 | 15 | 0 | 65 | 80 |
| NaCG ₂₅ 65-80 | 75 | 25 | 0 | 65 | 80 |
| NaCG ₂₀ L ₁ 100-80 | 80 | 20 | 1 | 100 | 80 |
| NaCG ₂₀ L ₁ 85-80 | 80 | 20 | 1 | 85 | 80 |
| NaCG ₂₀ L ₁ 65-80 | 80 | 20 | 1 | 65 | 80 |
| NaCG ₁₅ L ₁ 65-80 | 85 | 15 | 1 | 65 | 80 |
| NaCG ₂₅ L ₁ 65-80 | 75 | 25 | 1 | 65 | 80 |

II.1.3. Composition of pellets and films following extrusion and blowing

II.1.3.1. Moisture isotherms of sodium caseinate pellets and films

The water vapor adsorption isotherms at 30°C were determined for extruded NaC control pellets (extruded at 65, 85, or 100°C) and the corresponding blown films (blown at 80°C). Lysozyme-containing pellets extruded at 65°C and corresponding were also studied. Samples with an initial weight of about 1 g were dried overnight in a vacuum oven at 80°C. Dried samples were placed in an environmental test chamber to be equilibrated at 30°C and at different water activity values ranging from 0.4 to 0.8. The equilibrium was considered to be

reached when the weight was constant. Equilibrium moisture content (EMC) was calculated according to following equation:

$$EMC (\%) = \frac{M_{w(eq)} - M_d}{M_d} \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

where $M_{w(eq)}$ is the mass of dry matter plus the mass of water molecules sorbed at equilibrium and M_d is the mass of dry matter.

II.1.3.2. Proteins determination in pellets and films

The only constituents of pellets and films containing nitrogen were sodium caseinate and lysozyme. Total nitrogen (TN) was thus determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1984) with a digester and distillation unit K-350 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) in order to check the sodium caseinate composition of all studied samples. Analyses were carried out on samples pre-conditioned in a 50% relative humidity (RH) atmosphere at 30°C. The TN values were expressed in g protein per 100 g. The protein values were obtained by multiplying the total nitrogen values by 6.38 (the nitrogen to protein conversion factor for dairy products).

II.1.4. Assay of lysozyme enzymatic activity

Lysozyme activity was assayed at 25°C following a modified method of Shugar(1952). The activity of lysozyme was determined by monitoring the decrease in turbidity of a suspension of lyophilized *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 cells (Sigma Aldrich) at 450 nm using a spectrophotometer (Cary 100 UV-Vis spectrophotometer, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Pellet or film samples stored at room temperature in closed containers were dried overnight in a vacuum oven at 80°C. One gram of dried sample was solubilized in a freshly prepared 0.1 mol.L⁻¹, pH 7.0 potassium phosphate buffer at 25°C under magnetic stirring for 2 h. 100 µL of sample solution were mixed quickly with 2.9 mL of *M. lysodeikticus* cell wall suspension in 0.1 mol.L⁻¹, pH 7.0 potassium phosphate buffer in a spectrophotometer cuvette. The optical densities at 450 nm were then measured at 15 s intervals during 2 min against a blank cell only containing phosphate buffer. Lysozyme activity was calculated from the slope of initial linear decrease of absorbance vs. time curve. The residual activity of lysozyme in each material was calculated as the ratio between lysozyme activity assayed and the corresponding activity of the quantity of lysozyme initially added to each material. One unit

(U) of lysozyme activity corresponds to the quantity of lysozyme enhancing a 0.001 decrease in 450 nm absorbance in 1 min under the conditions previously stated.

II.1.5. Antimicrobial activity of lysozyme-containing films

The antimicrobial activities of lysozyme-containing NC pellets and films were assayed by culturable cells counting and agar diffusion assay, respectively. *Micrococcus luteus* A270 strain was used as test microorganism for both approaches.

II.1.5.1. Culturable cells counting

Pellets pre-conditioned at 30°C and 50% RH were dissolved in flasks containing 25 mL of tryptic soy broth (TSB). Three final concentrations (0.05, 0.11, and 0.18 g.mL⁻¹) were chosen to be close to the minimal inhibitory concentration of *M.luteus* A270 which was 5.10⁴ IU of lysozyme per mL (data not shown). An overnight culture of *M.luteus* prepared in TSB at 37°C was used to seed TSB liquid medium containing dissolved active pellets. 2.5 mL of inoculum was added in each flask to obtain 10% (v/v) of bacterial load (i. e. 10⁵ CFU (colony forming units).mL⁻¹ of TSB). The spread plate technique was used. After 0, 1, 3, 5 and 8h incubation at 37°C, samples were plated (0.01 mL per plate - in triplicate) onto tryptic soy agar (TSA). The plates were then incubated at 30°C. Enumeration of colonies was performed with an electronic colony counter (Colony counter 560, Suntex Instruments Co., New Taipei, Taiwan). Results were expressed as log₁₀ CFU.mL⁻¹.

II.1.5.2. Agar diffusion assay

While the antimicrobial activity assays of NaC pellets were performed following their dissolution in liquid broth (TSB), antimicrobial activity of films was evaluated after placing them on the surface of Petri dishes inoculated with lysozyme-sensitive bacteria and measuring the diameter of inhibition zones surrounding films following their incubation for a sufficient duration. For these tests, TSA media were seeded at 50°C by a *M. luteus* culture prepared in TSB medium. At 50°C, TSA media were in a surfusion state. Bacterial load was fixed to 5% (v/v). Inoculated TSA media were poured in Petri dishes (100mL/Petri dish) and cooled. Pre-conditioned (at 30°C in a 50% RH atmosphere) NC films were cut in 8 mm diameter discs with the help of a punch die. The films were placed on the surface of inoculated TSA. Petri dishes were then stored at 4°C for 3 h to ensure the diffusion of lysozyme from films to the

agar media before any bacterial growth occurs. Finally, the Petri dishes were incubated overnight at 37°C. Inhibition zone diameters were measured after 24 h incubation with an electronic zone reader (Haloes Caliper, IUL Instruments S.A., Barcelona, Spain).

II.1.6. Mechanical properties of sodium caseinate active films

Tensile strength measurements of blown films were performed using a homemade tensile test machine placed in an environmental chamber to control the RH and temperature of atmosphere during the test. Special measuring dies were machined for films with thicknesses varying from 70 µm to 100 µm. Films were cut as H shape specimens and conditioned at 30°C in atmospheres at different RH values (40%, 50%, 60%, 70%, and 80%). The measurements were carried out after samples had reached the equilibrium state. Obtained values represent the average of five replicates.

II.1.7. Evaluation of ultimate aerobic biodegradability

Biodegradability was evaluated according to ISO 14851 standard under aerobic conditions in closed bottles (OxiTop® Control, WTW GmbH, Weilheim, Germany). An aqueous medium prepared as described in the ISO 14851 standard was inoculated with activated sludge sampled in Monistrol (France) municipal wastewater treatment station. Samples and blanks (inoculated media without test sample) were stirred at 23°C for 28 days. Bottles were aerated when needed during the test by simply opening bottles for 10 min. The CO₂ produced was removed by means of NaOH pellets; the resulting negative pressure was used to determine the biological oxygen demand (BOD) expressed in mg.L⁻¹. The biodegradability was then calculated by the following equation:

$$Dt (\%) = \frac{BOD_{test} - BOD_{blank}}{C \times DthO_{test}} \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

where, Dt is the biodegradability expressed as %, BOD_{test} is BOD of the sample in a test bottle, BOD_{blank} is BOD of the activated sludge, C (g.L⁻¹) is the concentration of the sample in aqueous medium and $DthO_{test}$ (mg.g⁻¹) is biological oxygen demand of the sample calculated theoretically. BOD_{test} and BOD_{blank} values used were means of 3 replicates.

II.1.8. Statistical analysis

The results are presented as averages and standard deviations calculated from replicate measurements. Statistical differences between samples were calculated using Student's t-test for independent samples (Microsoft Excel, Microsoft France Corporation, Issy-les-Moulineaux, France).

II.2. Results and discussion

II.2.1. Preliminary analysis of pellets and films compositions

Preliminary analysis of NaC extrudates compositions was needed to detect any process-related mass loss (e. g. water or glycerol evaporation) in thermoplastic pellets and films following their extrusion or blowing, respectively. These data were necessary to calculate the real lysozyme concentration in pellets and in films, respectively. Therefore moisture contents as a function of relative humidity of pellets and films were first determined. Thereafter, the nitrogen content of pre-conditioned pellets and films with known moisture contents was measured by the Kjeldahl method.

II.2.1.1. Moisture sorption

Table 2 shows moisture content of NaC pellets and films equilibrated at 30°C in an atmosphere with a relative humidity ranging from 40% to 80%. Water sorption properties of NaC based pellets extruded at three different temperatures 65, 80 and 100°C plasticized with the same glycerol concentration were compared. The amount of adsorbed water increased progressively with relative humidity for all studied samples without any significant variation related to processing temperature. Studied extrusion temperatures didn't influence hydrophilic character of NaC based pellets. Once again, processing a second time the plasticized pellets by blown film extrusion didn't change hydration rates of films compared to those of corresponding pellets. Water sorption properties of lysozyme-containing materials extruded at 65°C were also studied. Lysozyme which is also a protein was compatible with sodium caseinate matrix. As expected, the addition of (1% w/w) lysozyme didn't significantly affect water sorption properties of NaC-based materials. This is consistent with Han (2000) observation: he mentioned that, peptidic additives do not lead to considerable modifications of physico-chemical properties of protein-based edible films.

Table 2: Equilibrium moisture content of NaC pellets processed at 100°C, 85°C and 65°C and their blown films plasticized with 20% glycerol versus relative humidity measured at 30°C.

| <i>Samples</i> | Moisture content (%) $((m_{w(eq)} - m_d)/m_d \times 100)$ | | | | |
|---|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Relative humidity at 30°C of atmosphere (%) | | | | |
| | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
| NaCG ₂₀ 100 | 3.4±0.1 | 9.6±0.3 | 14.8±0.2 | 21.5±0.3 | 34.1±1.0 |
| NaCG ₂₀ 80 | 4.1±0.1 | 9.6±0.1 | 13.8±0.1 | 19.8±0.3 | 32.6±0.3 |
| NaCG ₂₀ 65 | 4.4±0.1 | 10.4±0.2 | 13.8±0.1 | 21.6±0.9 | 33.9±0.5 |
| NaCG ₂₀ L ₁ 65 | 4.4±0.1 | 10.0±0.1 | 14.1±0.1 | 21.2±0.4 | 33.2±0.7 |
| NaCG ₂₀ 100-80 | 3.3±0.1 | 9.7±0.1 | 13.6±0.1 | 19.9±0.2 | 32.9±0.5 |
| NaCG ₂₀ 85-80 | 3.0±0.1 | 10.0±0.1 | 13.4±0.1 | 19.6±0.1 | 32.6±0.3 |
| NaCG ₂₀ 65-80 | 4.2±1.0 | 10.4±0.1 | 15.0±0.2 | 21.8±0.8 | 36.3±3.0 |
| NaCG ₂₀ L ₁ 65-80 | 5.5±1.0 | 9.0±0.6 | 12.4±0.2 | 18.6±0.3 | 31.1±0.2 |

II.2.1.2. Protein quantification

The total protein contents of sodium caseinate alone, pellets and films pre-equilibrated at 30°C in a 50% RH atmosphere are presented in Table 3. Under these conditions, the protein and moisture contents of sodium caseinate alone were $85.5 \pm 0.3\%$ and $11.3 \pm 0.50\%$, respectively. The total of protein and moisture did not reach 100% mainly because of the presence of sodium. This total ($96.9 \pm 0.8\%$), was consistent with the indication by the supplier that sodium caseinate powder contained 3.3% impurity. The protein contents of pellets and films varied between $63.4 \pm 0.3\%$ and $71.8 \pm 0.7\%$. These protein contents variations were consistent with formulation differences: the lowest protein content and the highest protein contents corresponded to a 75% NaC-25% glycerol and a 85% NaC-15% glycerol formulation, respectively. As expected, 80% NaC-20% glycerol formulations had intermediate protein contents comprised between $66.9 \pm 0.4\%$ and $68.6 \pm 0.8\%$ regardless their extrusion temperature (65, 85, or 100°C). Despite these changes in extrusion temperature no significant difference ($p > 0.05$) was recorded. In order to check that the final formulation of pellets and films was consistent with their initial formulation, the sodium caseinate content was calculated on a dry mass basis for all samples (by eliminating the contribution of

moisture and taking into account the presence of 3.3% (on a dry matter basis) impurities in sodium caseinate). For instance, extruded (at 80°C)-blown films made from pellets extruded at 65°C with a 15, 20 or 25% glycerol content had respective NaC contents of 84.6±0.9%, 79.2±0.4% and 74.9±0.2% corresponding to 15.4±2.9, 20.8±0.4 and 25.1±0.2% glycerol, respectively. This suited perfectly with theoretical formulation demonstrating thus the absence of glycerol loss during processing and its homogeneous repartition in films. This was also the case for pellets regardless their extrusion temperature (65, 85, or 100°C).

Table 3: Total protein content of NaC and NaC extrudates determined by Kjeldahl method

| | Moisture content % | Total protein % | Equivalent NaC content in dry mass % | Equivalent glycerol content in dry mass % |
|---|-----------------------|--------------------|---|--|
| NaC | 11.3 ± 0.5 | 85.5 ± 0.3 | 100 | 0 |
| NaCG ₂₀ 100 | 9.6 ± 0.3 | 68.0± 0.1 | 79.5± 0.1 ^a | 20.5± 0.1 |
| NaCG ₂₀ 85 | 9.6 ± 0.1 | 67.9± 0.9 | 79.5± 1.1 ^a | 20.5± 1.1 |
| NaCG ₂₀ 65 | 10.4 ± 0.1 | 66.9± 0.4 | 78.3± 0.4 ^a | 21.7± 0.4 |
| NaCG ₂₀ L ₁ 65 | 10.0± 0.3 | 67.2± 0.7 | 79.4± 0.8 ^a | 20.5± 0.8 |
| NaCG ₁₅ 65 | 10.0 ± 0.3 | 71.8± 0.7 | 83.8± 0.8 ^b | 16.2± 0.8 |
| NaCG ₂₅ 65 | 10.7 ± 0.1 | 63.4± 0.3 | 74.1± 0.4 ^c | 25.9± 0.3 |
| NaCG ₂₀ 100-80 | 9.7 ± 0.50 | 68.5 ± 1.6 | 80.1 ± 1.7 ^a | 19.9 ± 1.8 |
| NaCG ₂₀ 85-80 | 10.0 ± 0.1 | 68.6 ± 0.8 | 80.2 ± 0.9 ^a | 19.8 ± 0.9 |
| NaCG ₂₀ 65-80 | 10.4 ± 0.5 | 67.7 ± 0.3 | 79.2 ± 0.4 ^a | 20.8 ± 0.4 |
| NaCG ₂₀ L ₁ 65-80 | 9.0 ± 0.4 | 68.1 ± 0.1 | 80.4 ± 0.1 ^a | 19.6 ± 0.1 |
| NaCG ₁₅ 65-80 | 9.4 ± 0.5 | 72.5 ± 0.8 | 84.6 ± 0.9 ^b | 15.4 ± 2.8 |
| NaCG ₂₅ 65-80 | 9.9 ± 0.5 | 64.0 ± 0.2 | 74.9 ± 0.2 ^c | 25.1 ± 0.2 |

^{a,b,c} Means within the same column, labeled with the same letter, do not statically differ from each other ($p>0.05$).

II.2.2. Residual activity of lysozyme in pellets and films following extrusion and blowing

II.2.2.1. Influence of twin-screw extrusion temperature and blown film extrusion process

Samples were dried in a vacuum-oven just before assays of lysozyme enzymatic activity to overcome the influence of relative humidity on the water adsorption. This allowed avoiding any errors originating from the absorbed water content of materials.

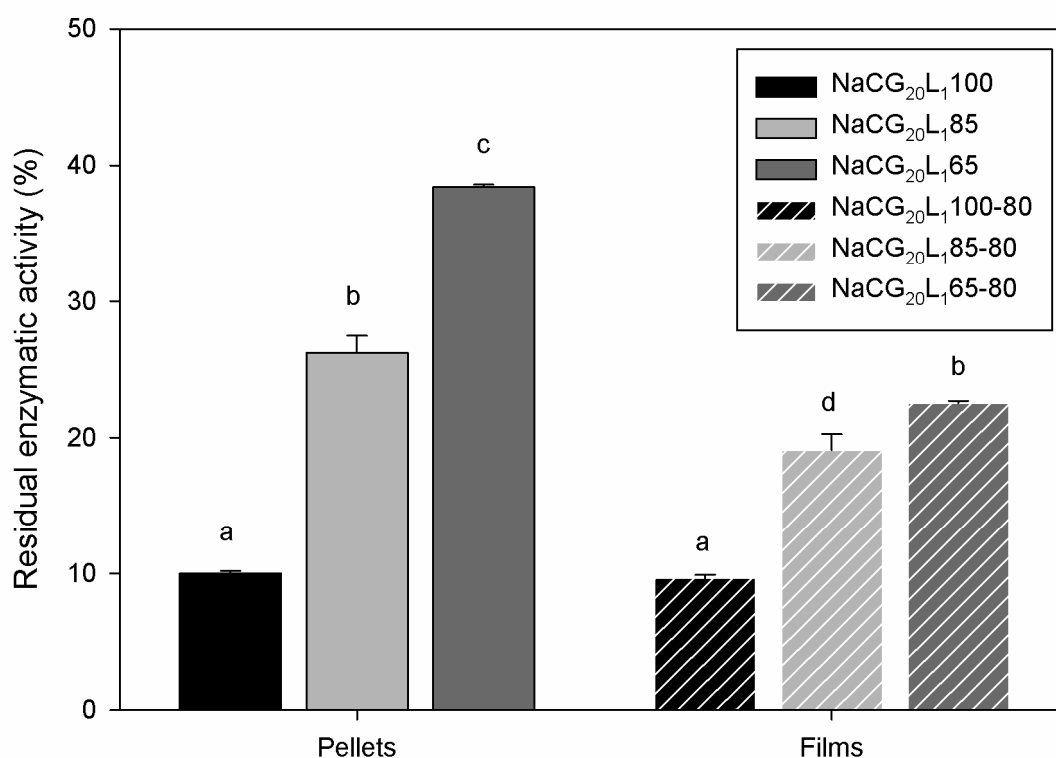


Figure 1: Residual enzymatic activity of lysozyme in 80% (w/w) NaC pellets and films containing 1% (w/w) lysozyme plasticized with 20% (w/w) glycerol. Different letters mentioned on columns indicate significantly different values ($P>0.05$) according to Student's t-test. Same letters were used in the absence of statistically significant differences. Residual activities were measured within 2 weeks after pellets production date.

Lysozyme residual activity in thermoplastic pellets and films is presented in figure 1. 80% NaC containing 1% (w/w) lysozyme - 20% glycerol mixtures were extruded either at 65, 85, or at 100°C to obtain active pellets. The assay of their residual lysozyme activity clearly

indicated that increasing extrusion temperature enhanced lysozyme inactivation: the residual lysozyme activities following extrusion at 65°C or 100°C were 38.4±0.2% or 10.0±1.0%, respectively. Thermal inactivation of lysozyme is likely the main cause of this difference. Nam *et al.* (2007) who studied extrusion at temperatures ranging from 70°C to 150°C of pea starch - lysozyme mixtures also observed a sharp decrease of lysozyme residual activity when increasing temperature. Del Nobile *et al.* (2009) also observed that the persistence of lysozyme residual activity in different recyclable or biodegradable materials following their extrusion was correlated with their extrusion temperature.

Pellets extruded either at 65, 85, or at 100°C were then subsequently blown at 80°C to obtain active films. Following this second thermo-mechanical treatment, films made from pellets extruded at 65°C still had the highest residual lysozyme activity. However, while a further decrease from 38.4±0.2% to 22.5±0.2% and from 26.2±1.3% to 19.1±1.2% was observed following blowing of pellets previously extruded at 65°C and 85°C, respectively, this additional thermo-mechanical treatment did not lead to a significant further activity loss of lysozyme from pellets previously extruded at 100°C. The significant reduction of residual activity between pellets extruded at 85°C and corresponding films blown at 80°C may be caused by the longer residence time in extruder during blowing (7 min) compared to that during twin-screw extrusion (2.5 min). However, although initial thermal inactivation of lysozyme in water has frequently been reported to follow first-order inactivation kinetics (Makki and Durance, 1996), far less studies concerned thermal inactivation kinetics of lysozyme in media with a low moisture content and mechanical stirring (Colombie *et al.*, 2001) prevailing during thermo-mechanical treatments. As a consequence inactivation of lysozyme during these processes could also depend on other parameters than time and temperature, such as on shear stress and on interactions between water, glycerol, lysozyme and sodium caseinate.

Moreover blown-film-extrusion process unlike twin-screw extrusion had no plasticizer feed. Temperature settings directly depended on the viscosity of the melted pellets and were adjusted upon it. Sodium caseinate is an amorphous polymer which does not have a real glass transition temperature (T_g) unlike semi-crystalline or crystalline polymers. Differential scanning calorimetry analysis (DSC) showed that T_g deduced from an endothermic peak extends from 60 to 100°C for the sodium caseinate-based thermoplastics (data not shown).

In addition, absorbed water acts as a plasticizer, therefore a high moisture content in the polymer decreases the T_g. Proceeding from this information, pellets were conditioned in an environmental chamber at 80% RH (30°C) before extrusion blowing in order to diminish the

Tg and thus the viscosity of the mixture. However, despite this pre-conditioning of pellets step, temperature could not be decreased below 80°C. Extrusion-blowing processing parameters (including a 80°C extrusion temperature) were kept exactly the same for all extruded samples.

II.2.2.2. Plasticizer effect

As previously underlined, besides extrusion temperature, lysozyme inactivation during this thermo-mechanical process may also depend on interactions between lysozyme, water, glycerol, and sodium caseinate. Therefore, pellets were prepared by extrusion at 65°C (the temperature at which lysozyme inactivation was minimal) of sodium caseinate and lysozyme with various proportions of glycerol: 15, 20, or 25% (w/w). Films were then prepared by extrusion-blowing at 80°C of these pellets with various glycerol contents. The residual lysozyme activity of pellets and films prepared subsequently is presented in Table4.

Table 4: Influence of glycerol proportion on remaining lysozyme activity of NaC pellets and films prepared thereof.

| Pellets | Lysozyme residual activity (%) | Films | Lysozyme residual activity (%) |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| NaCG ₁₅ 65 | 31.9±0.7^a | NaCG₁₅65-80 | 17.9±0.3^d |
| NaCG ₂₀ 65 | 38.4±0.2^b | NaCG₂₀65-80 | 22.5±0.2^e |
| NaCG ₂₅ 65 | 40.8±0.5^c | NaCG₂₅65-80 | 26.4±0.6^f |

^{a,b,c,d,e,f}Different letters matched to percentage values indicate significant differences ($p>0.05$) according to Student's t-test. Remaining activities were measured within 2 weeks after pellets production date.

In the range of glycerol proportions investigated, increasing glycerol content significantly limited lysozyme inactivation during twin-screw extrusion at 65°C and subsequent extrusion-blowing at 80°C. This increase can be directly related to lysozyme stabilization by glycerol. Although, to our knowledge, the effect of glycerol on the stability of lysozyme under the conditions prevailing during extrusion processes has never been investigated, the effect of polyols and water on protein structure and stability has been investigated by numerous authors (Gekko and Timasheff, 1981a, b; GhattyVenkataKrishna and Carri, 2013; Romeo, 2012; Timasheff et al., 1981). Molecules that tend to bind strongly with water such as sugars and glycerol were reported as effective substances for increasing the stability of proteins by enhancement of the aqueous medium structure (water-glycerol structure around the protein

molecules) or of proteins hydration layer. Gekko and Timasheff(1981a) investigated the thermal stability of several globular proteins in glycerol-water mixtures: they suggested that the addition of protein in glycerol-water solutions increased the chemical potential of glycerol and resulted in its preferential exclusion (preferential hydration). Consequently, the surface of contact between proteins and glycerol was minimized and native structure of globular proteins was stabilized. It could be concluded that glycerol addition during NaC extrusion stabilized the conformation of lysozyme and thus prevented its inactivation. These results could also be attributed to glycerol's ability to stabilize lysozyme against thermal denaturing (Romeo, 2012).

II.2.2.3. Stability of lysozyme during storage of pellets or films

Following extrusion and blowing processes, NaC pellets and films were stored in closed polyethylene bags at room temperature or at -20°C. To determine the influence of storage time and temperature, lysozyme activity of pellets extruded at 65°C with 20%(w/w) glycerol and films prepared thereof by extrusion-blowing at 80°C was assayed at regular intervals (after 2, 5, 18, and 25 weeks) (Table 5).

Table 5: Lysozyme residual activity of NaC extrudates stored at room temperature and at -20°C as a function of storage time.

| Samples | Lysozyme residual activity (%) | | | |
|---|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 0 | 5 weeks | 18 weeks | 25 weeks |
| <i>NaC extrudates stored at room temperature (at -20°C)</i> | | | | |
| NaCG ₂₀ L ₁₆₅ | 38.4±0.2 | 33.8±1.8 (38.2±1.0) | 30.8±0.3 (32.6±1.4) | 33.8±0.4 (37.1±4.4) |
| NaCG ₂₀ L ₁₆₅₋₈₀ | 22.5±0.2 | 23.9±1.2 (22.7±2.0) | 14.4±0.1 (14.1±0.8) | 14.3±0.5 (14.6±0.4) |

The decrease of lysozyme activity in pellets never exceeded 20% of initial activity over the 25 weeks period of storage of pellets whatever their storage temperature was. While the lysozyme activity in films also appeared stable for the first 5 weeks of storage, a decrease of almost 40% in their activity was observed between 5 and 22 weeks storage at -20°C and room temperature. Pellets could thus be stored for longer periods than films. Pellets could thus be stored up to at least 25 weeks, while Further studies are now needed to establish at which period (between 5 and 18 weeks of storage), the activity of lysozyme incorporated in films

significantly decreases and whether this enzymatic activity loss is accompanied by a significant antimicrobial activity loss. Indeed, the correlation between residual enzymatic activity and antimicrobial activity of lysozyme is not always absolute: Ibrahim *et al.*(1996) reported that partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinated and lost its enzymatic activity but still killed Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism.

II.2.3. Antimicrobial activity of lysozyme-containing pellets

Dissolution of active pellets in TSB at final concentrations of 0.05, 0.11, and 0.18 g.mL⁻¹ provided 26%, 53% and 87% of the minimal inhibitory concentration of lysozyme against *M.luteus*, respectively. *M. luteus* growth was then monitored for 32 h at 37°C (Table 6).

Table 6: *Micrococcus luteus* growth in TSB liquid medium at 30°C in the presence of 1.5 g (0.05 g.mL⁻¹), 3 g (0.11 g.mL⁻¹) and 5 g (0.18 g.mL⁻¹) of dissolved NaC active pellets. For controls, TSB medium was used alone or pellets without lysozyme were dissolved at the same concentration (it was verified that this did not affect *M. luteus* growth).

| | Log ₁₀ UFC.mL ⁻¹ | | | | | | | | |
|--------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Incubation time at 37°C | | | | | | | | |
| | 0h | 1h | 3h | 5h | 8h | 9h | 25h | 28h | 32h |
| Controls | 5.0 | 5.2 | 5.4 | 5.5 | 5.9 | 6.2 | 7.4 | 6.9 | 6.8 |
| 0.055 g.mL⁻¹ | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 |
| 0.11 g.mL⁻¹ | 3.4 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 |
| 0.18 g.mL⁻¹ | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 | <1.0 |

It was first verified by dissolving control pellets without lysozyme at the same concentration than active pellets in TSB, that *M. luteus* growth was not affected by sodium caseinate and glycerol addition resulting from their dissolution. Antimicrobial activity immediately observed and maintained for 32 h only in TSB containing dissolved active pellets could thus unambiguously be attributed to active lysozyme dissolved from pellets. . The results clearly indicate that lysozyme present in pellets had a bactericidal effect on target bacteria even at lower concentrations than its MIC. No growth was observed for 32h whatever the tested concentration while a 2.4 log increase within 25h of the *M. luteus* population was observed in

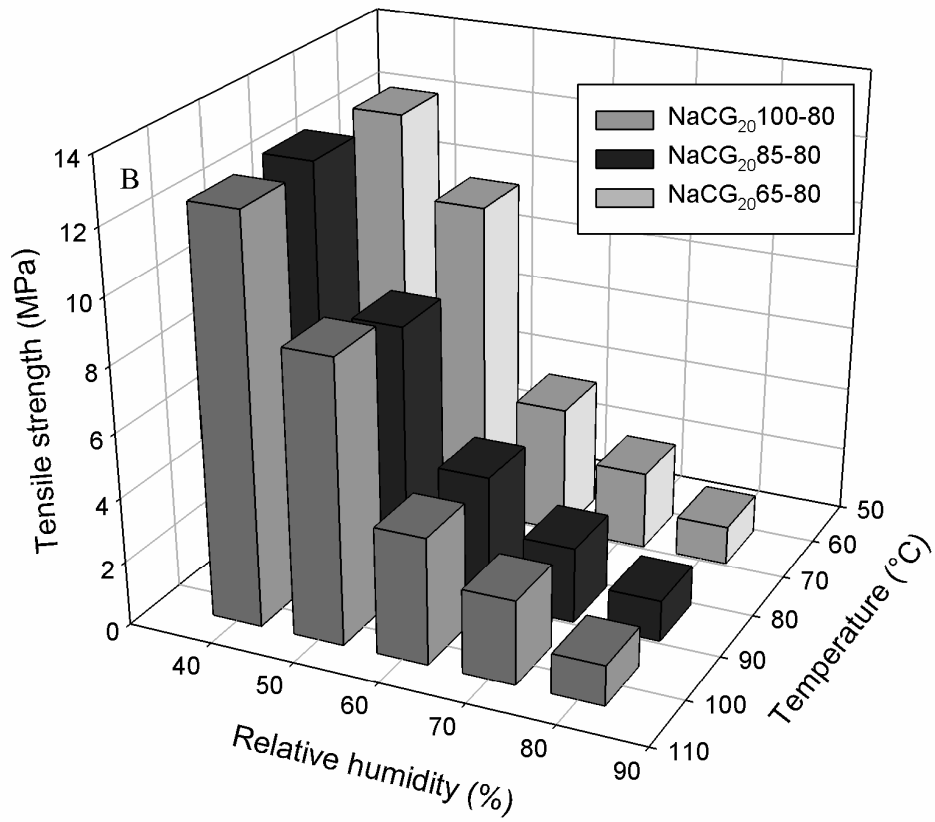
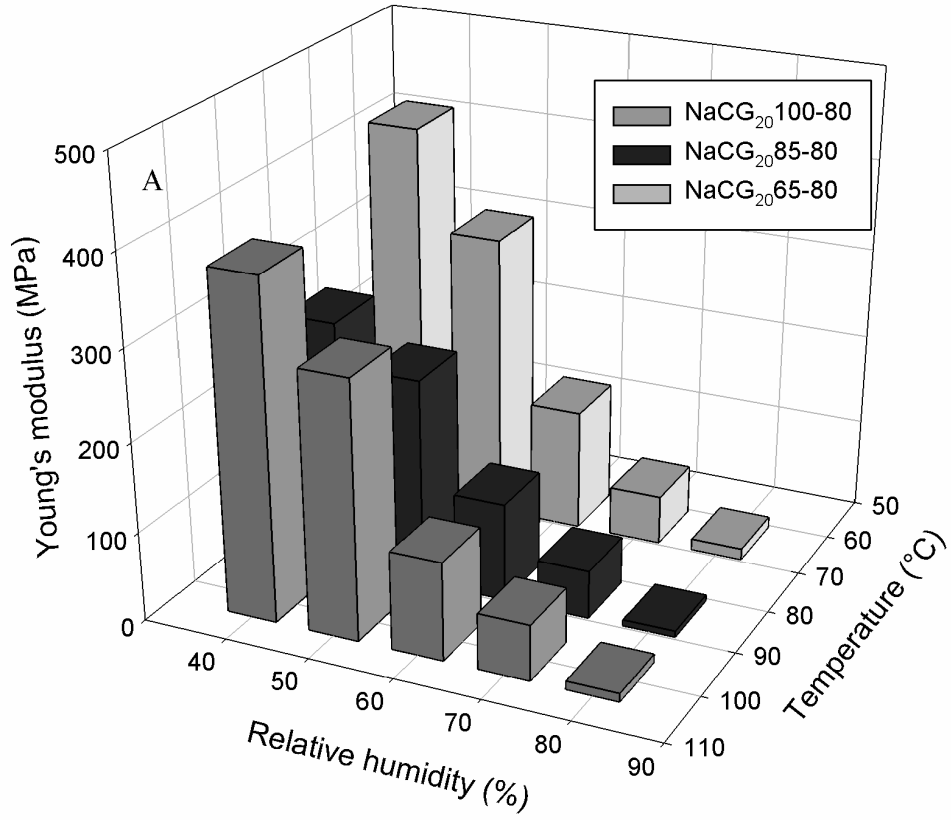
control TSB. The absence of growth even below the MIC of lysozyme is likely due to the fact that several authors have shown that lysozyme having lost its enzymatic activity may still have an antimicrobial activity (Mine et al., 2004; Pellegrini et al., 1997): these authors have demonstrated that lysozyme possesses non-catalytic bactericidal domains in its primary sequence. Moreover, lysozyme partially unfolded by heating treatment showed enhanced bactericidal action despite its enzymatic activity loss (Ibrahim et al., 1996). No inhibition zone surrounding active or control films laid on the surface of agar plates inoculated with *M. luteus* was observed indicating that lysozyme was not released from lysozyme-containing films at a sufficient concentration around films (data not shown). Higher lysozyme concentrations and/or a longer pre-incubation at 4°C period to favor diffusion of lysozyme from active films should thus now be tested. The limited diffusion of lysozyme might also result from electrostatic interactions between caseinate (pHi ≈ 4.5) and lysozyme (pHi ≈ 11) or from its aggregation following thermo-mechanical treatments. However, an important observation is that while *M. luteus* colonized the surface of control films, no growth occurred on active films for 48 h of incubation at 37°C.

II.2.4. Film characterization

II.2.4.1. Mechanical properties of sodium caseinate active films

Further tests were performed in order to determine mechanical properties of NaC films. Young's modulus (YM), tensile strength (TS) and elongation at break (EB) were measured as a function of relative humidity for three different processing temperatures (Figure 2) and also for three different glycerol contents (Figure 3). Tensile strength tests were carried on thin NaC films (~70µm) whose moisture content equilibrates rapidly as a function of surrounding humidity and temperature. Since any change of environmental conditions during measurements could modify film characteristics, mechanical properties tests were all operated in an environmental chamber.

The influence of twin-screw extrusion temperature (65, 85, or 100°C) on the mechanical properties of films successively blown at 80°C is presented on Figure 2.



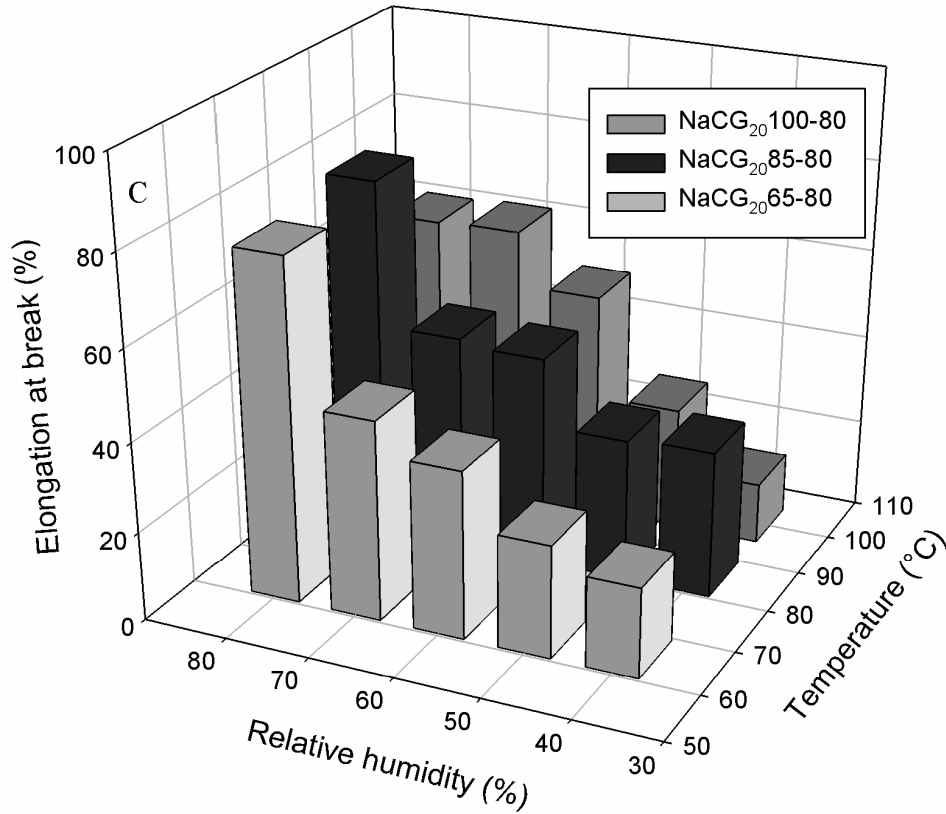


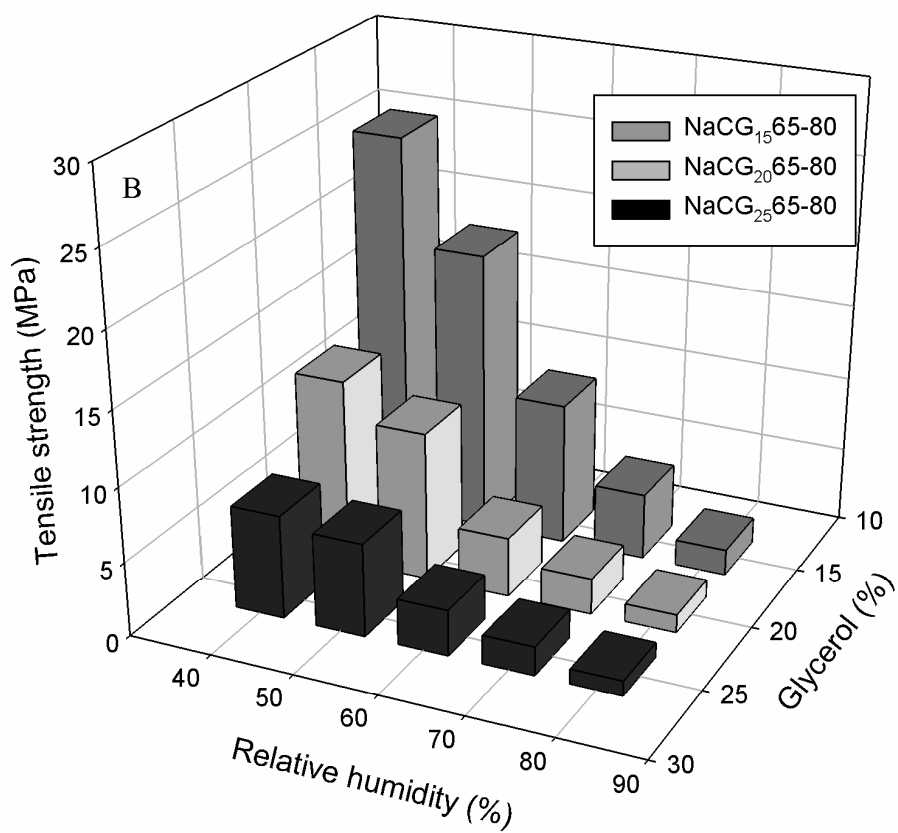
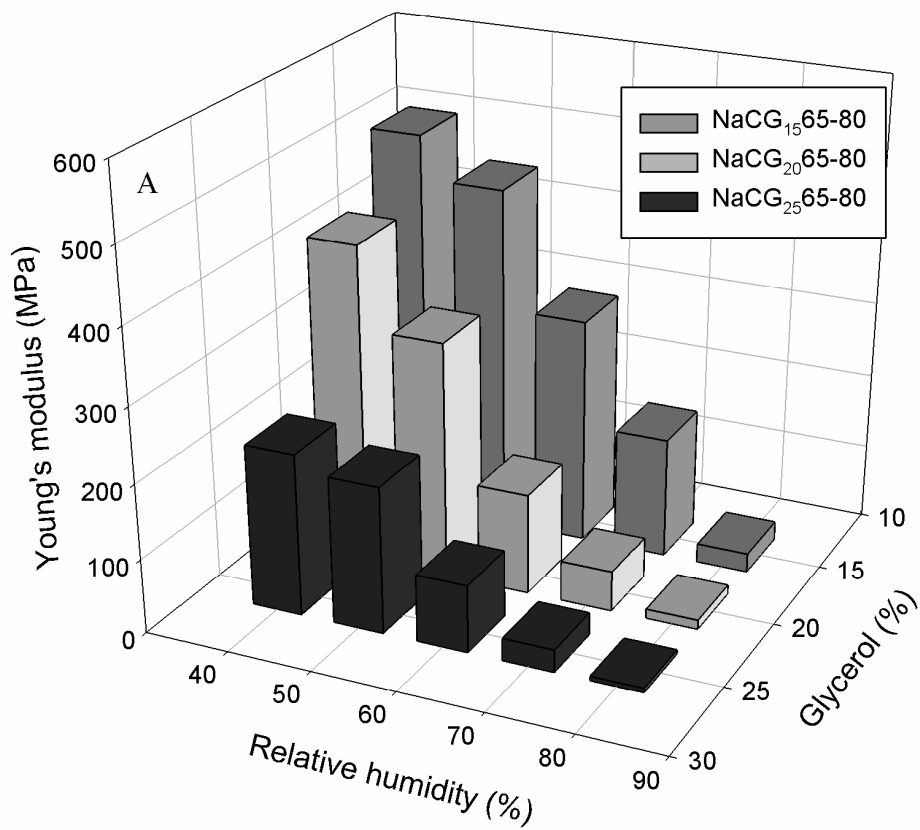
Figure 2 Young's modulus (A), tensile strength (B) and elongation at break (C) of NaC films as a function of processing temperature and moisture content.

The mechanical properties of films made from pellets extruded at 65 or 100°C were significantly similar ($p>0.05$) except for one test condition: At 50% RH (30°C), significant differences were observed ($p<0.05$) for Young's modulus and tensile strength. Films made from pellets extruded at 85°C showed significantly different ($p<0.05$) Young's modulus values compared to others films under two test conditions 40% and 50% RH (30°C) (Figure 2A) whereas the significant difference ($p<0.05$) for tensile strength was observed only at 50% RH (30°C) (Figure 2B). Concerning elongation at break (Figure 2C), only significant differences appeared at 40% and 70% RH. At 40% RH the films made from pellets extruded at 85°C showed higher ($p<0.05$) elongation than other films while at 70% HR films prepared from pellets extruded at 100°C showed a lower ($p<0.05$) deformation capacity than films prepared from pellets extruded at 65°C. These non-homogenous differences are likely due to non-visible defects or fissured edges of films. However, general observation of Figure 2 indicates that extrusion temperature of pellets used to prepare films were far less limiting than the atmosphere humidity on tensile properties of films. Indeed, water sorbed by films acts as a

plasticizer which increases protein chain mobility thanks to intermolecular spacing. That's why tensile properties of such a hydrophilic biopolymer are mainly affected by its surrounding conditions.

Mechanical properties of films containing different glycerol concentrations were also determined under controlled environmental conditions. Figure 3 demonstrates very clearly that increasing the glycerol concentration diminished the Young's modulus and tensile strength whereas it enhanced the elongation capacity. Coupling glycerol content with RH makes plasticizers' (e.g. glycerol and water) role on mechanical properties of films more visible. Moreover it permits having an idea of material's usability in real life conditions. As can be seen in Figure 3, glycerol content becomes more important at low RH conditions for handling properties of thin films. For example, at 40% RH (30°C) films with 15% glycerol were very brittle; Young's modulus (YM)=514 MPa, tensile strength (TS)=26 MPa, whereas films plasticized with 25% glycerol were much more elastic; YM=217MPa TS=7 MPa. For higher RH conditions, this difference becomes less perceivable by simple manipulation due to the plasticization of films by adsorbed water. It will thus be important to find a compromise between, water and glycerol contents of NaC films according to target applications.

For a record, tensile properties of lysozyme-containing films were also measured with the same protocol as previously mentioned. No changes were observed in comparison with control films thus data are not shown. This was totally expected since lysozyme is a protein-based molecule compatible with NaC (Han, 2000) and since its concentration in the formulation of materials was less than 1% (w/w).



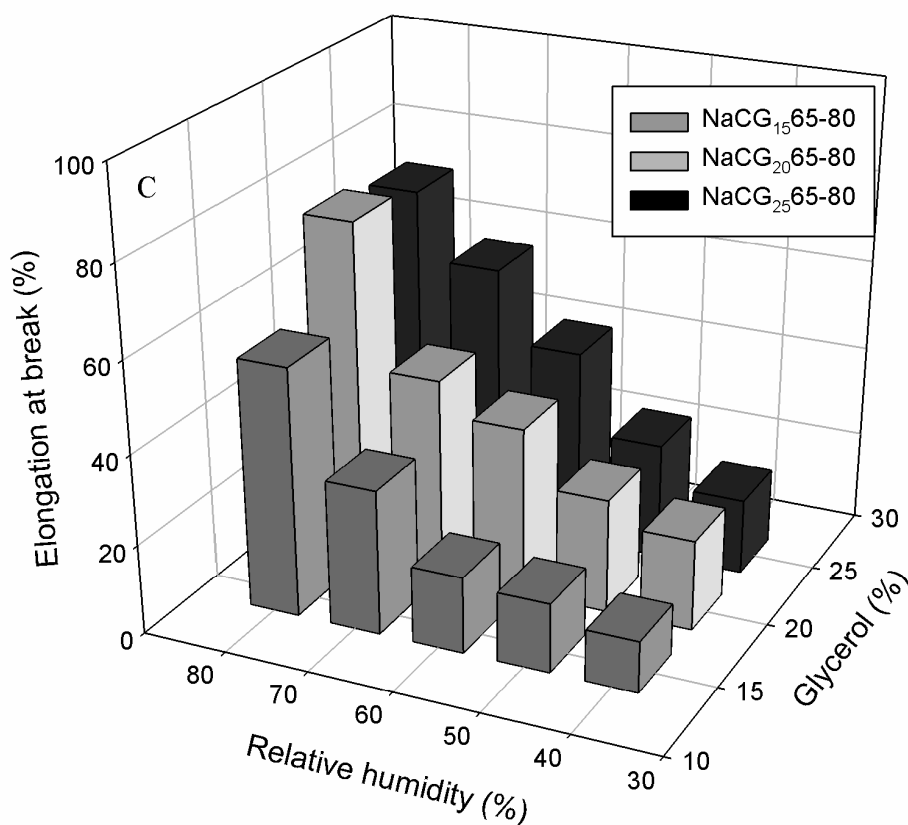


Figure 3: Young's modulus (A), tensile strength (B) and elongation at break (C) of NaC films as a function of moisture and glycerol content.

II.2.4.2. Ultimate aerobic biodegradability

The kinetics of aerobic biodegradation (ISO 14851) of native NaC (control) and NaC-based materials (both pellets and films) with and without lysozyme are presented in figure 4. Although inherently, edible films are biodegradable, their biodegradation kinetics should be determined to assess their suitability to potential non-edible applications. Moreover, very little data are available in the literature on biodegradation of protein based materials. Existing studies are very often performed on starch-based thermoplastics (Jbilou et al., 2013) or synthesized biopolymers such as PLA (Kunioka et al., 2006). Since biodegradability is becoming an important characteristic of commercialized polymer films, it is interesting to determine ultimate biodegradability of polymer-based films. It can be observed on Figure 4 that pellets and films have similar degradation kinetics, while the kinetics of degradation of NaC powder were more rapid during the first 5 days. This difference is linked to the higher solubility and greater contact surface (with micro-organisms and their secreted enzymes) of NaC powder compared to pellets and films. The main conclusion is that the incorporation of

1% of lysozyme in the formulation affected neither the biodegradation kinetics, nor the ultimate biodegradation percentages of active pellets and films. This can be explained by two hypotheses: 1) because all microorganisms present in activated sludge are not sensitive to lysozyme 2) because lysozyme might also be rapidly hydrolyzed into inactive fragments during the aerobic biodegradation assay.

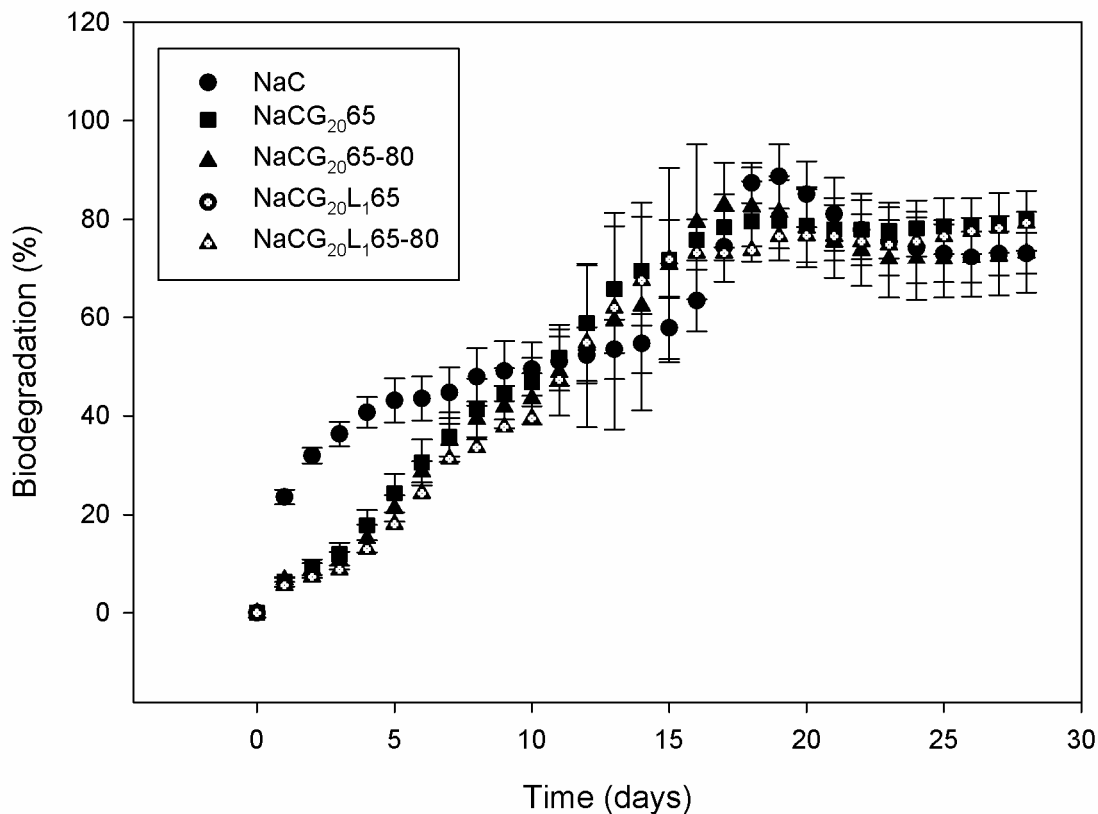


Figure 4: Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability of NaC (control), NaC pellets and NaC films according to ISO 14851 standard using OxiTop® Control measuring system (closed respirometers).

II.3. Conclusion

This study demonstrated for the first time the possibility to obtain active films by blown-film-extrusion of pellets prepared by twin-screw extrusion of sodium caseinate, lysozyme and glycerol. Unlike preparation of active films by solution-casting procedure at lab-scale, extrusion-blowing is the most frequent thermo-mechanical process used by plastic films manufacturers for various application domains including food packaging. The challenge was to define conditions limiting inactivation of lysozyme by temperature and shear stress

prevailing during thermo-mechanical treatments used to prepare pellets and subsequently films. A twin-screw extrusion temperature of 65°C and a glycerol content of 25 or 20% allowed getting films with up to 26.4% of the initial activity of lysozyme. Moreover, it was checked that they effectively inhibited the growth of *M. luteus* even below its minimal inhibitory concentration. It's likely because partially denatured lysozyme while having lost its enzymatic activity may still have an antimicrobial activity, as previously observed by other authors. Interestingly, the enzymatic activity of films was preserved for at least 5 weeks even when stored at room temperature. In order to investigate the application potential of these films, it was also verified that lysozyme neither impaired their biodegradability, nor affected their mechanical properties. The mechanical properties (tensile and handling characteristics) of this hydrophilic polymer were mostly affected by relative humidity in their surrounding atmosphere and could be modulated by the glycerol proportion introduced in their formulation. Further work will concern the development of specific applications of these films such as active food packaging as well as for non-food applications such as films for agricultural uses. The possibilities of scaling-up of their fabrication methods would be a driving force for the commercialization of such active films.

II.4. Acknowledgements

The authors would like to thank “Region Rhône-Alpes” for financing the Ph D thesis of Basak Yilin Colak and “Fonds pour le Développement de la Recherche du technopole Alimentec” for partially funding this project.

II.5. References

- Appendini, P., Hotchkiss, J.H., 1997. Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. *Packaging Technology & Science* 10, 271-279.
- Arcan, I., Yemenicioglu, A., 2013. Development of flexible zein-wax composite and zein-fatty acid blend films for controlled release of lysozyme. *Food Research International* 51, 208-216.
- Arrieta, M.P., Peltzer, M.A., Garrigos, M.D., Jimenez, A., 2013. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering* 114, 486-494.
- Arrieta, M.P., Peltzer, M.A., Lopez, J., Garrigos, M.D., Valente, A.J.M., Jimenez, A., 2014. Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering* 121, 94-101.
- Atares, L., Bonilla, J., Chiralt, A., 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 100, 678-687.
- Belyamani, I., Prochazka, F., Assezat, G., 2014. Production and characterization of sodium caseinate edible films made by blown-film extrusion. *Journal of Food Engineering* 121, 39-47.
- Bourlieu, C., Guillard, V., Valles-Pamies, B., Guilbert, S., Gontard, N., 2009. Edible Moisture Barriers: How to Assess of their Potential and Limits in Food Products Shelf-Life Extension? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 474-499.
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Gregoire, L., Wache, Y., 2010a. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology* 27, 940-944.
- Cao-Hoang, L., Gregoire, L., Chaine, A., Wache, Y., 2010b. Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of *Listeria* development with nisin-incorporated sodium caseinate films. *Food Control* 21, 1227-1233.
- Chen, H., 1995. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science* 78, 2563-2583.
- Colombie, S., Gaunand, A., Lindet, B., 2001. Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 820-826.
- Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S., 1998. Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry* 75, 1-9.
- Debeaufort, F., Jésus-Alberto, Quezada-Gallo, Voilley, A., 2002. Edible films and coatings as aroma barriers, in: Gennadios, A. (Ed.), *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press pp. 579-598.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Buonocore, G.G., Incoronato, A.L., Massaro, A., Panza, O., 2009. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering* 93, 1-6.
- Duan, J., Kim, K., Daeschel, M.A., Zhao, Y., 2008. Storability of antimicrobial chitosan-lysozyme composite coating and film-forming solutions. *Journal of Food Science* 73, M321-M329.
- Duan, J., Park, S.L., Daeschel, M.A., Zhao, Y., 2007. Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* 72, M355-M362.
- Gekko, K., Timasheff, S.N., 1981a. MECHANISM OF PROTEIN STABILIZATION BY GLYCEROL - PREFERENTIAL HYDRATION IN GLYCEROL-WATER MIXTURES. *Biochemistry* 20, 4667-4676.
- Gekko, K., Timasheff, S.N., 1981b. THERMODYNAMIC AND KINETIC EXAMINATION OF PROTEIN STABILIZATION BY GLYCEROL. *Biochemistry* 20, 4677-4686.

- GhattyVenkataKrishna, P.K., Carri, G.A., 2013. The effect of complex solvents on the structure and dynamics of protein solutions: The case of Lysozyme in trehalose/water mixtures. *European Physical Journal E* 36.
- Gontard, N., Guilbert, S., 1996. Bioemballage: technologies et propriétés de matériaux comestible et/ou biodégradable d'origine agricole, in: Mathlouthi, M. (Ed.), *Emballage et conservation des produits alimentaire*. Polytechnica.
- Gucbilmez, C.M., Yemenicioglu, A., Arslanoglu, A., 2007. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International* 40, 80-91.
- Guerrero, P., Beatty, E., Kerry, J.P., de la Caba, K., 2012. Extrusion of soy protein with gelatin and sugars at low moisture content. *Journal of Food Engineering* 110, 53-59.
- Han, J.H., 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technology* 54, 56-65.
- Han, J.H., Gennadios, A., 2005. Edible films and coatings: a review, *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, pp. 239-259.
- Hanani, Z.A.N., Beatty, E., Roos, Y.H., Morris, M.A., Kerry, J.P., 2012. Manufacture and characterization of gelatin films derived from beef, pork and fish sources using twin screw extrusion. *Journal of Food Engineering* 113, 606-614.
- Hernandez-Izquierdo, V.M., Krochta, J.M., 2009. Thermal Transitions and Heat-sealing of Glycerol-plasticized Whey Protein Films. *Packaging Technology and Science* 22, 255-260.
- Ibrahim, H.R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L.R., Kim, M., Yamamoto, T., Sugimoto, Y., Aoki, T., 1996. Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3799-3806.
- Jbilou, F., Joly, C., Galland, S., Belard, L., Desjardin, V., Bayard, R., Dole, P., Degraeve, P., 2013. Biodegradation study of plasticised corn flour/poly(butylene succinate-co-butylene adipate) blends. *Polymer Testing* 32, 1565-1575.
- Jerez, A., Partal, P., Martinez, I., Gallegos, C., Guerrero, A., 2005. Rheology and processing of gluten based bioplastics. *Biochemical Engineering Journal* 26, 131-138.
- Jerez, A., Partal, P., Martinez, I., Gallegos, C., Guerrero, A., 2007a. Egg white-based bioplastics developed by thermomechanical processing. *Journal of Food Engineering* 82, 608-617.
- Jerez, A., Partal, P., Martinez, I., Gallegos, C., Guerrero, A., 2007b. Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing. *Rheologica Acta* 46, 711-720.
- Jose Fabra, M., Sanchez-Gonzalez, L., Chiralt, A., 2014. Lysozyme release from isolate pea protein and starch based films and their antimicrobial properties. *Lwt-Food Science and Technology* 55, 22-26.
- Krochta, J.M., 2002. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities, *Protein-based films and coatings*, pp. 1-41.
- Krochta, J.M., De Mulder-Johnston, C., 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology* 51, 61-74.
- Kunioka, M., Ninomiya, F., Funabashi, M., 2006. Biodegradation of poly(lactic acid) powders proposed as the reference test materials for the international standard of biodegradation evaluation methods. *Polymer Degradation and Stability* 91, 1919-1928.
- Makki, F., Durance, T.D., 1996. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. *Food Research International* 29, 635-645.

- Martinez, I., Partal, P., Garcia-Morales, M., Guerrero, A., Gallegos, C., 2013. Development of protein-based bioplastics with antimicrobial activity by thermo-mechanical processing. *Journal of Food Engineering* 117, 247-254.
- Mecitoglu, C., Yemencioğlu, A., Arslanoglu, A., Elmaci, Z.S., Korel, F., Cetin, A.E., 2006. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International* 39, 12-21.
- Mendes de Souza, P., Fernandez, A., Lopez-Carballo, G., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P., 2010. Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloids* 24, 300-306.
- Mine, Y., Ma, F.P., Lauriau, S., 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1088-1094.
- Nam, S., Scanlon, M.G., Han, J.H., Izydorczyk, M.S., 2007. Extrusion of pea starch containing lysozyme and determination of antimicrobial activity. *Journal of Food Science* 72, E477-E484.
- Park, S.I., Daeschel, M.A., Zhao, Y., 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science* 69, M215-M221.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klauser, S., vonFellenberg, R., 1997. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J. Appl. Microbiol.* 82, 372-378.
- Pochat-Bohatier, C., Sanchez, J., Gontard, N., 2006. Influence of relative humidity on carbon dioxide sorption in wheat gluten films. *Journal of Food Engineering* 77, 983-991.
- Pommet, M., Redl, A., Guilbert, S., Morel, M.H., 2005. Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials. *Journal of Cereal Science* 42, 81-91.
- Romeo, G., 2012. Thermal motions quantification of lysozyme in aqueous mixtures with different co-solvent: glycerol C₃H₅(OH)₃, trehalose C₁₂H₂₂O₁₁, sucrose C₁₂H₂₂O₁₁, and a chaotropic agent CO(NH₂)₂ by osiris near-backscattering crystal analyser spectrometer. *Applied Physics a-Materials Science & Processing* 106, 893-900.
- Shugar, D., 1952. THE MEASUREMENT OF LYSOZYME ACTIVITY AND THE ULTRA-VIOLET INACTIVATION OF LYSOZYME. *Biochimica Et Biophysica Acta* 8, 302-309.
- Timasheff, S.N., Arakawa, T., Inoue, H., Gekko, K., Gorbunoff, M.J., Lee, J.C., Na, G.C., Pittz, E.P., Prakash, V., 1981. THE ROLE OF SOLVATION IN PROTEIN-STRUCTURE STABILIZATION AND UNFOLDING. *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 362, 1196-1196.
- Ture, H., Gallstedt, M., Hedenqvist, M.S., 2012. Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate. *Food Research International* 45, 109-115.
- Unalan, I.U., Korel, F., Yemencioğlu, A., 2011. Active packaging of ground beef patties by edible zein films incorporated with partially purified lysozyme and Na₂EDTA. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 1289-1295.
- VM Hernandez-Izquierdo, J.K., 2008. Thermoplastic processing of proteins for film formation-A review. *Journal of Food Science*.
- Yuceer, M., Caner, C., 2014. Antimicrobial lysozyme-chitosan coatings affect functional properties and shelf life of chicken eggs during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 153-162.
- Zhang, J., Mungara, P., Jane, J., 2001. Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer* 42, 2569-2578.

II.6. Abstract

Sodium caseinate-based edible/biodegradable films containing lysozyme were prepared directly by extrusion processes to obtain antimicrobial films. Thermoplastic pellets containing 1% (w/w) lysozyme were blown by an industrial-like blown-film-extruder to obtain marketable thermoplastic thin films. Lysozyme stability depended mainly on processing temperature and glycerol content. A correct choice of these parameters allowed obtaining pellets and films with $40.8\pm 0.5\%$ and $26.4\pm 0.6\%$ residual activity, respectively. Whatever the storage temperature (-20°C or room temperature), lysozyme activity of pellets remained constant for at least 5 weeks of storage. Antimicrobial activity against *Micrococcus luteus* was assayed in Tryptone Soya Broth (TSB): no bacterial growth was observed in the presence of $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ pellets containing lysozyme, while a 2.4 log increase of bacterial population was observed for control pellets within 25 h at 37°C . Traditional properties of films such as their water sorption and mechanical properties were also investigated and proved that addition of lysozyme at a 1% concentration did not affect these properties as well as their ultimate aerobic biodegradability. The application potential of such edible antimicrobial films is discussed in relation with these properties.

Keywords: lysozyme stability, edible films, extrusion, sodium caseinate, active packaging

CHAPITRE III:

ANTIMICROBIAL EFFICACY OF NISIN AND NATAMYCIN FROM SODIUM CASEINATE EXTRUSION-BLOWN FILMS: A COMPARATIVE STUDY WITH HEAT-PRESSED/SOLUTION CAST FILMS.

Basak Yilin COLAK^{a,b,c,d}, Pierre PEYNICHOU^d, Sophie GALLAND^d, Nadia OULAHAL^d,
Frédéric PROCHAZKA^{a,b,c}, Pascal DEGRAEVE^{d,*}

^aUniversité de Lyon, F-69003, France

^bCNRS, UMR 5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, France

^cUniversité de Saint-Etienne, F-42023, Saint-Etienne, France

^dUniversité de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 - ISARA Lyon, Laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA, EA n°3733), IUT Lyon 1 site de Bourg en Bresse, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France

Chapitre III: Antimicrobial efficacy of nisin and natamycin from sodium caseinate extrusion-blown films: A comparative study with heat-pressed/solution cast films

Ce troisième chapitre est également présenté sous la forme d'une publication. Cet article est destiné à être soumis dans la revue : Journal of Food Engineering.

Ce chapitre se focalise principalement sur la fonctionnalisation des films comestibles de caséinate de sodium thermoplastique par deux agents actifs antimicrobiens avec un statut réglementaire de conservateur : une bactériocine (la nisine) et un antibiotique (la natamycine). Le but est de caractériser l'activité antimicrobienne et les propriétés optiques (la couleur et la transparence) de ces films actifs et thermoplastiques. Dans le deuxième chapitre de cette thèse, il a été démontré qu'un choix judicieux des températures d'extrusion et du taux de glycérol employé permettait de préserver une activité enzymatique résiduelle significative du lysozyme après deux extrusions successives. Les paramètres déterminés pour le lysozyme ont donc été utilisés pour ces nouveaux actifs.

La partie introductive présente les deux agents actifs employés dans ce chapitre (la nisine et la natamycine) et le verrou technologique que peut constituer le maintien de leur activité malgré leur thermostabilité limitée. En effet, l'extrusion est un procédé qui expose la matière durant sa transformation à la chaleur et aux cisaillements. Ces paramètres constituent alors des contraintes à surmonter lorsqu'il s'agit d'obtenir des matériaux antimicrobiens contenant des conservateurs naturels de nature thermosensible.

Une partie « Matériel et méthodes » suit l'introduction pour décrire les protocoles de fabrications et de mesures utilisés pour réaliser cette étude. En plus des films obtenus par extrusion-gonflage, les films préparés par compression et par voie solvant sont également étudiés pour comparer les impacts de chacun de ces procédés sur l'activité antimicrobienne des films obtenus.

Dans la partie « Résultats et discussions », les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des agents actifs sur les souches de micro-organismes cibles sont présentées. Ensuite, l'activité antimicrobienne des granulés et des films contenant la nisine ou la natamycine est présentée. Enfin, les propriétés optiques des films thermoplastiques gonflés sont étudiées en

fonction de la présence ou de l'absence des agents antimicrobiens. Les principales conclusions tirées de ce travail sont :

- Les granulés et les films contenant de la nisine gardent malgré la transformation thermomécanique une activité suffisamment élevée permettant un effet bactériostatique contre les souches de *Listeria innocua* et un effet bactéricide contre les souches de *Kocuria rhizophila*.
- La température de transformation des matériaux employée n'excédant pas 80°C est avantageuse car l'activité antimicrobienne de la nisine dans les films thermoformés par compression baisse grandement pour des températures supérieures à 110°C.
- Les films thermoplastiques contenant de la natamycine ont présenté une activité antifongique contre les spores d'*Aspergillus niger*. Les films préparés avec une presse chauffante ont cependant présenté des diamètres de zone d'inhibition plus importants que les films gonflés.
- Les propriétés optiques des films gonflés à base de caséinate de sodium sont influencées par l'ajout des agents antimicrobiens malgré leurs faibles concentrations (4% (w/w) de Nisaplin®, 1% (w/w) de lysozyme). L'incorporation de la natamycine ou dans une moindre mesure de la nisine donne des films plus opaques et plus jaunemarron. Pour les films contenant de la natamycine, cela est probablement à relier à la présence de lactose (un sucre réducteur) dans la préparation commerciale de natamycine qui entraîne une réaction de Maillard avec les caséinates.

III.1. Introduction

An antimicrobial food packaging system is a film-forming polymeric matrix incorporating antimicrobial compounds inhibiting growth of undesirable microorganisms in food during its post-process life. The advantages of these innovative packaging systems over the incorporation of antimicrobial compounds directly in food matrix are numerous. First, the antimicrobial packages can provide a long-term protection by increased stability of active agents and their slowed-down release (Cao-Hoang et al., 2010; Guiga et al., 2010; Hoffman et al., 2001). As a consequence, the agent would not be a direct additive to the food product. Secondly, only the necessary amount of bacteriocin is used in packaging systems. And finally, if the plastic material is made from an edible and/or biodegradable polymer, this would not result in environmental drawbacks (Krochta, 2002).

Nisin is the only bacteriocin with a food preservative status (labeled as E 234) in the European Union. It is also a preservative authorized for certain applications by Food and Drug Administration in the U.S.A. This cationic peptide produced by numerous strains of *Lactococcus lactis spp lactis* inhibits the germination of a wide-range of spores and is efficient against Gram-positive vegetative bacteria like *Listeria*. Its antimicrobial activity is attributed to electrostatic interactions with phospholipids of bacterial cell membrane disturbing normal membrane function thus leading to cell death (Juneja et al., 2012). Nisin has been widely studied by numerous authors due to its conformity to food safety regulations, its commercial availability and its relative heat-stability. Its release from coatings or free-standing films (generally prepared by the solution casting technique) (Bastarrachea et al., 2010; Chollet et al., 2009; Guiga et al., 2010; Rossi-Marquez et al., 2009) as well as the various factors influencing its antimicrobial effectiveness notably ; its adsorption on food components (Aasen et al., 2003; Chollet et al., 2008; Lakamraju et al., 1996), pH (Sanjurjo et al., 2006) or filmforming methods (Cha et al., 2003; Dawson et al., 2003) were documented in the literature. Natamycin is a polyene natural antimycotic with a wide range of antimicrobial spectrum against yeasts and moulds (Pintado et al., 2010). As nisin, natamycin (E 235) also is approved for the preservation of certain foods in many countries worldwide, including the European Union member states and the U.S.A.. Natamycin suspensions are commonly sprayed on the surface of some hard-type cheeses to prevent mould growth on their surface, since natamycin is not disturbing bacterial fermentation process (Hondrodimou et al., 2011). Thus, numerous authors have prepared coatings or solution-cast films including natamycin in order to prevent the growth of moulds on the surface of these cheeses during their ripening or their

storage before consumption (Fajardo et al., 2010; Hanusova et al., 2010; Ture et al., 2008). Although extensive studies have been reported on addition of these antimicrobial compounds in packaging systems, these studies mainly concern coatings (applied on food or plastic films by adsorption) or solution-cast films. There are very few authors who studied thermoplastic packaging systems into which antimicrobial agents were directly incorporated. Siragusa *et al.* (1999) studied Low-Density Polyethylene (LDPE)/nisin-based materials obtained by single screw extrusion; Cha *et al.* (2003) studied Polyethylene (PE), MethylCellulose (MC), HydroxyPropylMethylCellulose (HPMC) and κ -carrageenan heat-pressed films incorporated with nisin, finally Dawson *et al.* (2003) studied corn-zein and wheat-gluten-based heat-pressed films incorporated with nisin. Concerning natamycin, to our knowledge, no study in non-aqueous thermoplastic systems has been published to date.

The objective and the originality of the present work are proposing a conventional plastic film production technology for edible antimicrobial films production. Therefore, twin-screw extrusion and blown-film extrusion processes were used for preparation of antimicrobial sodium caseinate films incorporated either with nisin, or with natamycin. Usually, these transformation processes are well adapted to petro-chemical plastics but the principal drawback is that their transformation temperatures are generally too high to preserve the antimicrobial activity of compounds such as nisin or natamycin. Such antimicrobial compounds generally cannot be heated at temperatures exceeding 150°C. Above this temperature, chemical reactions and/or denaturation of their native conformation lead to an irreversible loss of their antimicrobial activity (Lee, 2005). In this context, the relatively low extrusion temperature of sodium caseinate (<80°C) and its suitability to extrusion processes due to its film-forming properties might thus be advantageous and open the possibility to obtain active nisin- or natamycin-containing edible films at a relatively low cost. In order to check whether nisin- or natamycin-incorporated films prepared by twin-screw extrusion followed by blown film extrusion still contained a significant proportion of active nisin or natamycin, their antimicrobial activity was compared to that of films prepared either by solution casting technique, or by heat-press.

III.2. Materials and methods

III.2.1. Materials

Sodium caseinate native powder was purchased from EPI Ingredients(Ancenis, France). Nisaplin® (a 2.5 % (w/w) commercial preparation of nisin) and glycerol were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Natamax® (a 50% (w/w) preparation of natamycin) was a generous gift from DuPont Danisco France (Paris, France).Nisaplin® and Natamax® were used without any further purification.

III.2.2. Preparation of films

III.2.2.1. Extrusion blown films

Sodium caseinate control pellets and films were prepared as described previously by Belyamani *et al.*(2014). For the elaboration of antimicrobial pellets, a preliminary mixture of sodium caseinate powder with either 4% (w/w) Nisaplin® (corresponding thus to 0.1% (w/w) nisin), or 1% (w/w) Natamax® (corresponding thus to 0.5% (w/w) natamycin)was prepared. (Eq.1)

The powder mixtures containing either nisin, or natamycin were introduced in twin-screw extruder by exactly the same way as sodium caseinate powder for the preparation of control pellets. Nisin- or natamycin-containing pellets were then used to produce antimicrobial films by blown-film extrusion. Residence times of twin-screw extrusion and blown-film extrusion processes were 2.5 and 7 min, respectively. Maximal processing temperatures were 65°C for twin-screw extrusion and 80°C for blown-film extrusion.

Glycerol and water were used as plasticizer agents; glycerol rate was evaluated according to following equation:

$$\% \textit{ glycerol} = \frac{\textit{ weight}_{\textit{ glycerol}}}{\textit{ weight}_{\textit{ glycerol}} + \textit{ weight}_{\textit{ sodtuncaseinate}} + \textit{ activeagent}} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

III.2.2.2. Heat-pressed films

These films were obtained by pressing sodium caseinate pellets with a manual hydraulic press (Specac Ltd, Slough, England). Pellets were placed in pellet-press-dies to obtain desired thicknesses (50µm) and pressed for 7 min at temperatures ranging from 70°C to 140°C, at 500 bar.

III.2.2.3. Solution casting films

Film-forming solutions were prepared by suspending 15% (w/v) of sodium caseinate powder in deionized water under magnetic stirring. 4% (w/w) of Nisaplin[®] nisin preparation (unless for control film), and 20% (w/w) of glycerol as plasticizer were added to each film solution. Additive rates were calculated by the same equation as mentioned for blown films. Resulting dispersions were kept under continuous agitation for 2h. After degassing in a vacuum oven, the film dispersions were casted on a polystyrene plate and dried overnight at room temperature.

All films were stored in an environmental chamber at 30°C and 50% relative humidity (RH) until further testing. The film thicknesses were measured with a micrometer (Elcometer Limited, Manchester, United Kingdom).

III.2.3. Antimicrobial activity

III.2.3.1. Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) of natamycin was determined against *Aspergillus niger*. Natamax[®] powder was dissolved at different concentrations in a methanol: water solution prepared with a ratio of 2:1(v: v). 1 mL of each natamycin solution was mixed with 19 mL of super cooled potato dextrose agar (PDA). The PDA media with different natamycin concentrations were then poured in Petri dishes and cooled. Plates covered with aluminum foil were stored overnight at 4°C to ensure a good diffusion of antifungal agent into the agar. *Aspergillus niger* spores obtained after 7 days of incubation were diluted to obtain 10^5 spores.mL⁻¹ in distilled water containing 0.05% of Tween[®] 80. 10 µL samples with a natamycin concentration ranging from 0 to 150 µg.mL⁻¹ were plated in Petri dishes. The minimum antifungal concentration at which no growth occurred was defined as the MIC.

MIC of nisin against *Listeria innocua* and *Kocuria rhizophila* were defined by previous laboratory studies.

III.2.3.2. Culturable cells counting

Antimicrobial activity of nisin- containing pellets was evaluated by enumeration of culturable cells. Pellets pre-conditioned at 30°C in a 50% RH atmosphere were dissolved in flasks containing 25 mL of TrypticSoy Broth (TSB) to a final concentration of 0.018, 0.055, or 0.090

g.mL⁻¹. Overnight cultures of target microorganisms, *Kocuriarhizophila* ATCC9341, *Listeria innocua* LRGIA01 and *Listeria innocua* ATCC33090, prepared in TSB at 30°C were used to seed TSB liquid medium containing dissolved active pellets. 2.5 mL of inoculum was added in each flask to obtain 10% (v/v) of bacterial load (i.e. 10⁵ CFU (colony forming units)mL⁻¹ TSB). Samplings after 0, 1, 3, 5, and 8h incubation at 30°C were plated (0.01 mL per plate – minimum in triplicate) onto TrypticSoy Agar (TSA). The plates were then incubated at 30°C. Enumeration of colonies was performed with an electronic colony counter (Colony counter 560, Suntex Instruments Co.,New Taipei, Taiwan).Results were expressed as log₁₀ CFU.mL⁻¹.

III.2.3.3. Agar diffusion assay

Antimicrobial activity of nisin- or natamycin-containing films was assessed by agar diffusion assay. An adapted method was used depending on incorporated active agent.

III.2.3.3.1. Nisin-containing films

While the antimicrobial activity assays of sodium caseinate pellets were performed following their dissolution in liquid medium, those of films were evaluated in Petri dishes by measuring inhibition zone diameters surrounding films. TSA media were thus seeded at 50°C (i. e. in a molten state)by *K.rhizophila* or *L.innocua* cultures prepared in TSB medium (10⁵ CFU.mL⁻¹ TSB). Bacterial load was fixed to 5% (v/v). Inoculated TSA media were poured in Petri dishes (100mL/Petri dish) and cooled. Preconditioned (50% RH, 30°C) sodium caseinate films were cut in 8 mm diameter discs with the help of a punch die. The films were then placed on the surface of inoculated TSA. Plates were then stored at 4°C for 3 h to ensure the diffusion of nisin from films to the agar media before any bacterial growth occurs. Finally, the Petri dishes had been incubated overnight at 30°C. Inhibition zone diameters were measured after 24h of incubation by an electronic zone reader (Haloes Caliper, IUL Instruments S.A., Barcelona, Spain).

III.2.3.3.2. Natamycin-containing films

Antifungal activity of natamycin-containing films was evaluated on *Aspergillus niger* strain cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) and diluted in TrypticSoy Broth (TSB). A semi-agar growth medium prepared by mixing TSB and PDA media to 1:1 ratio (w: w) was inoculated at 50°C (i.e. in a molten state). 1 mL of *A.niger* (10⁵ spores.mL⁻¹ TSB) suspension was used to

seed 6 mL of semi-agar. Inoculated medium was poured for 3 mm of height into Petri dishes and cooled at 4 °C. Preconditioned (50% RH, 30°C) films (d=8 mm), with or without natamycin, were disposed onto cooled semi-agar (one film per plate). Finally, films were covered by a second semi-agar growth medium layer identical to the first one (Fig.1). Plates were stored at 4°C for 3 h and inhibition zone diameters were measured after 24 h incubation at 30°C, as described previously.

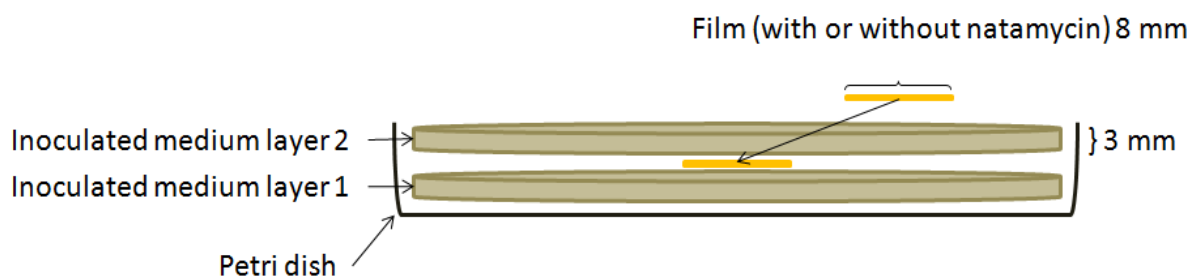


Figure 1 : Schematic representation of antifungal activity assay of natamycin-containing films on semi-agar plates inoculated by *A.niger*

III.2.4. Optical properties of films

III.2.4.1. Light transmission and film transparency

Light transmission of films was measured in the range of 200-800 nm wavelengths using an UV-VIS spectrophotometer (Cary 100 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The films were cut into 4x1 cm samples and fixed on a quartz cuvette. The quartz cuvette without film was used as control. The relative transparency of films was calculated at 600 nm according to following equation(Han and Floros, 1997):

$$\text{Transparency} = A_{600}/\delta \text{ (Eq. 2)}$$

where, A_{600} and δ stand for the absorbance at 600 nm and for the width of each film, respectively. Films were conditioned in an environmental chamber at 50%RH and 30°C prior to testing.

III.2.4.2. Color

The film color was measured using a portable colorimeter (Chroma meter CR 221, Minolta, JAPAN) under daylight. A CIELab color scale was used to determine the lightness (L) and

color coordinates a , b corresponding to red-green and yellow-blue color scales, respectively. Tests were carried out on the surface of a white standard plate which was used as a control. The color of films was expressed as the total difference in color (ΔE) and was calculated according to (Ramos et al., 2012):

$$\Delta E = [(L_{film} - L_{standard})^2 + (a_{film} - a_{standard})^2 + (b_{film} - b_{standard})^2]^{1/2} \text{ (Eq. 3)}$$

Each test film was analyzed in triplicate and each film sample was analyzed at 5 different points.

III.3. Results and discussion

III.3.1. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of nisin and natamycin

Minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents determined for each target microorganism are presented in table 1. Nisin, three Gram-positive bacterial strains, *L.innocua*LRGIA01, *L.innocua* ATCC33090 and *K.rhizophila*ATCC9341, were chosen while natamycin was tested only against a fungus, *A.niger*. MIC of nisin depended on the target bacterial strain. As expected, the two *L.innocua* strains were far less sensitive to nisin (MIC: 60 mg.L⁻¹) than *K.rhizophila* (MIC: 5 mg.L⁻¹) which is one of the most sensitive bacterial species to nisin. MIC of natamycin against *A.niger* was 2.25 mg.L⁻¹.

Table 1 : Minimal inhibitory concentrations (MIC, g.L-1) of antimicrobial agents against sensitive microorganisms.

| Antimicrobial agent | Minimum inhibitory concentration (mg.L ⁻¹) | | | |
|---------------------|--|----------------------------|------------------------------|----------------|
| | <i>L.innocua</i> LRGIA01 | <i>L.innocua</i> ATCC33090 | <i>K.rhizophila</i> ATCC9341 | <i>A.niger</i> |
| Nisin | 60 | 60 | 5 | - |
| Natamycin | - | - | - | 2.25 |

⁽⁻⁾ not determined.

Comparing obtained MICs with those mentioned in the literature, Karam *et al.*(2013) reported the MIC of nisin against *L.innocua* as 7.8 mg.L⁻¹. This value is much lower than our finding. Concerning natamycin MIC against *A.niger*, Fajardo *et al.*(2010) found a higher MIC than that obtained in the present study. Besides they determined the MIC directly on a seeded food

surface. Determination of nisin and natamycin MICs was useful for further antimicrobial activity assays of the nisin- or natamycin-containing pellets or films. It allowed defining minimal theoretical concentrations of active pellets and films that can inhibit related strains' microbial growth in a liquid medium. Since the materials are soluble in water, active agent incorporated materials could be dissolved in a liquid broth. In this case, the final concentration of nisin or natamycin liberated from the materials into the broth had to be in the same order of magnitude with the corresponding MIC value.

III.3.2. Antimicrobial activity of nisin- or natamycin-containing pellets and films

Preparation of nisin- or natamycin-containing sodium caseinate films by conventional thermoplastic processing methods included two steps: first, pellets were prepared by twin-screw extrusion at 65°C (compounding step), and then films were obtained by extrusion-blowing at 80°C of these pellets. Temperature and shear stress prevailing during these thermomechanical treatments might induce the irreversible inactivation of antimicrobial agents such as nisin and natamycin. Therefore, the antimicrobial activity of nisin-containing pellets and films was assayed following their fabrication process.

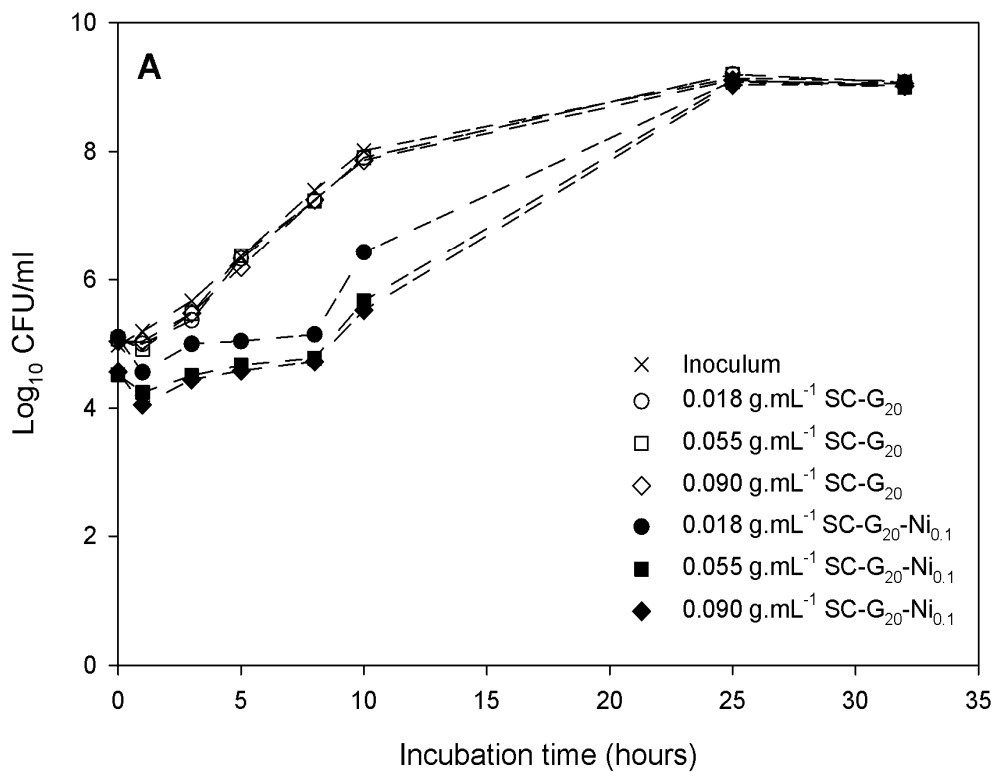
III.3.2.1. Antimicrobial activity of nisin-containing pellets and films

III.3.2.1.1. Antimicrobial activity of nisin-containing pellets

Sodium caseinate pellets plasticized with 20% (w/w) glycerol and incorporated with 0.1 g nisin *per* 100 g sodium caseinate (SC-G₂₀-Ni_{0.1}) or not (SC-G₂₀, controls) were dissolved at different concentrations ranging from 18 to 90 g.L⁻¹ in TSB. The broth was then inoculated with 10⁵ cfu.mL⁻¹ *L.innocua* LRGIA01 cells. The growth at 30°C of *L.innocua* LRGIA01 was monitored for 24 h (Figure 2A).

It was first verified that the dissolution of pellets without nisin in TSB, neither inhibited, nor activated the growth of *L.innocua* LRGIA01, unlike pellets with nisin which significantly inhibited its growth. The inhibition of *L.innocua* growth by nisin-containing dissolved pellets could thus unambiguously be attributed to the presence of nisin. Nisin concentration in TSB was between 14.4 and 72 mg.L⁻¹ depending on the dissolved active pellet concentration. Since the MIC against *L.innocua* LRGIA01 of nisin was 60 mg.L⁻¹ and the significant inhibition of the bacterium stain occurred even by the lowest nisin-containing pellet quantity

(corresponding to $14.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nisin concentration), this strongly suggests that a significant proportion of nisin initially incorporated in pellets was still active following extrusion. Liu *et al.* (2009) reported that co-extrusion of PLA and nisin at 160°C resulted in total inactivation of nisin, while co-extrusion in the presence of plasticizers allowing a reduction of extrusion temperature to 120°C allowed limiting nisin inactivation. The fact is that extrusion of sodium caseinate, glycerol, and nisin at only 65°C permitted a significant conservation of nisin activity.



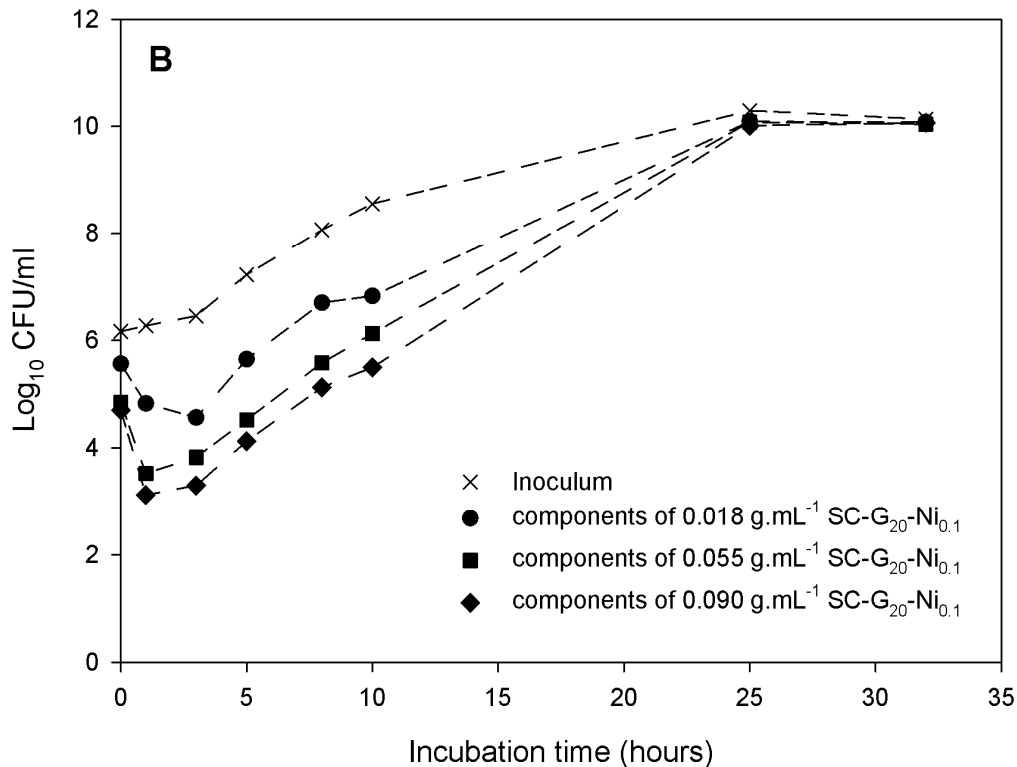


Figure 2 : (A) *L. innocua* LRGIA 01 growth curve (30°C) in the presence of pellets with (SC-G20-Ni0.1) or without nisin(SC-G20, control) at different concentrations(B) *L. innocua* LRGIA 01 growth curve (30°C) in the presence of nisin-containing pellets components at different concentrations.

In order to estimate the potential influence of extrusion on nisin inactivation, a control test was performed. The components of active pellets: native sodium caseinate, glycerol, and nisin were dissolved separately in TSB in the same proportions found in pellets. Then, the broth was inoculated by *L. innocua* LRGIA01 and the bacterial growth at 30°C was monitored for 24 h (Fig. 2B). As it can be observed in figure 2B, whatever the tested concentration, the decrease of *L. innocua*LRGIA01 population in the 3 h following inoculation was always higher than that observed in Figure 2A. This clearly indicates that the extrusion step which is necessary to prepare pellets, partially inactivated nisin. Figures 2A and 2B also reveal that a stabilization or reduction of *L. innocua* population was observed during the first 8 h following the inoculation. After 24 h incubation at 30°C, the *L. innocua* population did not differ from that in the absence of nisin. This transitory bactericidal effect of nisin followed by a regrowth of *L. innocua*LRGIA01 has already been reported by several authors studying the effect of nisin on *L. monocytogenes* in laboratory media (Bouttefroy and Milliere, 2000; Davies et al., 1997). This regrowth could be due to a too low nisin concentration to kill all *Listeria* cells or

to the emergence of nisin-resistant cells. In order to assess the first hypothesis, the same quantities of sodium caseinate pellets plasticized with 20% (w/w) glycerol with or without nisin were dissolved in TSB. This time, the broth was seeded with 10^5 CFU.mL⁻¹ of *K.rhizophila* ATCC9341. The growth at 30°C of *K.rhizophila* was then monitored for 32 h (Figure 3).

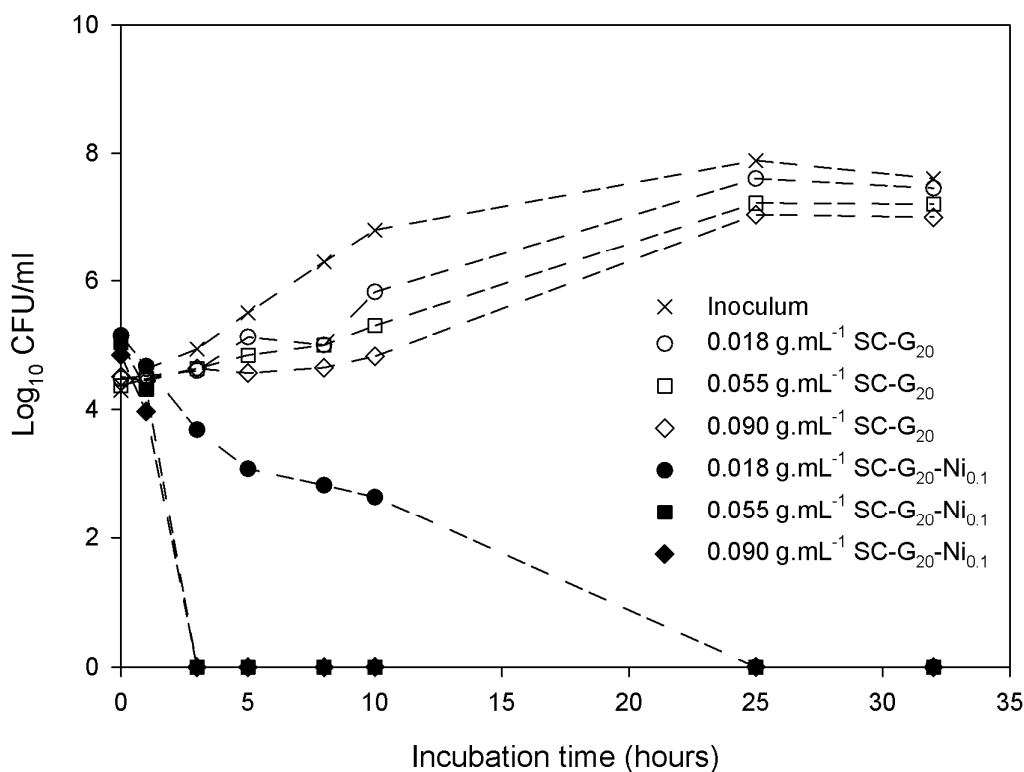


Figure 3 : *K.rhizophila* ATCC9341 growth curve (30°C) in the presence of pellets with (SC-G20-Ni0.1) or without nisin (SC-G20, control).

Unlike with *L.innocua* LRGIA01, increasing concentration of sodium caseinate pellets without nisin (control) slightly slowed down *K.rhizophila* growth. Dissolution of nisin-containing pellets in TSB resulted in a rapid decrease of *K.rhizophila* population. After 32 h, no more *K.rhizophila* cells could be enumerated suggesting a bactericidal effect of nisin. This bactericidal effect is consistent with the fact that the final concentrations of nisin in TSB varying from 14.4 to 72 mg.L⁻¹ were higher than MIC against *K.rhizophila* ATCC9341 (nisin MIC = 5 mg.L⁻¹). Even if it is considered that nisin was partially inactivated following extrusion, residual active nisin concentrations were sufficient enough to inhibit completely *K.rhizophila*, while this was not the case with *L.innocua* LRGIA01 (nisin MIC = 60 mg.L⁻¹). This experiment substantiates thus the hypothesis that a *L.innocua* LRGIA01 regrowth was

likely observed because active nisin concentration was too low to kill all *L.innocua* cells. Observation of Figure 3 also reveals that decimal reduction kinetics of *K.rhizophila* population was rapider when 55 or 90 gL⁻¹ of nisin-containing pellets were dissolved in TSB than when 18 g.L⁻¹ of nisin-containing pellets were dissolved: 3 or 25 h incubation at 30°C were needed before no more *K.rhizophila* cells could be enumerated, respectively.

III.3.2.1.2. Antimicrobial activity of nisin-containing films

Antimicrobial activity of nisin-containing films was evaluated by agar diffusion test. Films with or without nisin (controls) were assayed. Moreover, the antimicrobial activity of cast films, heat-pressed films, and extruded-blown films with the same sodium caseinate, glycerol and nisin contents were compared (Figure 4).Corresponding inhibition zone diameters were measured after 24 h incubation (Table 2).

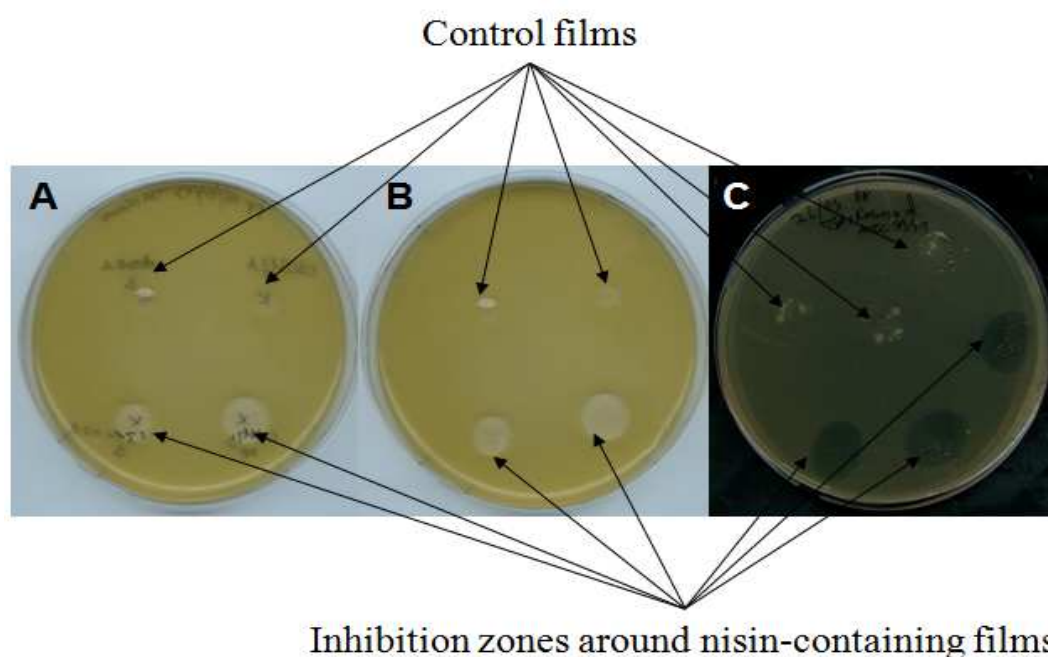


Figure 4 : Petri dishes demonstrating *K.rhizophila* ATCC9341 growth inhibition zones around nisin-containing blown (A), pressed (B), and cast films (C). Each plate contains nisin-containing films and nisin-free (control) films.

Table 2 : Comparison of *K. rhizophila* ATCC 9341 growth inhibition zone diameters around nisin-containing films prepared by blown-film extrusion, solution casting and heat-press (80°C for 7 min), and corresponding films without nisin (controls). All films had a 50.00±0.02 µm thickness) (formulation of films without nisin: 80%(w/w) sodium caseinate, 20%(w/w) glycerol, formulation of nisin-containing films: 76%(w/w) sodium caseinate, 4% (w/w) Nisaplin®, and 20% (w/w) glycerol) (Film diameters are subtracted from total inhibition zone diameters).

| <i>K. rhizophila</i> ATCC 9341 inhibition zone diameter after 24 h incubation at 30°C | | |
|--|-------------------------|-----------------------|
| | without nisin (control) | with nisin |
| Cast films | 0.0 | 15.5±0.9 ^b |
| Heat-pressed films (7 min, 80°C) | 0.0 | 8.6±1.0 ^a |
| Extruded-blown films (7 min, 80°C) | 0.0 | 9.8±0.2 ^a |

^{a,b}Means within the same column, labeled with the same letter, do not statistically differ from each other (p>0.05).

It was first verified that regardless their preparation procedure (solution casting, with a heat press or extrusion-blowing), no *K.rhizophila* growth inhibition zone was observed around control films. Moreover, it was detected that *K.rhizophila* colonized the agar contact surface of the nisin-free films (d=8mm), while this was not the case for nisin-containing films regardless the film making process (Figure 4). Since all films were water-soluble, once placed on Petri dishes, they were dissolved in TSA medium. This suggests that following the film dissolution, active nisin was present at a sufficient concentration to inhibit *K.rhizophila* ATCC9341 growth for 24 h. On the other hand, the diameter of inhibition zone measured after 24 h depended on the nisin-containing film preparation procedure: the cast films had a significantly higher inhibition zone diameter (15.5±0.9 mm) than heat-pressed or blown films (8.6±1.0 and 9.8±0.2 mm, respectively). Although it cannot be excluded that this might be due to a more rapid dissolution in TSA of nisin from cast films and/or weaker sodium caseinate/nisin interactions in cast films, this difference is more likely due to a partial inactivation of nisin during the 7 min of heat-pressing or extrusion-blowing at 80°C. Indeed, extrusion-blown films were prepared from pellets which were manufactured by a twin-screw extrusion step at 65°C for 2.5 min. As stated earlier, this step already resulted in a partial inactivation of nisin. The extrusion-blowing employed to prepare films might also result in additional nisin inactivation due to shear stress and the temperature conditions prevailing during this process. In the aim of investigating the thermal stability of nisin, nisin-containing

pellets were heat-pressed for 7 min and obtained films were subsequently tested for the characterization of their antimicrobial activity.

III.3.2.1.3. Effect of heat-pressing temperature of a sodium caseinate-glycerol-nisin formulation on the residual antibacterial activity of nisin

Films with a 50 μm width and an 8 mm diameter were prepared by heat-pressing for 7 min at temperatures ranging from 80 to 140°C. *K.rhizophila* ATCC9341 growth inhibition zones were measured after 24 h incubation at 30°C (Figure 5). The diameters of the inhibition zones around films heat-pressed for 7 min at 80, 90, or 100°C were similar and close to the initial diameter of films (8 mm). Interestingly, when the heat-pressed films were pressed for 2 min instead of 7 min at 80°C, a significantly higher inhibition zone diameter was measured (14.2 \pm 0.4 mm), data not shown) against *K.rhizophila*. Increasing heating temperature above 110°C resulted in a sharp decrease of the inhibition zone diameter: following heating at 140°C, the inhibition zone was no more observable, suggesting a quasi-total inactivation of nisin. Hoffman *et al.*(1997) also reported an increasing loss of nisin activity in polyethylene films formed at 149°C when heating time increased from 1 to 3 min.

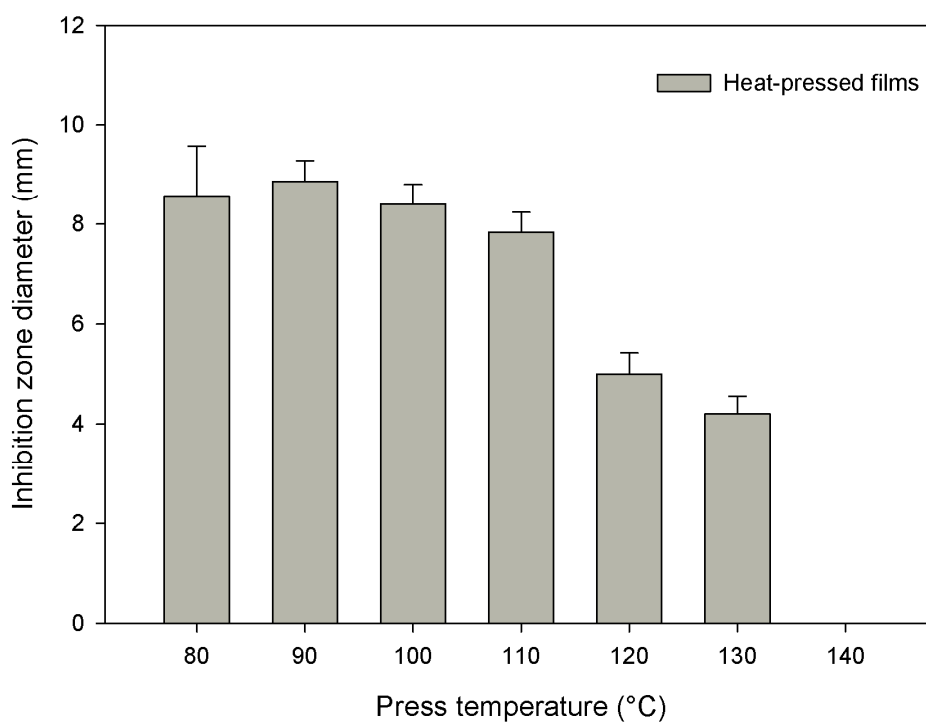
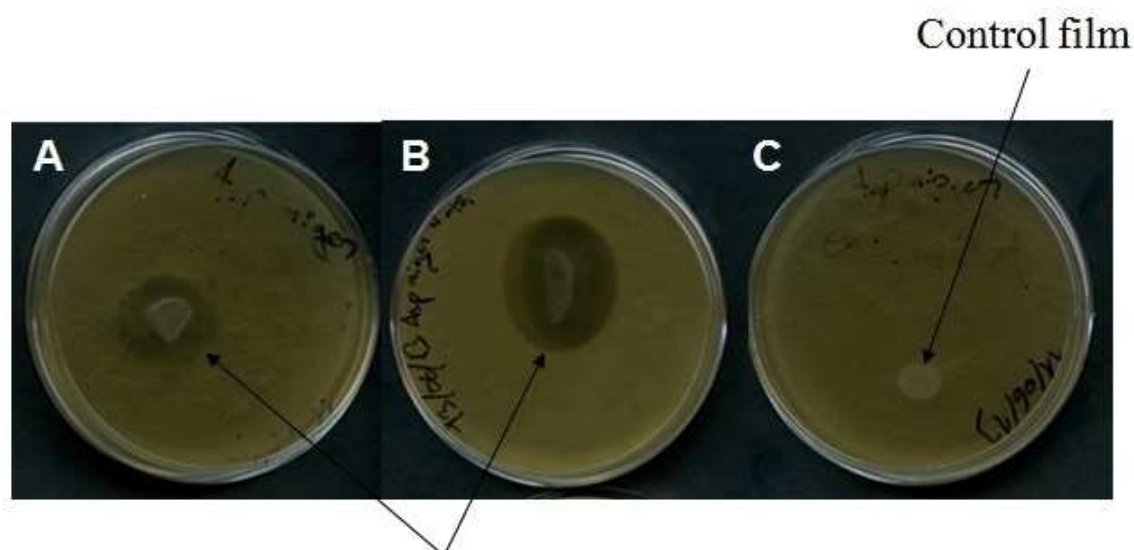


Figure 5 : Inhibition zone diameters (mm) measured after 24h of incubation at 30°C around nisin-containing films as a function of heat-press temperature. (TSB medium inoculated by *K.rhizophila*ATCC9341)

III.3.2.2. Antimicrobial activity of natamycin-containing films

Films containing natamycin were prepared either by heat-pressing or by extrusion-blowing. After 24 h incubation at 30°C, the diameters of the *A. niger* growth inhibition zones were measured (Figure 6 and Table 3).



Inhibition zones around natamycin-containing films

Figure 6 : *A. niger* growth inhibition zones in the presence of natamycin-containing blown (A) and heat-pressed (B) films and the absence of inhibition zone in the presence of a control film (C).

Table 3 : Growth inhibition zone diameters around natamycin-containing pressed or blown films and corresponding control films on semi-agar inoculated by *A. niger*.

| | | Inhibition zone diameter (mm) |
|---|------------------------------------|----------------------------------|
| | | <i>A. niger</i> |
| Control films (50µm±0.02) | Heat-pressed film (80°C, 7 min) | 0.0 |
| | Blown film | 0.0 |
| Natamycin-containing films (50µm±0.02) | Heat-pressed film (80°C, 7 min) | 15.9±2.2 ^a |
| | Blown film | 5.4±1.1 ^b |

^{a,b}Means within the same column, labeled with the same letter, do not statistically differ from each other ($p > 0.05$).

No inhibition zone was observed (Figure 6C) around films without natamycin, while an *A. niger* growth inhibition zone around blown and heat-pressed films with natamycin was observed (Figure 6A and 6B, respectively), clearly indicating that *A. niger* inhibition was due to active natamycin. These inhibition zone diameters remained stable after 7 days of incubation, which suggests that practically the total natamycin amount in the films was

released towards agar medium during the antimicrobial activity assays. The diameter of the inhibition zone surrounding films prepared by extrusion-blowing was significantly lower than that of heat-pressed films: this indicates that a significant proportion of natamycin initially introduced in the formulation has been inactivated during the twin-screw extrusion step and/or the extrusion-blowing step. To our knowledge, this is the first report on the preparation of active films containing natamycin by thermomechanical processes. Further studies are now needed to determine the respective contributions of factors such as temperature, shear stress, and formulation to preserve the stability of natamycin following thermomechanical treatments. The technical possibility to obtain materials with a sufficient residual amount of active natamycin to be antibacterial by the traditional manufacturing processes of plastics industry has been demonstrated.

III.3.3. Optical properties of films

Besides having an antimicrobial activity, active edible films or coatings have to meet traditional properties expected for materials intended for the coating or the packaging of foods. These traditional properties encompass namely mechanical, and gas barrier properties. The mechanical properties and the water vapor permeability of sodium caseinate based thermoplastic materials were already published by Belyamani *et al.*(2014). Although natamycin and nisin preparations were minor components of films formulation with 1%(w/w) and 4%(w/w) respectively, an ongoing work aims at determining mechanical and gas barrier properties of sodium caseinate blown films as affected or not by the addition of these active agents. Other important properties conditioning the acceptability by consumers of edible coatings or films as food coating or packaging are their optical properties. Therefore, the color and the transparency of sodium caseinate blown films with or without nisin and natamycin were compared.

III.3.3.1. Color

The results of color measurements of sodium caseinate blown films incorporated with either nisin or natamycin or without any of these two antimicrobial agents (control films) are presented in table 4. *L* values of films incorporated either with a nisin or a natamycin preparation were not significantly different ($p<0.05$) from those of control films. This indicates that clearness and brightness of sodium caseinate films was not affected by the presence of either 4% (w/w) of nisin preparation, or 1% (w/w) of natamycin preparation. On

the other hand, active films, regardless the added active agent, were significantly ($p < 0.05$) more red and more yellow with greater means of positive a and b values, respectively. These results are not surprising although the added concentrations of natamycin (1% w/w) and nisin (4% w/w) preparations were very low. Despite the antimicrobial molecules natamycin and nisin have compatible nature with sodium caseinate; nisin and natamycin were not the only constituents of commercial preparations: nisin and natamycin represented 2.5% (w/w) and 50% (w/w), respectively. The other major constituents of these commercial preparations were sodium chloride (75% (w/w)) and lactose (50% (w/w)), respectively. These compounds even in small concentrations may cause differences in visual characteristics of protein-based films (Han, 2000).

Table 4 : Color properties (average \pm standard deviation, $n=3$), viz. L (black–white), a (green–red), b (blue–yellow) and ΔE (color difference), of sodium caseinate edible blown films with 20%(w/w) glycerol, containing or not (none) 1% (w/w) Natamax® (0.5% (w/w) natamycin) or 4% (w/w) Nisaplin®(0.1% (w/w) nisin).

| Antimicrobial agent | <i>L</i> | <i>a</i> | <i>b</i> | ΔE |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| None | 84.1 \pm 1.0 ^a | 3190.2 \pm 2.2 ^a | 3370.0 \pm 2.3 ^a | 34.7 \pm 3.3 ^a |
| Natamycin | 83.2 \pm 0.7 ^a | 3208.3 \pm 8.1 ^b | 3393.5 \pm 10.63 ^b | 63.9 \pm 13.3 ^b |
| Nisin | 83.7 \pm 0.5 ^a | 3196.0 \pm 1.7 ^b | 3377.5 \pm 2.83 ^b | 44.0 \pm 3.1 ^b |

^{a,b}Means within the same column, labeled with the same letter, do not statistically differ from each other ($p > 0.05$).

Natamax® and Nisaplin® are a 50% (w/w) natamycin and a 2.5%(w/w)nisin preparations, respectively.

The total color difference (ΔE) obtained for natamycin- or nisin-containing sodium caseinate films significantly differed ($p > 0.05$) from that obtained for control sodium caseinate films. Although natamycin preparation content was lower than nisin preparation content in the active film formulations, comparing to control films, natamycin-containing films showed a higher color deviation than nisin-containing films. This is likely due to the presence of lactose in natamycin preparation. Lactose is a reducing sugar known to react with the free amino acid side chains of milk proteins such as caseinates (namely ϵ -amino group of lysine residues) to form Maillard reaction products (Pan and Melton, 2007). Maillard reaction is also known as non-enzymatic browning. This hypothesis is substantiated by the fact that conditions prevailing during the thermomechanical treatments employed to prepare blown films were in

favor of Maillard reactions. The mixing in twin screw extruder favored lactose and proteins contact, and the temperature (65°C for 2.5 min twin-screw extrusion for the preparation of pellets and 80°C for 7 min during extrusion-blowing) was relatively high.

III.3.3.2. Light transmission and transparency

Table 5 :Optical properties (average \pm standard deviation, n= 3), UV and visible light transmission (%) and transparency of sodium caseinate films with 20% glycerol, containing or not 1% (w/w) Natamax® or 4% (w/w) Nisaplin®.

| Antimicrobial agent | UV-Visible light transmission (%) at different wavelengths (nm) | | | | | | | Transparency |
|---------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | |
| None | 0.0 \pm 0.0 | 2.7 \pm 0.4 ^a | 19.4 \pm 4.4 ^a | 24.7 \pm 5.3 ^a | 28.8 \pm 5.7 ^a | 32.8 \pm 6.0 ^a | 36.0 \pm 6.1 ^a | 7.5 \pm 1.5 ^a |
| Natamycin | 0.0 \pm 0.0 | 14.1 \pm 3.3 ^b | 49.0 \pm 1.0 ^b | 57.1 \pm 1.4 ^b | 62.1 \pm 1.5 ^b | 66.3 \pm 1.5 ^b | 68.9 \pm 1.5 ^b | 4.6 \pm 0.6 ^b |
| Nisin | 0.0 \pm 0.0 | 7.7 \pm 1.4 ^c | 43.9 \pm 5.4 ^b | 52.8 \pm 5.5 ^b | 58.5 \pm 5.2 ^b | 63.4 \pm 4.9 ^b | 66.8 \pm 4.5 ^b | 3.7 \pm 0.1 ^b |

Natamax® and Nisaplin® are 50% (w/w) natamycin and 2.5% (w/w) nisin preparations, respectively.

Light transmission (T) and transparency values, of sodium caseinate blown films with and without nisin or natamycin preparations are presented in Table 5. T was evaluated for wavelengths between 200 and 800 nm. Light transmittance (max 100%) increased when T value increased. Thus a higher T value for a given wavelength indicates a more transparent film and *vice-versa*. As shown in Table 5, at 200 nm, no light transmission took place for any films. T values started to be recorded for each film at wavelengths exceeding 280nm (data not shown). Ramos *et al.*(2012) made a similar observation when studying optical properties of whey proteins-based solution-cast films. For wavelengths above 300nm, light transmission (T) properties of nisin-containing, natamycin-containing, and control films started to differ significantly ($p>0.05$) from each other. Between 300 and 800nm, nisin- or natamycin-incorporated films showed significantly higher T values than control films. These results indicated that sodium caseinate films incorporated with antimicrobial compounds showed less opacity than sodium caseinate control films. This can be related to crystallinity of antimicrobial compounds since it is known that the transparency of materials increases with the crystallinity degree of film-forming polymers. Moreover, this can also be related to the influence of nisin or natamycin preparations on optical properties of sodium caseinate films plasticized with glycerol. Nevertheless, measured T values for control in the present study

were far lower than those reported by Fabra *et al.* (2009, 2010) for sodium caseinate or sodium and calcium caseinate-based solution-cast films plasticized with 23% glycerol. These differences may be related to film formation process (solution-cast films had higher transparency), or to light transmission measurement methods which were different in concerned studies. On the other hand, the increase in T value as a function of wavelength was in accordance with literature (Fabra *et al.*, 2009). The transparency of sodium caseinate films incorporated with nisin or natamycin was statistically higher than that from control films.

III.4. Conclusions

This study demonstrated the feasibility of active antimicrobial film fabrication by conventional technologies of industry. The efficacy of two widely used food preservatives was evaluated following their incorporation in a sodium caseinate matrix by extrusion processes. The antimicrobial properties of films obtained by blown-film extrusion were characterized on three bacterial strains and one fungal strain which are food-borne pathogen model microorganisms. Antimicrobial solution-cast films had the highest ($p>0.05$) growth inhibitory effect against *K.rhizophila*. It is demonstrated that the effectiveness of antimicrobial blown films against the same strain was not negligible compared to solution-cast films. Viable cell count assays permitted showing that the efficacy of active materials providing a bacteriostatic or a bactericidal effect depended greatly on active antimicrobial compounds concentration in film-forming polymer. It is also underlined that thermomechanical processing leads an inactivation of nisin. As a result, biologically active nisin concentration in thermoplastic materials isn't equal to that initially incorporated in the formulation.

Antifungal activity against *A.niger* of natamycin-incorporated blown films was also demonstrated. Blown films had a lower antifungal activity than heat-pressed films. To improve the understanding of this trend, complementary studies, especially on natamycin stability in non-aqueous systems are needed. Finally, optical properties of films were measured. Addition of antimicrobial compounds caused significantly important differences in transparency and color of films. This trend was mainly attributed to crystalline components present in the commercial preparations rather than the active molecules: nisin and natamycin.

The present study is important as it is the first one demonstrating the presence of satisfactory antimicrobial activity in thermoplastic edible films based on sodium caseinate. This study may open new perspectives in active food packaging applications since these edible films

with antimicrobial properties can be obtained by a continuous production process at an industrial scale.

III.5. Acknowledgement

The authors would like to thank “Region Rhône-Alpes” for financing the Ph D thesis of Basak Yilin Colak and “Fonds pour le Développement de la Recherche du technopole Alimentec” for partially funding this project.

III.6. References

- Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K., (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology* 87(1-2), 35-43.
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S.S., Powers, J., (2010). Release kinetics of nisin from biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) films into water. *Journal of Food Engineering* 100(1), 93-101.
- Belyamani, I., Prochazka, F., Assezat, G., (2014). Production and characterization of sodium caseinate edible films made by blown-film extrusion. *Journal of Food Engineering* 121, 39-47.
- Bouttefroy, A., Milliere, J.B., (2000). Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *International Journal of Food Microbiology* 62(1-2), 65-75.
- Cao-Hoang, L., Chaîne, A., Gregoire, L., Wache, Y., (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology* 27(7), 940-944.
- Cha, D.S., Cooksey, K., Chinnan, M.S., Park, H.J., (2003). Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology* 36(2), 209-213.
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., Degraeve, P., (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control* 19(10), 982-989.
- Chollet, E., Swesi, Y., Degraeve, P., Sebti, I., (2009). Monitoring nisin desorption from a multi-layer polyethylene-based film coated with nisin loaded HPMC film and diffusion in agarose gel by an immunoassay (ELISA) method and a numerical modeling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10(2), 208-214.
- Davies, E.A., Bevis, H.E., DelvesBroughton, J., (1997). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 24(5), 343-346.
- Dawson, P.L., Hirt, D.E., Rieck, J.R., Acton, J.C., Sotthibandhu, A., (2003). Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method. *Food Research International* 36(9-10), 959-968.
- Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A., (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids* 23(3), 676-683.
- Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A., (2010). Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *Journal of Food Engineering* 96(3), 356-364.

- Fajardo, P., Martins, J.T., Fucinos, C., Pastrana, L., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering* 101(4), 349-356.
- Guiga, W., Swesi, Y., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P., Sebti, I., (2010). Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin (R) or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11(2), 352-360.
- Han, J.H., (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technology* 54(3), 56-65.
- Han, J.H., Floros, J.D., (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 13(4), 287-298.
- Hanusova, K., Stastna, M., Votavova, L., Klaudisova, K., Dobias, J., Voldrich, M., Marek, M., (2010). Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Engineering* 99(4), 491-496.
- Hoffman, K.L., Dawson, P.L., Acton, J.C., Han, I.Y., Ogale, A.A., (1997). Film formation effects on nisin in corn zein and polyethylene films. . *Research and Development Activities for Military Food and Packaging Systems Report* 50, 238-244.
- Hoffman, K.L., Han, I.Y., Dawson, P.L., (2001). Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. *Journal of Food Protection* 64(6), 885-889.
- Hondrodimou, O., Kourkoutas, Y., Panagou, E.Z., (2011). Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology* 28(3), 621-627.
- Juneja, V.K., Dwivedi, H.P., Yan, X.H., (2012). Novel Natural Food Antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 3 3, 381-403.
- Karam, L., Jama, C., Mamede, A.S., Boukla, S., Dhulster, P., Chihib, N.E., (2013). Nisin-activated hydrophobic and hydrophilic surfaces: assessment of peptide adsorption and antibacterial activity against some food pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(24), 10321-10328.
- Krochta, J.M., (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, current status and opportunities. , in: Gennadios, A. (Ed.), *Protein-Based Edible Films and Coatings*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-43.
- Lakamraju, M., McGuire, J., Daeschel, M., (1996). Nisin adsorption and exchange with selected milk proteins at silanized silica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 178(2), 495-504.
- Lee, D.S., (2005). Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agents, in: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Elsevier, CA, pp. 108-122.
- Liu, L.S., Jin, T.Z., Coffin, D.R., Hicks, K.B., (2009). Preparation of Antimicrobial Membranes: Coextrusion of Poly(lactic acid) and Nisaplin in the Presence of Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(18), 8392-8398.

- Pan, G.G., Melton, L.D., (2007). Nonenzymatic browning of lactose and caseinate during dry heating at different relative humidities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(24), 10036-10042.
- Pintado, C., Ferreira, M., Sousa, I., (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control* 21(3), 240-246.
- Ramos, O.L., Silva, S.I., Soares, J.C., Fernandes, J.C., Pocas, M.F., Pintado, M.E., Malcata, F.X., (2012). Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *Food Research International* 45(1), 351-361.
- Rossi-Marquez, G., Han, J.H., Garcia-Almendarez, B., Castano-Tostado, E., Regalado-Gonzalez, C., (2009). Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(14), 2492-2497.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., Jagus, R., (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International* 39(6), 749-754.
- Siragusa, G.R., Cutter, C.N., Willett, J.L., (1999). Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiology* 16(3), 229-235.
- Ture, H., Eroglu, E., Soyer, F., Ozen, B., (2008). Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. *International Journal of Food Science and Technology* 43(11), 2026-2032.

III.7. Abstract

This study aims at assessing the feasibility of preparing antimicrobial edible films based on sodium caseinate, glycerol and nisin or natamycin by classical thermomechanical processes. Active agents were compounded (at 65°C) with sodium caseinate in a twin-screw extruder. Active agent-containing thermoplastic pellets were then used for manufacturing (at 80°C) thermoplastic films either by blown-film extrusion process or by heat-press. Although nisin seems to be partially deactivated during thermomechanical processing, it is demonstrated that it still has a sufficient antimicrobial activity to inhibit the growth of *L.innocua* for 8h and, and that of *K.rhizophila* from 3h onwards till 32h of incubation at 30°C. This is mainly due to relatively low processing temperature (80°C). On heat-pressed films it is demonstrated that starting from 110°C the activity loss becomes more important and at 140°C there is no more antimicrobial activity in films. Besides, nisin-containing thermoplastic films transformed at 80°C regardless the film making process, showed promising antimicrobial efficacy in comparison with the active solution cast films. Natamycin-containing thermoplastic films are efficient against *A.niger*. Active heat-pressed films showed higher inhibition zone diameters than active blown films. Presence of active agents in the formulations resulted in films having a higher opacity and more yellowish color. This is likely related to Maillard reactions occurred during the extrusion and heat-press processes in the presence of active substances.

Keywords: nisin, natamycin, sodium caseinate, edible films, extrusion

CHAPITRE IV:

STUDY OF THE INFLUENCES OF FILM PROCESSING CONDITIONS AND GLYCEROL AMOUNT ON THE WATER SORPTION AND GAS BARRIER PROPERTIES OF NOVEL SODIUM CASEINATE FILMS

Basak YilinCOLAK^{a,b,c,d}, FabriceGOUANVE^{a,b,e}, Pascal DEGRAEVE^d,

ElianeESPUCHE^{a,b,e}, FrédéricPROCHAZKA^{a,b,c,*}

^aUniversité de Lyon, F-69003, France

^bCNRS, UMR 5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, France

^cUniversité de Saint-Etienne, F-42023, Saint-Etienne, France

^dUniversité de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 - ISARA Lyon, Laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA, EA n°3733), IUT Lyon 1 site de Bourg en Bresse, technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu,

F-01000 Bourg en Bresse, France

^eUniversité Lyon1, F-69622 Villeurbanne cedex

Chapitre IV: Study of the influences of film processing conditions and glycerol amount on the water sorption and gas barrier properties of novel sodium caseinate films

Ce dernier chapitre du manuscrit est préparé comme les deux précédents, sous forme d'une publication. Elle a été soumise au journal « Journal of Membrane Science ».

Dans ce chapitre, c'est la compréhension des phénomènes de transport à travers les films de caséinate de sodium qui est recherchée. Il est donc consacré aux mesures des propriétés barrière et de sorption de l'eau. Plus précisément, l'influence de trois variables sur les isothermes de sorption et sur la perméabilité aux gaz a été étudiée : le taux de glycérol, l'utilisation ou non de l'éthanol durant la fabrication et le mode de production des films. Les données expérimentales obtenues sur les isothermes de sorption et sur la température de transition vitreuse ont été modélisées par les modèles de Park et de Gordon-Taylor respectivement. La technique de mesure des isothermes de sorption a permis à partir des demi-sorptions de calculer la diffusivité à l'eau des films selon la loi de Fick.

Dans l'introduction de l'article, les avantages de l'utilisation des films à base de protéine d'un point de vue « packaging » et l'originalité du travail sont rapidement présentés. La fabrication des films par voie fondue et par voie solvant, le suivi des méthodes utilisées de caractérisations physico-chimiques sont décrites dans la partie « Matériel et méthodes ». Finalement, les principaux résultats obtenus et les interprétations correspondantes sont présentés dans la partie « Résultats et discussion ». Les résultats des analyses physico-chimiques par diffractométrie de rayons X, calorimétrie différentielle à balayage, par technique dynamique de sorption d'eau et par mesures de transmission des gaz (O_2 et H_2O) sont présentés dans cette partie.

Les principales conclusions retenues de cette étude sont les suivantes :

- L'ajout d'éthanol qui est un agent dénaturant pour les protéines n'a aucune influence sur la diffusivité à l'eau des films de caséinate de sodium. De plus, son utilisation durant les

procédés de fabrication n'impacte pas la perméabilité à l'oxygène ou à la vapeur d'eau des films.

- Au vu des comparaisons entre les films thermoplastiques et les films réalisés par voie solvant, la transformation thermomécanique de caséinate de sodium ne semble pas affecter les isothermes de sorptions ou la perméabilité aux gaz (oxygène et vapeur d'eau) des films.
- Une augmentation du taux de glycérol :
 - diminue la quantité d'eau absorbée par les films dans des conditions d'humidité relative faible.
 - augmente la quantité d'eau absorbée dans des conditions d'humidité relatives élevées.
 - diminue la capacité de l'eau à jouer le rôle de plastifiant.

IV.1. Introduction

Over the past decades, packaging industry generates an increasing interest for biopolymer films in order to reduce the environmental impact of plastic waste mainly produced by its huge application area. In this context, edible films provide, thanks to their functional properties and biodegradable nature, the double advantage of decreasing the quantity of conventional plastics used in the complex packaging systems and of minimizing or even removing the environmental impact of packaging material[1].

Protein based edible films with their good gas barrier properties are promising materials for packaging applications [2]. Food researchers are aware of high potential persisted in the utilization of these films, thus they had been studied extensively [1, 3-5]. Despite numerous advantages reported, protein based edible films are still not able to take place concretely in the market. The only satisfying explanation to their current status is drawbacks related to their poor mechanical properties, hydrophilic nature[6-9] rendering films very moisture sensitive and adopted fabrication process [10]solvent cast process, which is not adapted to industry for financial and ecological reasons. Thus it is still necessary to develop flexible free-standing edible films by commonly used plastic transformation technologies such as extrusion.

Sodium caseinate is a water-soluble polymer obtained by the acid precipitation and then neutralization of casein, the major bovine milk protein [6]. It has high nutritional value, excellent film forming properties due to its random coil structure and good oxygen barrier properties which makes it a very attractive candidate for edible film making [11, 12]. Lately sodium caseinate based edible films produced by conventional plastic technologies, blown-film extrusion, has been reported by Belyamani *et al.*[13]. A continuous production of these films by industrial methods may lead to new opportunities and encourage their commercialization. Some extra data is still needed on physical properties of sodium caseinate based blown films in order to determine their limits of use as edible food packaging films. Furthermore, it is important to study their performances in comparison with those of solution casting films to find out if there is any influence of thermo-mechanical processing.

In the first part of this paper, water and gas transport properties of sodium caseinate films obtained by solution casting and by extrusion, respectively were studied and compared. Ethanol

which is well known as a denaturing agent for most proteins is added as solvent in film-forming solutions. It also has an important role in ionization level of caseins and affects the dissolution process of sodium caseinate in water[14]. Gontard *et al.*[15]reported the decreasing water vapor barrier properties of gluten based edible films with increasing ethanol concentration in the film-forming solution. In the present study, ethanol was used to facilitate the extrusion of sodium caseinate. Its influence was also investigated on the water vapor diffusivity. Later, the impact of the use of glycerol as plasticizer in the material was analyzed. This part was mainly focused on the water sorption properties of glycerol-plasticized films because absorbed water may greatly alter mechanical and barrier properties of hydrophilic materials under real usage conditions of packaging films. Although GAB and BET equations are the models commonly used by authors[13, 16-19], in this work for the first time, to our knowledge, Park's equation was used for modeling the sorption isotherms of sodium caseinate films. This model offers a detailed description of sorption phenomena in the whole range of water activity. In addition to all, a detailed study on sorption kinetics and thermodynamic characteristics of these films were proposed.

The originality of this work persists mainly in the fabrication process of films. It focuses on water sorption and oxygen and water permeation properties of sodium caseinate blown films with a fundamental approach. This permitted relating theoretical transport phenomena of small molecules through thin films to marketable films' final properties.

IV.2. Experimental

IV.2.1. Materials

Sodium caseinate native powder was purchased from EPI Ingredients (Ancenis, France). Glycerol was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO) and ethanol 96°, used as denaturizing agent, was supplied by Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France).

IV.2.2. Films preparation

Thermoplastic sodium caseinate films were prepared using two different processing routes: blown extrusion process and solvent cast process. For the blown extrusion film process, in a first

step, sodium caseinate pellets were elaborated using a twin-screw extruder from Cleextral (Cleextral BC 21, France) as described previously by Belyamani *et al.*[13]. The sodium caseinate powder was introduced without any treatment into the first zone of the extruder. Glycerol and water were used as food-grade plasticizer agents and alimented into the 2nd zone using a piston pump (PCM pumps, PP9, France). In the case of ethanol addition, 20 v/v% of ethanol was added in water. A degassing zone permitted the solvents evaporation (water and ethanol) during the pellet production process (80°C). Different amounts of glycerol were used: 15, 20 and 25 wt% and were expressed with respect to the total matter content. The obtained extrudates were pelletized after cooling at ambient atmosphere. The obtained pellets were then introduced in an extruder equipped with a small compression rate (2.5) screw with a diameter of 20 mm and a length-to-diameter ratio of 25. The screw speed was set to 45 rpm, and the barrel and the die were heated to 80 °C which was sufficient enough to melt the thermoplastic pellets. The molten protein was forced through the vertical annular die of spiral mandrel type. The tube was pulled upwards from the die by a pair of nip rolls placed 1 m above the die, and the thickness of the film was controlled by the speed of the nip rollers. Residence times during twin-screw extrusion and blown-film extrusion processes were 2.5 and 7 minutes, respectively.

For the solvent cast process, the film preparation consisted in the dissolution of native sodium caseinate powder with or without glycerol in distilled water at a concentration of 15 w/v%. Two weight amounts of glycerol expressed with respect to the total matter content were used: 0 and 20. In the case of ethanol addition, 20 v/v% of ethanol was added to water. The solution was continuously stirred at room temperature for 2h. After degassing, the solution was poured onto polystyrene plates and solvent evaporation was carried out at room temperature all night long. In following part of this manuscript, sodium caseinate films prepared by both processing routes will be denoted as NaCxGy: x being “ext” for blown extruded films and “sc” for solvent cast films and y indicating the total amount of glycerol in the film. If ethanol was used during the film process, NaCxGyEtOH was used as nomenclature. In all cases, the film thickness was measured by a micrometer (Elcometer Limited, Manchester, United Kingdom) and was approximately 70µm whatever is the film process.

IV.2.3. X-ray diffraction (XRD)

The X-ray diffraction (XRD) analyses were performed with a Bruker D8 Advance diffractometer (Villeurbanne, France). All spectra were recorded at room temperature in the range of 2θ between 1° and 30° by step of 0.02° . Thin films cut into 20 x 20 mm dimensions were previously conditioned in an environmental chamber ensuring 60% of relative humidity (*RH*) at 25°C . Samples at equilibrium state were spread on neutral mono substrates and fixed with an adhesive tape by sides out of the analyzed area. For the different films, the intensity values were normalized taking into account the real thickness of the films.

IV.2.4. Differential scanning chromatography (DSC)

Differential scanning chromatography (DSC) analyses were carried out using a DSC QA 10 (TA Instruments). Samples were either conditioned at 65% RH and 80% RH at 25°C in an environmental chamber, or dried in a vacuum oven. In each case, samples were analyzed after the equilibrium state was reached. Conditioned samples (weigh between 3-4 mg) were sealed in hermetic aluminum pans. A ramp of temperature from 20°C to 120°C with a constant speed rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$ was employed. An empty aluminum pan was used as reference. Obtained data permitted to determine the glass transition temperature T_g of the different films by TA Universal Analysis software (TA Instruments, New Castle, USA).

IV.2.5. Dynamic vapor sorption (DVS)

Dynamic vapor sorption analyzer, DVS Advantage, was used to determine water sorption isotherms of the different samples. The vapor partial pressure was controlled by mixing dry and saturated nitrogen, using electronic mass flow controllers. The experiments were carried out at 25°C . The initial weight of the sample was approximately 30 mg. The sample was pre-dried in the DVS Advantage by exposure to dry nitrogen until the dry mass of the sample was obtained (m_0). A partial pressure of vapor (p) was then established within the apparatus and the mass uptake (m_t) was followed as a function of time (t). The mass at equilibrium (m_{eq}) was considered to be reached when changes in mass with time (dm/dt) were lower than $0.0002 \text{ mg min}^{-1}$ for at least five consecutive minutes. Then, vapor pressure was increased in suitable activity up to 0.9 by step of 0.1. The value of the concentration of water at equilibrium in the material (C) for each

water activity (a_w) allowed plotting the water sorption isotherm for each sample. C is expressed in cm^3_{STP} per g of material according to the following equation:

$$C = \frac{m_{eq} - m_0}{m_0} \times \frac{22414}{18} \quad (\text{Eq. 1})$$

a_w is defined as the ratio of the partial vapor pressure of water in equilibrium to the saturated vapor pressure of pure water (p_{sat}) at the same temperature.

$$a_w = \frac{P}{P_{sat}} \quad (\text{Eq. 2})$$

The sorption rate was also estimated at each water activity by applying the Fick's diffusion law. Taking into account the film thickness (L), the water diffusion coefficient (D) was calculated for the short time ($m_t/m_{eq} < 0.5$) according the following equation:

$$\frac{m_t}{m_{eq}} = \frac{4}{L} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad (\text{Eq. 3})$$

IV.2.6. Water vapor permeability

Water permeability measurements were performed on a MoconPermatran W 3/33 (Minneapolis, USA) equipped with an infrared sensor. Nitrogen was used as the carrier gas. The film was placed on an aluminum mask with an open testing area of 5 cm^2 . The test cell was composed of two chambers separated by the film. As a first step, samples were conditioned in nitrogen inside the unit for at least 12 h to remove traces of atmospheric water. Secondly, water was introduced in the upstream compartment of the test cell. Water molecules transferred through the film were conducted by the carrier gas to the infrared sensor. The water permeability coefficient (P_{H_2O}) was calculated considering the following equation:

$$P_{H_2O} = (J_{st,H_2O} \times L) / (\Delta p) \quad (\text{Eq. 4})$$

where L is the thickness of the film, J_{st,H_2O} the water stationary flux and Δp the difference of pressure between the upstream and the downstream compartments. P_{H_2O} can be expressed in $\text{g.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ($1 \text{ g.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1} = 5.55 \times 10^{-2} \text{ mol.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ in SI units). Measurements were

performed at controlled temperature ($T= 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) and for different water activity (0.30, 0.45 and 0.70).

IV.2.7. Oxygen permeability

Oxygen permeability measurements were performed at 23°C for different water activities (0.35, 0.45 and 0.75, respectively) on a MoconOxtran 2/21 (Minneapolis, USA) equipped with a Coulox sensor. The film was placed on an aluminium mask with an open testing area of 5 cm^2 . Masked films were placed in the test cell and exposed to the test gas on one side and the carrier gas on the other side. Nitrogen containing 2% of hydrogen was used as the carrier gas and pure oxygen was used as the test gas. The water activity of the two gases was controlled by a humidifier. As a first step, test cell was purged with the humidified controlled nitrogen/hydrogen (N_2/H_2) gas for at least 24h in order to be at the water mass uptake equilibrium of the tested film and also to evacuate residual atmospheric oxygen in the cell. Secondly, oxygen was introduced in the upstream compartment of the test cell. Oxygen transferred through the film was conducted by the carrier gas to the coulometric sensor. The oxygen permeability coefficient (P_{O_2}) was calculated considering the following equation:

$$P_{\text{O}_2} = (J_{\text{st O}_2} \times L) / (\Delta p) \quad (\text{Eq. 5})$$

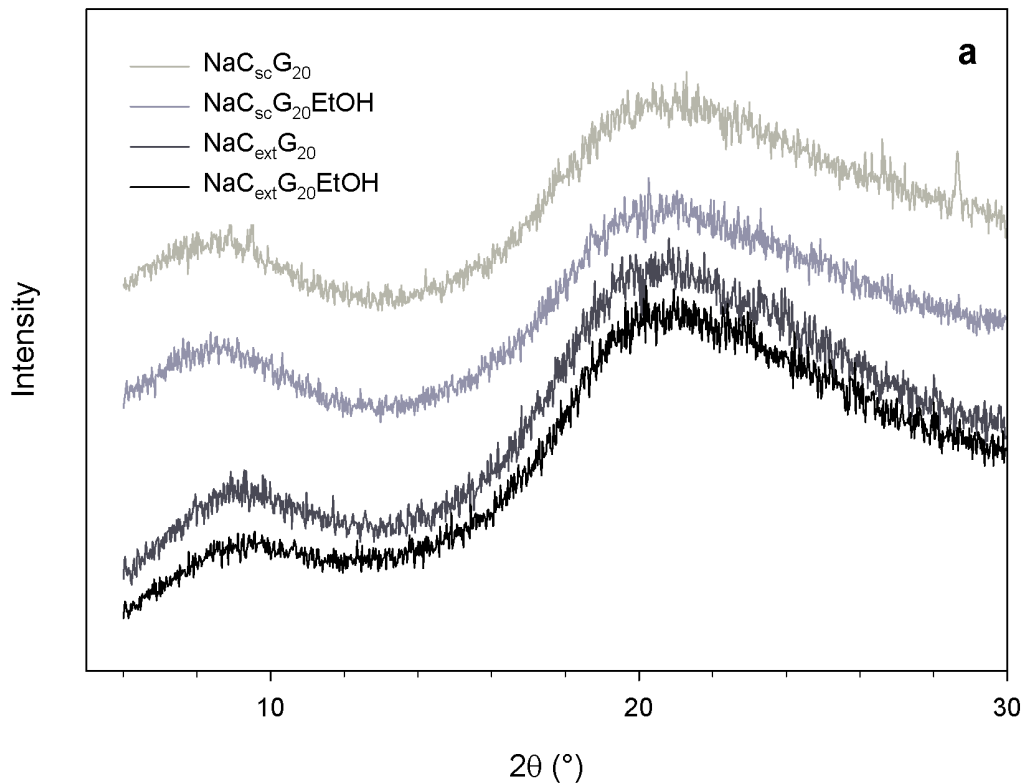
where L is the thickness of the film, $J_{\text{st O}_2}$ the oxygen stationary flux and Δp the difference of pressure between the upstream and the downstream compartments. P_{O_2} can be expressed in $\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ ($1\text{ cm}^3 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1} = 5.16 \times 10^{-19}\text{ mol} \cdot \text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ in SI units).

IV.3. Results and discussion

IV.3.1. XRD

The XRD patterns of the $\text{NaC}_{\text{sc}}\text{G}_{20}$ and $\text{NaC}_{\text{ext}}\text{G}_{20}$ films elaborated in presence or in absence of ethanol and the XRD patterns of the NaC_{ext} films with 15, 20 and 25 wt% of glycerol elaborated in presence of ethanol are presented in Fig1a and Fig 1b, respectively. For each film, an X-ray diffraction pattern with two humps located in the regions of $2\theta=20^{\circ}$ and $2\theta=8.0^{\circ}$ are observed. This shape of pattern was also observed by Gao *et al.* [20] for sodium caseinate native protein

powder. According to Tanioka *et al.* and Rivero *et al.*[21, 22] the peaks observed in these regions indicate the reconstitution of the collagen like triple-helix structure. For Bigi *et al.*[23], the peak at 2θ around 8° is related to the diameter of the triple helix and its intensity would be associated with the triple-helix (Pro-Pro-Gly triplicates)[24] content of the films. In the case of sodium caseinate which is amorphous, these halos could be attributed to protein sequences such as Pro-Pro and Pro-X-Pro present in the primary structure of casein β . Although casein β was reported as being poorly ordered, these polypeptides chains representing 1/3 of its whole sequence resulted in a regular structural shape called β -sheet. Globally forming an ellipsoidal spatial shape and constituting the major proportion of the caseinate, casein β is asymmetric[25]and may be the reason of two separate humps appearing in DRX diagrams.



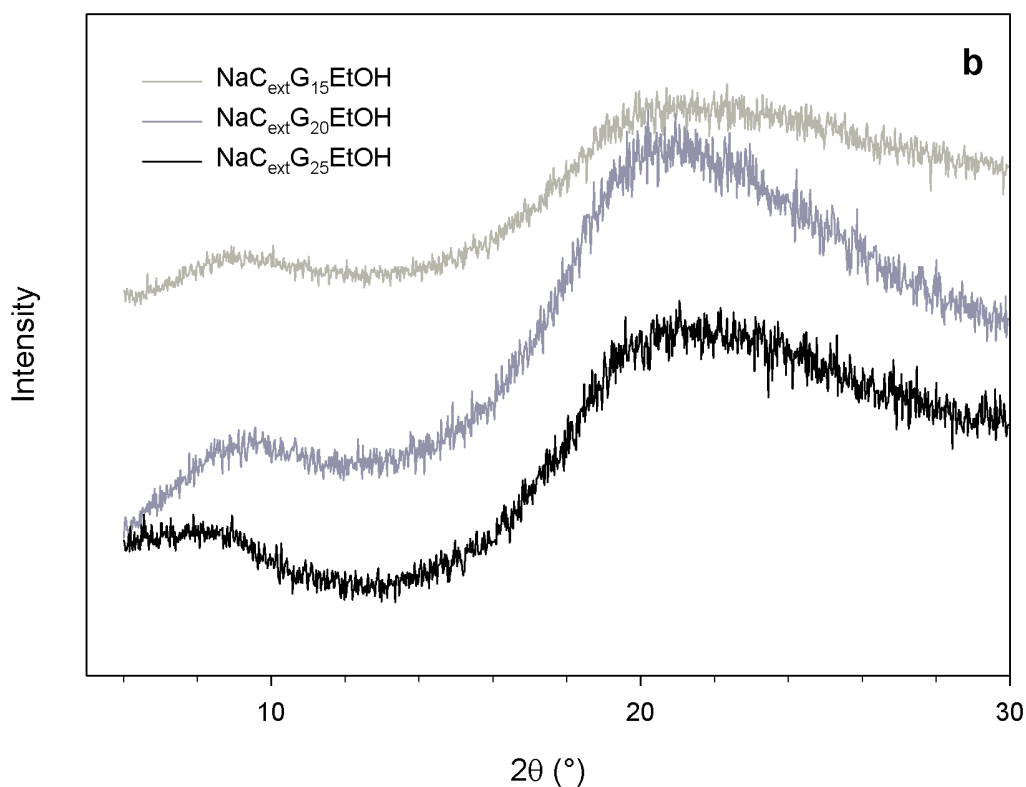
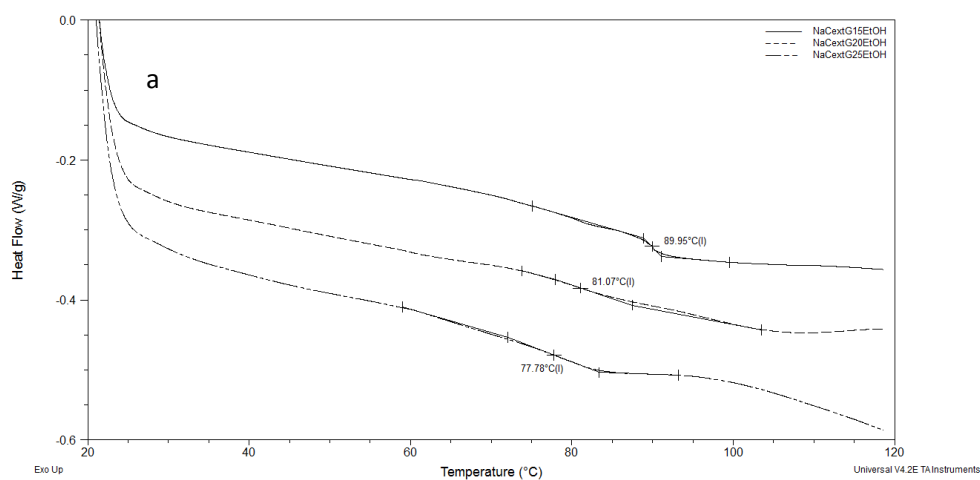


Figure 1 : X-ray patterns of (a) NaC solution casting and extruded films plasticized with 20% glycerol, treated or not with ethanol (b) NaC extruded films plasticized with 15%; 20%; and 25% glycerol treated with ethanol. (The curves were vertically shifted)

As shown in Fig. 1a, in the range of 2θ from 12 to 30° , no noteworthy difference in the XRD patterns is observed between the extruded and the solvent cast films. Likewise, no significant difference is observed when the films were prepared in presence of ethanol and also as a function of the amount of glycerol. However, in the range of 2θ below 12° , a small shift of the hump to the lower values of 2θ is observed for the films prepared by solvent cast method. In the same way, in Fig. 1b, a small shift of the hump to the lower values of 2θ is observed as the amount of glycerol increases for the extruded films. Moreover, differences are perceived in the intensity of halos, as well as in the ratios of the intensity between two halos of each pattern. This trend may be related to the content of plasticizers which are glycerol but also water, since the samples are preconditioned at 60%HR. Depending on XRD analyses, some changes seem to occur in the structural organization of sodium caseinate only in the case of plasticization.

IV.3.2. Thermal properties

The DSC first heating curves of the dried extruded films elaborated in presence of ethanol with different amount of glycerol are presented in Fig. 2a. In the used temperature range, namely from 20°C to 120°C, whatever is the amount of glycerol, only a glass transition event is observed in the DSC curves. Results clearly demonstrate that increasing glycerol amount moves backward the glass temperature (T_g) of films. Observed values for 15, 20, and 25wt% of glycerol were 90, 81, and 78°C, respectively. Numerous authors have reported for various agro polymers the decrease of T_g with increasing plasticizer amount [26-28]. Polyols, notably glycerol, are known as effective plasticizers for proteins. Glycerol has a low molecular weight and possesses three hydroxyl groups which can lead to the formation of sodium caseinate-glycerol interactions despite the polymer-polymer interactions. Also, glycerol may decrease partial molar volume of sodium caseinate due to hydrogen bonding on side chains[28] or due to preferential dehydration [29]. In both cases, specific molar volume loss would allow a greater molecular mobility.



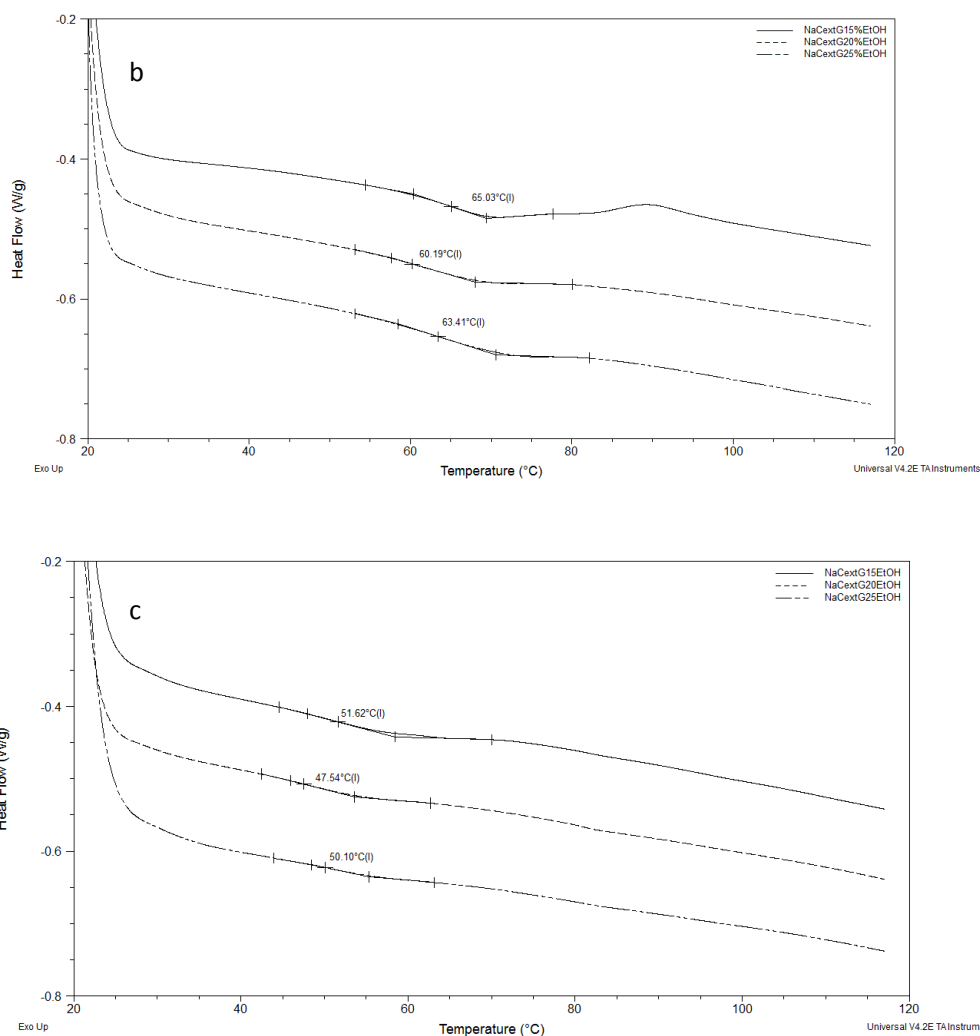


Figure 2 : DSC thermogrammes of NaC thermoplastic films plasticized with 15%; 20%; and 25% of glycerol. (a) Dried films (b) conditioned films at 60% (c) conditioned films at 80%RH (The curves were vertically shifted)

The DSC first heating curves of the extruded films elaborated in presence of ethanol with different amount of glycerol and conditioned at 65 and 80 % of relative humidity (*RH*) at 25°C are presented in Fig. 2b and c. Whatever the amount of glycerol, only a glass transition event is observed in the DSC curves. In a qualitative point of view, results clearly demonstrate that increasing water amount moves backward the glass temperature (T_g) of films. As explained by Lourdin *et al.*, the decrease of T_g is due to the combined effect of glycerol and water on the sodium caseinate chains mobility [30]. Indeed, water molecules can form strong interactions with

the specific sites of sodium caseinate chains leading to weaken the intermolecular and intramolecular hydrogen bonds of the polymer and to increase then the polymer chains mobility. However, the extent of T_g variation observed for the dried samples as a function of glycerol amount in the film significantly decreases as the RH increases. As the amount of water sorbed in the film is dependent at once on the amount of plasticizer and the relative humidity, the evolutions of glass transition temperature as a function of the weight fraction of water in the film (determined from water sorption analysis) are represented in Fig. 3.

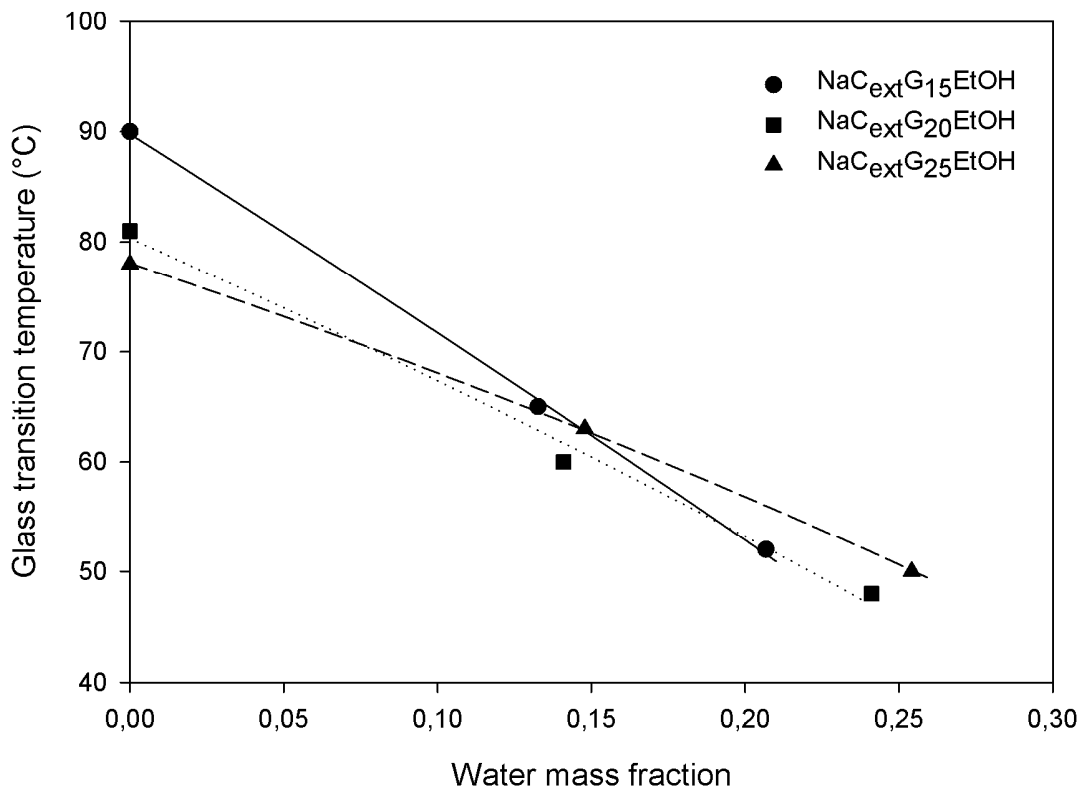


Figure 3 : Evolution of the obtained glass transition temperature as a function of the mass fraction in the NaC thermoplastic films plasticized with 15%; 20%; and 25% of glycerol (Experimental points and fit lines).

For all films, the same general trend is observed: T_g decreases as the water weight fraction in the film increases. The Gordon Taylor model was used to predict the dependence of T_g as a function of the water weight fraction using the following equation:

$$T_g = \frac{(1 - x_w) \cdot T_{g(as)} + k \cdot x_w \cdot T_{g(w)}}{(1 - x_w) + k \cdot x_w} \quad (\text{Eq. 6})$$

where x_w is the weight fraction of water, $T_{g(as)}$ and $T_{g(w)}$ are the glass transition temperature of the dry polymer plasticized with glycerol and the glass transition temperature of pure water $T_{g(w)} = -135^\circ\text{C}$ [31] and k is an empirical parameter. The obtained values of k and r^2 (the coefficient of determination) are presented in table 1. The r^2 values are close to unity indicating that the model is suitable and allows an accurate description of the experimental data. The value of k decreases as the amount of glycerol in the film increases. This result can be explained by a decrease of the additional plasticization action of water with respect to the initial plasticization effect of glycerol when the amount of glycerol increases.

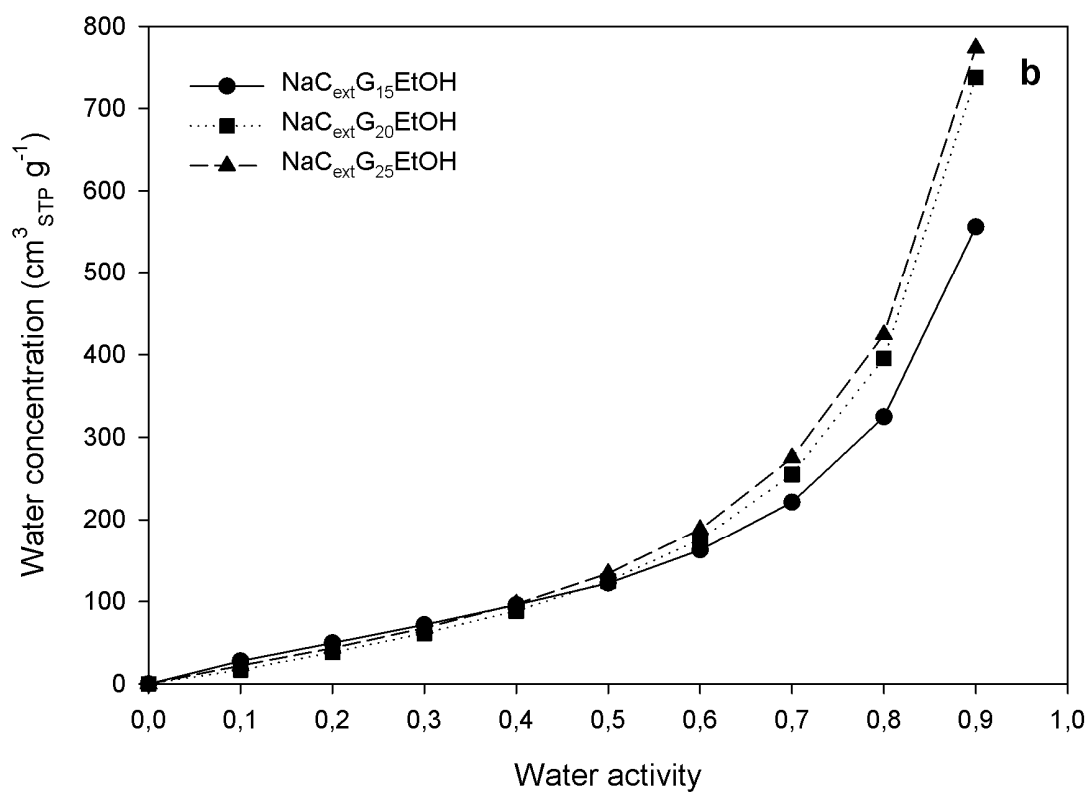
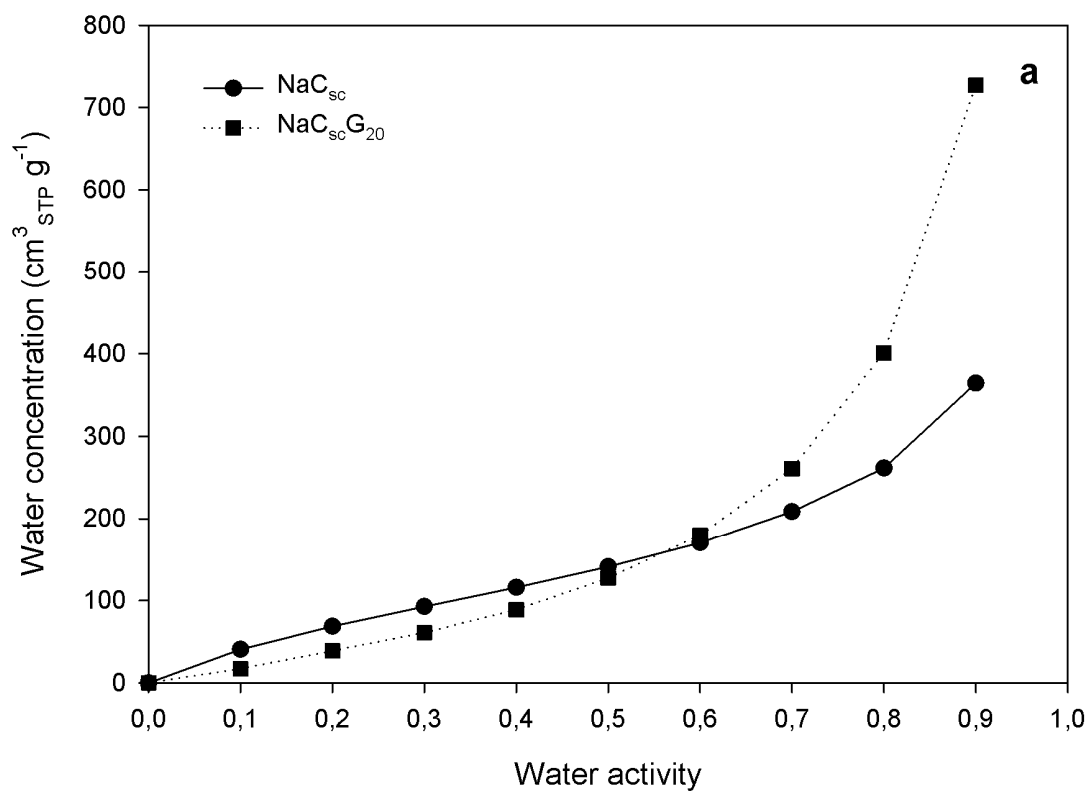
Tableau 1 : Water plasticization coefficient (k) determined by Gordon-Taylor equation for the NaC films with 15%, 20% or 25% glycerol.

| Glycerol content of sample | k | r^2 |
|----------------------------|------|-------|
| 15% | 0.79 | 0.999 |
| 20% | 0.58 | 0.992 |
| 25% | 0.44 | 1.000 |

IV.3.3. Water sorption isotherms

IV.3.3.1. Experimental data

Sorption isotherm curves of the different films are obtained by plotting the water concentration at equilibrium, C , versus the water activity, a_w . The sorption isotherms for the solvent cast non-plasticized film (NaC_{sc}) and plasticized film with 20% of glycerol ($\text{NaC}_{sc}\text{G}_{20}$) are represented in Fig. 4a. Sigmoidal shape corresponding to BET II in the classification of Brunauer–Emmett–Teller is observed[32]. The BET II model, which is a combination of dual-mode (Langmuir sorption and Henry law) and clustering contribution, is typical of water sorption in hydrophilic materials [33-35].



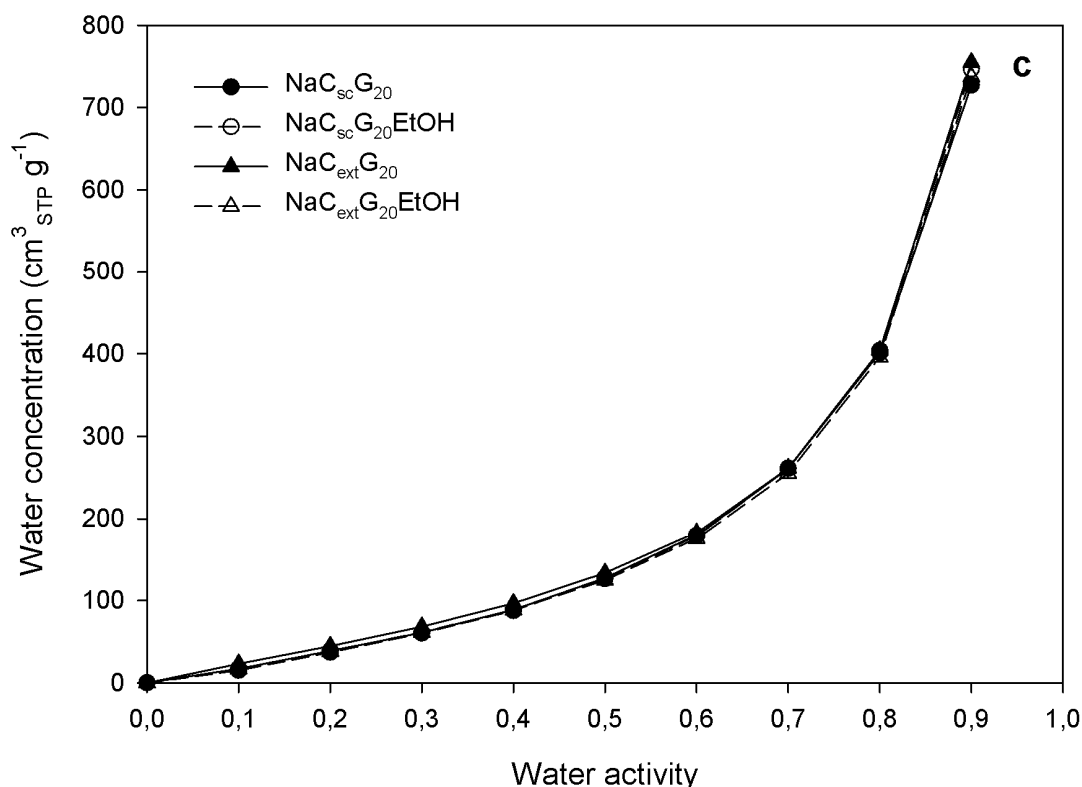


Figure 4 : Water sorption isotherms at 25 °C of (a) NaC non-plasticized solution cast film, NaC plasticized solution cast film with 20% glycerol processed without ethanol; (b) NaC plasticized extruded films with 15%, 20% and 25% glycerol processed with ethanol; (c) NaC plasticized solution cast films and NaC plasticized extruded films with 20% glycerol processed with or without ethanol

The first part of the isotherm presents a concave form, which is usually analysed as the sorption step corresponding to the formation of the primary hydration sphere of the specific sites of sodium caseinate which act as Langmuir sites. The second part is linear and corresponds to a Henry sorption mode. The last part of the isotherm presents a convex form, which can be explained by the formation of water clustering[36-38]. At low water activity ($a_w < 0.6$), the water uptake is lower for the plasticized film compared to the non-plasticized film. Similar behaviour has been reported in the literature for water uptake study of non-plasticized and plasticized potato starch films [39-42]. The decrease of water uptake of the plasticized film is related to a decrease of the available polar groups in the presence glycerol molecules. Indeed OH groups of glycerol

could form hydrogen bonds with CO and NH groups of sodium caseinate, which led to decrease the amount of sorption specific sites. At high water activity ($a_w > 0.6$), the water uptake of the plasticized film is higher compared to that of the non-plasticized film. The water sorbed molecules weaken the glycerol-sodium caseinate hydrogen bonds leading to an enhancement of the molecular mobility of the polymer chains and an increase of the free volume in the presence of glycerol. Furthermore, glycerol which is a hydrophilic molecule is able to interact with water by hydrogen bonds and participates then also to the water sorption process.

The influence of the amount of plasticizer in the extruded films prepared in presence of ethanol was investigated. The water sorption isotherms of the films containing 15, 20 and 25 wt% of glycerol are represented in Fig. 4b. At low water activity ($a_w < 0.5$), whatever is the amount of plasticizer used for this study, the water uptake seems to be identical. At higher water activity ($a_w > 0.5$), the water uptake of the film increases as the amount of glycerol increases. As explained previously, this result could be attributed to the hydrophilic character of glycerol molecules which are able to interact with water. It can be also noticed that the difference of water uptake is more important between plasticized films with 15 and 20 wt% of glycerol than plasticized films with 20 and 25 wt% of glycerol. This behaviour has also been observed by Enrione *et al.*[43] for waxy maize starch and rice starch plasticized by glycerol.

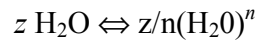
The influences of the elaboration method and the presence of ethanol in the film process were also investigated. The water isotherms of the solvent cast films and the extruded films with 20% of glycerol processed in presence and in absence of ethanol are represented in Fig. 4c. The experimental data defined a single water sorption isotherm curve. Thus, the water uptake of the plasticized caseinate films is unaffected by the elaboration method and also by the addition of ethanol molecules during the film process. It can be concluded that the addition of ethanol which is a hydrophilic molecule and which is known as a denaturing agent of protein does not have an influence on the water sorption uptake. So, ethanol molecules which have been used to decrease the viscosity during the melting process seem to be completely evaporated in the degassing zone of twin-screw extruder for the extruded films. Moreover and as shown by the previously discussed XRD data, using ethanol molecules in the extrusion step does not induce significant modification of the protein structure within the film.

IV.3.3.2. Mathematical modeling

To obtain more information concerning the sorption model and the possible interactions between water molecules and the sodium caseinate films, Park equation was used to model the water sorption isotherms of Fig 4. The equation of Park model comprises three terms[36, 44]:

$$C = \frac{A_L \cdot b_L \cdot a_w}{1 + b_L \cdot a_w} + k_H \cdot a_w + \frac{K_a \cdot k_H^n}{n} \cdot a_w^n \quad (\text{Eq. 7})$$

The first term describes Langmuir sorption which leads to a plateau of concentration when water activity increases, corresponding to the saturation of the specific sites of sorption. Langmuir's terms, A_L , (Langmuir capacity constant) and b_L (Langmuir affinity constant) have an influence in the first step of water sorption, at low water activity. The second term gives a water concentration which increases linearly with water activity (Henry's law). Henry's solubility coefficient, k_H , defines the slope of the isotherm in the second zone. The third term is a power function which represents the water aggregation phenomenon. K_a , the equilibrium constant for the clustering reaction and, n , the mean number of water molecules per cluster can be linked to the equilibrium state corresponding to the aggregate formation in the last zone at high water activity:



with z , the total number of water molecules sorbed.

To evaluate the accuracy of Park model to describe the experimental water sorption isotherms of our different films, the mean relative percentage deviation modulus (MRD) was used. It is defined by:

$$MRD(\%) = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|m_i - m_{pi}|}{m_i} \quad (\text{Eq. 8})$$

where m_i is the experimental value, m_{pi} is the predicted value, and N is the number of experimental data. Example of the decomposition of the water sorption isotherm of the NaC_{sc} film in the three sorption modes of Park model is represented in Fig 5 and all the obtained parameters for all films are given in Table 2. Firstly, examination of MRD indicates that the model is suitable and allows an accurate description of the experimental sorption isotherms.

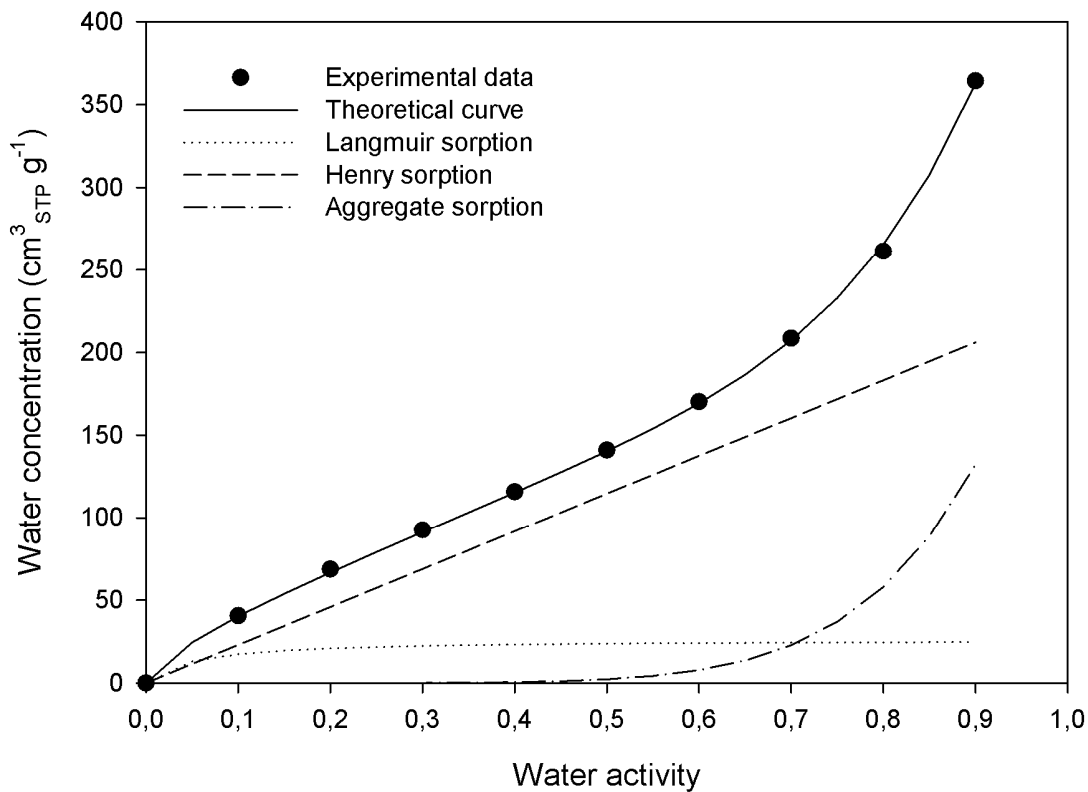


Figure 5 : Water sorption isotherms at 25 °C of NaC non-plasticized solution cast film (Experimental points and calculated curves from Park's equation).

In the present case, it was not possible to give values of Langmuir parameters with a good accuracy because of the lack of numerous experimental points for water activity inferior to 0.1 and also to the slight concavity of the curve for the plasticized films. So, values of A_L and b_L , were given only for the non-plasticized film (NaC_{sc}). However, it can be supposed that the values of A_L and b_L for the plasticized films are close to zero, due to a decrease in the concentration of available polar sites as explained previously. The k_H parameter defined as the random absorption of the water molecules in the materials is identical whatever is the film elaboration process or the presence or not of ethanol molecules during the film process. Concerning the effect of the amount of plasticizer on the extruded films realized in presence of ethanol molecules, for a glycerol amount below 20 wt%, the k_H is in the same order of magnitude (230-235) but is slightly higher for the plasticized film with 25 wt% of glycerol (246). Concerning the aggregate parameters, the

mean number of water molecules forming an aggregate, n , is identical and equal to 7 for all films. The value of the equilibrium constant for clustering reaction, K_a , is identical whatever is the film elaboration process and the presence or not of ethanol molecules during the film process for the plasticized films with 20 wt% of glycerol. Furthermore, K_a value is lower for the non-plasticized film compared to the values of the plasticized films. Nevertheless, the evolution of K_a values as the function of the amount of plasticizer in the films does not show a linear evolution. However, the term $\frac{K_a \cdot k_H^n}{n}$ was calculated for the all films and the obtained values increase as the amount of plasticizer increases and are equal to 276, 770, 1120 and 1150, for 0, 15, 20 and 25 wt% of glycerol in the film, respectively. The determination of these aggregate parameters traduces a similar number of water molecules per cluster for the all films but a higher ability to form the water clusters and so a higher number of clusters as the amount of plasticizer increases.

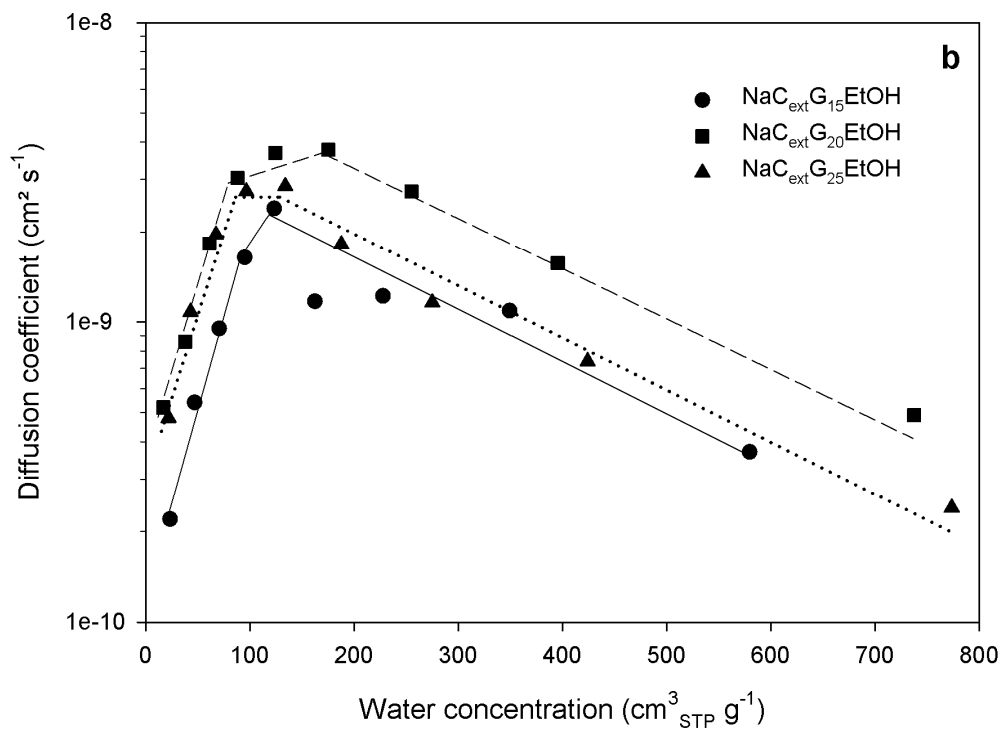
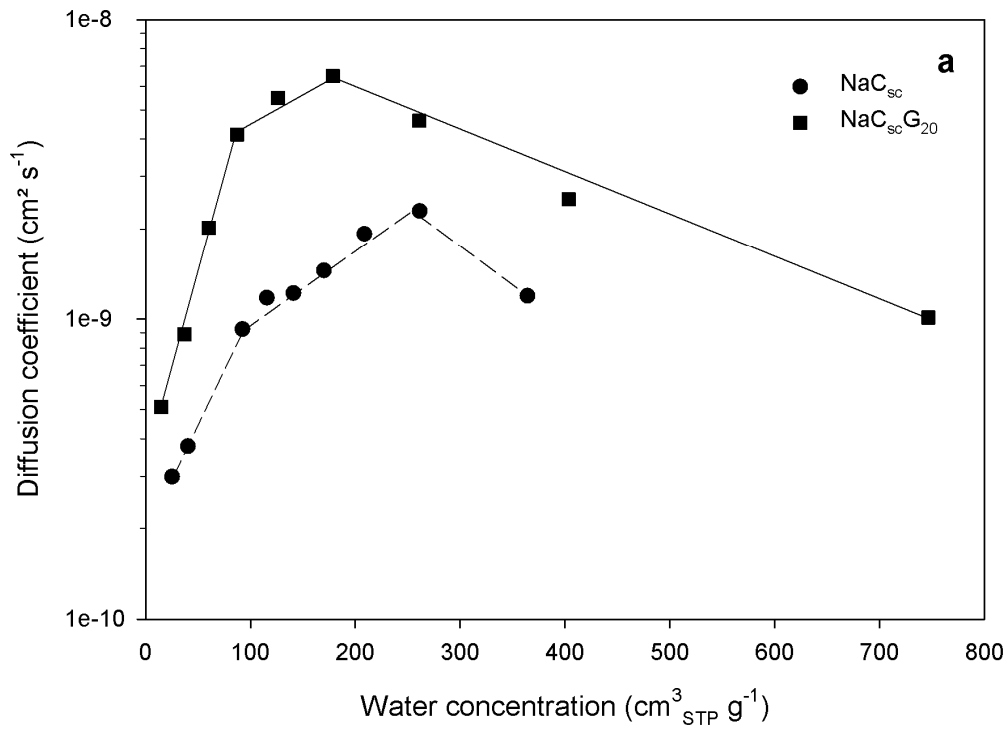
Tableau 2 : Park model parameters of the NaC films

| Samples | A_L | b_L | K_H | $K_a \times 10^{13}$ | n | MRD(%) |
|---|-------|-------|-------|----------------------|-----|--------|
| NaC _{sc} | 26 | 20 | 229 | 0.6 | 7.0 | 1.2 |
| NaC _{sc} G ₂₀ | - | - | 230 | 2.3 | 7.0 | 10.0 |
| NaC _{sc} G ₂₀ EtOH | - | - | 228 | 2.4 | 7.0 | 12.7 |
| NaC _{ext} G ₂₀ | - | - | 230 | 2.3 | 7.0 | 3.5 |
| NaC _{ext} G ₂₀ EtOH | - | - | 230 | 2.3 | 7.0 | 9.9 |
| NaC _{ext} G ₁₅ EtOH | - | - | 235 | 1.4 | 7.0 | 4.3 |
| NaC _{ext} G ₂₅ EtOH | - | - | 246 | 1.5 | 7.0 | 5.7 |

IV.3.4. Water Sorption kinetics

The diffusion coefficient values are reported for different activities in Table 3. It could be observed that, for a given system, the water diffusion coefficient is not constant in all the range of activity, meaning that D is dependent on the amount of water molecules sorbed by the films.

Semi-log plots of the water diffusion coefficient as a function of the concentration of water sorbed at equilibrium are shown in Fig. 6.



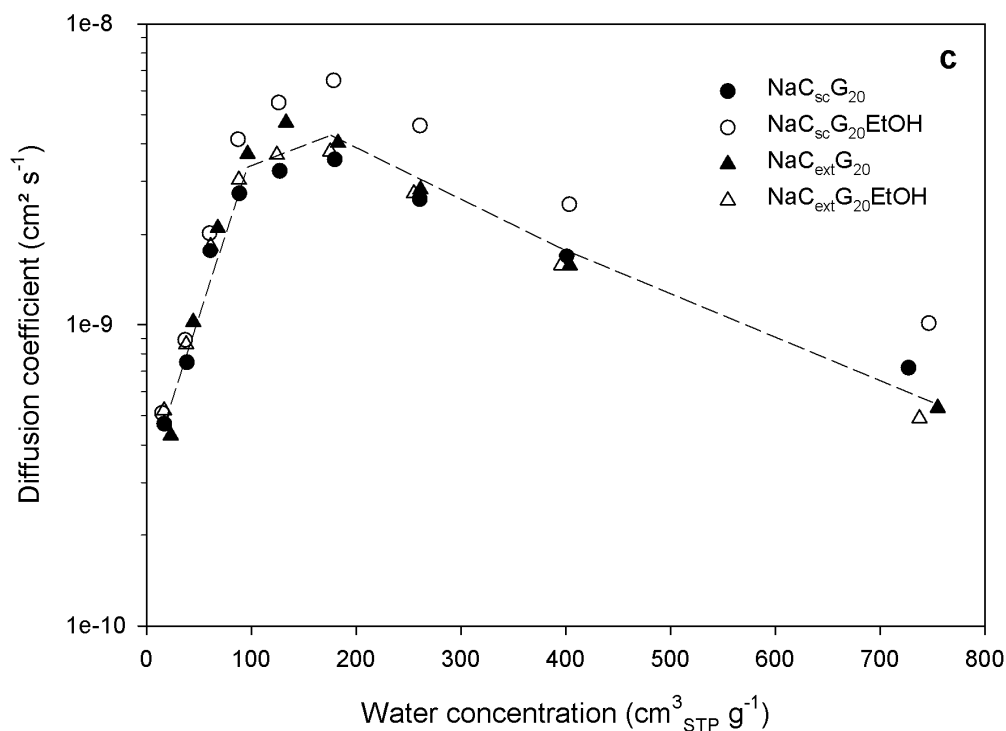


Figure 6 : Evolution of water diffusion coefficient as a function of water concentration at 25 °C of :(a) NaC non-plasticized solvent cast film, NaC solvent cast plasticized film with 20% glycerol processed without ethanol; (b) NaC extruded plasticized films with 15%, 20% and 25% glycerol processed with ethanol; (c). NaC solution plasticized casting films and NaC plasticized extruded films with 20% glycerol processed with or without ethanol.

Whatever is the formulation and the elaboration process, the same general shape of curve is observed (Fig. 6c). Three domains can be distinguished: firstly, the water diffusion coefficient increases hugely in the water concentration range below 80 cm³ STP g⁻¹, then slightly increases up to 180 cm³ STP g⁻¹ for the plasticized films (Fig. 6b et c) and up to 260 cm³ STP g⁻¹ for the non-plasticized film (Fig. 6a) and finally decreases. These variations are in agreement with the water sorption mechanism complying with the model of Park. At low water activity, the increase of water diffusion could be explained by the dual mode sorption: the first water molecules sorbed in Langmuir's sites are partially or totally immobilized and next the Henry's sorption contribution became predominant, so that water diffusivity increased due to further molecular mobility. At high activity, the decrease of water diffusion coefficient could be attributed to the water

clustering phenomenon and the maximum in the diffusion coefficient is generally related to the onset of this phenomenon [45].

Tableau 3 : Water diffusion coefficient, D , of the NaC films.

| Samples | $D \times 10^{10} \text{ (cm}^2\text{s}^{-1}\text{)}$ | | | | | | | | | |
|--|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--|
| | $a_w=0.1$ | $a_w=0.2$ | $a_w=0.3$ | $a_w=0.4$ | $a_w=0.5$ | $a_w=0.6$ | $a_w=0.7$ | $a_w=0.8$ | $a_w=0.9$ | |
| NaC_{sc} | 3.9 | 3.1 | 8.7 | 9.6 | 9.2 | 11.8 | 18.4 | 25.0 | 12.8 | |
| NaC_{sc}G₂₀ | 4.7 | 7.5 | 17.6 | 27.4 | 32.5 | 35.5 | 26.2 | 16.9 | 7.2 | |
| NaC_{sc}G₂₀EtOH | 5.1 | 8.9 | 20.2 | 41.4 | 54.8 | 64.9 | 46.0 | 25.2 | 10.1 | |
| NaC_{ext}G₂₀ | 4.3 | 10.2 | 21.0 | 37.0 | 47.0 | 40.3 | 28.2 | 15.7 | 5.3 | |
| NaC_{ext}G₂₀EtOH | 5.2 | 8.6 | 18.3 | 30.4 | 36.8 | 37.7 | 27.4 | 15.7 | 4.9 | |
| NaC_{ext}G₁₅EtOH | 2.2 | 5.4 | 9.5 | 16.4 | 24.0 | 11.7 | 12.2 | 10.9 | 3.7 | |
| NaC_{ext}G₂₅EtOH | 4.8 | 10.8 | 19.6 | 27.4 | 28.5 | 18.2 | 11.6 | 7.4 | 2.4 | |

In the low range of water concentration, typically below $80\text{cm}^3_{\text{STP}}\text{g}^{-1}$, the increase of water diffusion as a function of the water concentration at equilibrium is generally related to a plasticization phenomenon. This phenomenon could be described by the following relationship:

$$D = D_0 \exp(\gamma C) \quad (\text{Eq. 9})$$

where D_0 is the limit diffusion coefficient defined at nil concentration in cm^2s^{-1} and can give information on the microstructure of the materials, γ is the plasticization coefficient in $\text{gcm}^{-3}_{\text{STP}}$, and C is the water concentration at equilibrium in $\text{cm}^3_{\text{STP}}\text{g}^{-1}$. The parameters of Eq. (9), D_0 , and γ were deduced from a linear regression of the curve at low water concentration. The obtained values of the parameters are D_0 and γ are reported in table 4.

Tableau 4 : Values of the limit diffusion coefficient D_0 , the plasticization coefficient γ , and the anti-plasticization coefficient β of the NaC films.

| Samples | $D_0 \times 10^{10}$ ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) | $\gamma \times 10^2$ (gcm^{-3}_{STP}) | $\beta \times 10^3$ (gcm^{-3}_{STP}) |
|--|---|---|--|
| NaC_{sc} | 1.9 | 0.73 | 2.77 |
| NaC_{sc}G₂₀ | 2.7 | 1.31 | 1.44 |
| NaC_{sc}G₂₀EtOH | 3.1 | 1.32 | 1.32 |
| NaC_{ext}G₂₀ | 2.5 | 1.27 | 1.45 |
| NaC_{ext}G₂₀EtOH | 3.1 | 1.23 | 1.54 |
| NaC_{ext}G₁₅EtOH | 1.1 | 1.35 | 1.55 |
| NaC_{ext}G₂₅EtOH | 2.6 | 1.34 | 1.38 |

Taking into account the uncertainty of the determination of D_0 and γ , it can be concluded that for the plasticized films independently of the film elaboration process and the presence or not of ethanol during the film process, the values of D_0 and γ are close to each other and are equal to $1.30 \pm 0.04 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $2.8 \pm 0.3 \times 10^{-2} \text{ gcm}^{-3}_{STP}$, respectively. For the non-plasticized film, a decrease in the values of D_0 and γ is observed. Obtained values for respective parameters are equal to $1.9 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $0.73 \times 10^{-2} \text{ gcm}^{-3}_{STP}$. The increase of D_0 which represented the diffusion of the first water molecules in the film in absence of concentration dependency for the plasticized film could be explained by a lower concentration of Langmuir sites for the plasticized films and also by an increase of the polymer chain mobility in presence of plasticizer. In the middle range of water concentration, plasticized and non-plasticized films series exhibited the same behaviours. The water diffusion rate increases up to a water concentration of $180 \text{ cm}^3 \text{ STP g}^{-1}$ and $260 \text{ cm}^3 \text{ STP g}^{-1}$ for the plasticized films and the non-plasticized film respectively (Fig. 6a). According to these data and in agreement with the shape of the sorption isotherms, it seemed that the clustering phenomenon occurred at lower activity and for a lower amount of sorbed water for the plasticized films than for the non-plasticized film. It can be concluded that a lower amount

of water was needed in plasticized films to observe water aggregation phenomenon and a subsequent decrease of the water diffusion rate [35]. At high water concentration, the decrease of water diffusion coefficient could be attributed to the water clustering phenomenon [46]. This anti-plasticization phenomenon could be expressed by the following relation:

$$D = D_{agg} \exp(\beta C) \quad (\text{Eq. 10})$$

where D_{agg} is the limit diffusion aggregation coefficient at nil concentration. β is the anti-plasticization coefficient in $\text{g cm}^{-3}_{\text{STP}}$, and C is the water concentration at equilibrium in $\text{cm}^3_{\text{STP}} \text{g}^{-1}$. The parameters of the aggregate phenomenon, D_{agg} and β , were calculated but the values of D_{agg} were not reported because the aggregation phenomenon did not begin at nil concentration. The values of β are presented in Table 4. β values are in the same range order for the plasticized films ($1.45 \pm 0.09 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}_{\text{STP}}$), showing that no significant differences could be distinguished in the clustering phenomenon as a function of the film composition and the elaboration process. The obtained value of β for the non-plasticized film is higher $2.77 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}_{\text{STP}}$ compared to those of the plasticized films. However, none conclusion can be clearly done due to the few experimental data used to determine the value of β for the non-plasticized film (only 2 data).

IV.3.5. Water vapor permeability

Water permeability properties of the films were determined as a function of the film processing route and conditions (presence or absence of ethanol during the film process). In all cases the amount of plasticizer was 20 wt%. A semi-log plot of the water permeability at 23 °C as a function of the water activity is shown in Fig. 7. The obtained values of water permeability are in a good agreement with those obtained by Moditsi *et al.*[47] and Broumand *et al.*[48]. For all systems, the same general trend is observed: the water permeability coefficient first slightly increases in the range of water activity from 0.3 to 0.45 (1.4×10^{-9} and $4.5 \times 10^{-9} \text{ cm}^3 \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ for $a_w = 0.30$ and 0.45 respectively) and then exponentially increases for higher activity ($42.5 \times 10^{-9} \text{ cm}^3 \text{ g m m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ for $a_w = 0.7$). This variation could be related to the general water sorption mechanism discussed previously and also to the increase of chains mobility at high water activity. Indeed, the polymer is increasingly plasticized by the sorbed water molecules, resulting in the increase of the water permeability. At high water activity, the water sorption capacity strongly

increases in the films resulting in the formation of water clusters and in the decrease of the cohesive energy density of the polymer. In the activity range used in this study (from 0.3 to 0.7) and by taking into account the measurement errors, it can be concluded that the water permeation properties of the films are independent on the elaboration mode process and on the use of ethanol molecules during the film process.

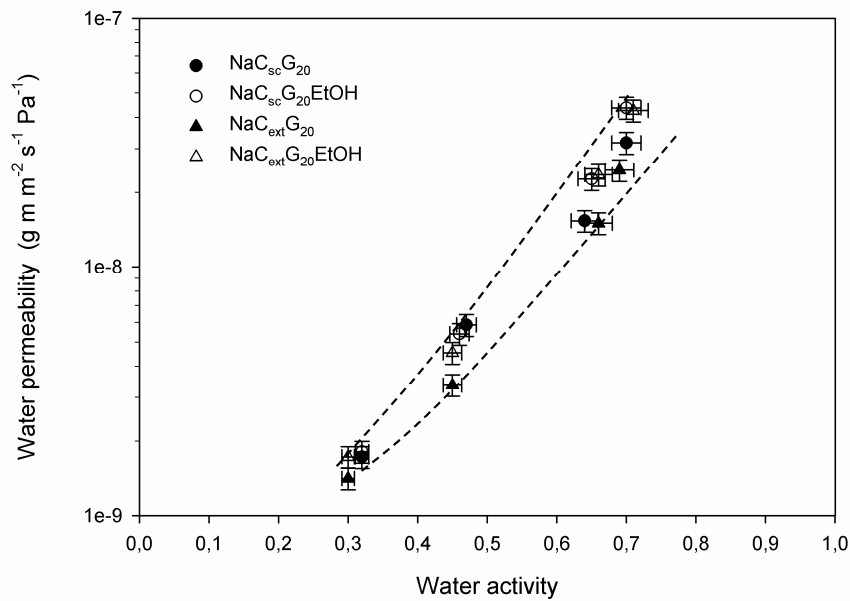


Figure 7 : Evolution of water vapor permeability coefficient of the NaC plasticized films with 20% of glycerol as a function of the water activity

IV.3.6. Oxygen permeability

Oxygen permeability properties of the films were determined as a function of the film processing route and conditions (use or not of ethanol molecules during the film process). In all cases the amount of plasticizer was 20 wt%. A semi-log plot of the oxygen permeability at 23°C as a function of the water activity is shown in Fig. 8. The obtained values of oxygen permeability ($a_w < 0.5$) are in the same order of magnitude when compared to values obtained under anhydrous conditions (25°C) for gluten[5] or soy protein isolate films[49] plasticized with almost 30% glycerol. Also, sodium caseinate films in the present study, showed comparable values of oxygen

permeability with polyesters and two orders of magnitude lower values than low density polyethylene films[49].

For all the systems, the same general trend is observed: P_{O_2} first tends to increase slightly in the range of water activity from 0.35 to 0.5 (4.5 and 11.4 $\text{cm}^3 \mu\text{m m}^{-2} \text{day}^{-1} \text{kPa}^{-1}$ for $a_w = 0.35$ and 0.5 respectively) and then exponentially increases for higher activity (around 124.4 $\text{cm}^3 \mu\text{m m}^{-2} \text{day}^{-1} \text{kPa}^{-1}$ for $a_w = 0.75$). Similar behaviours were reported in the literature for plasticized casein and modified casein films[50]. With the increase of water activity, as observed from the water sorption isotherms of films, the amount of water in the films increases and tends to weaken the intermolecular and intramolecular hydrogen bonding leading to a drastic decrease of the cohesive energy density of the polymer. Thus segmental motion of the caseinate chain increases by mean of plasticization effect and a large increase of oxygen permeability is observed. As previously seen for the water permeability properties, the oxygen permeation properties of the films are independent of the elaboration mode process and of the presence of ethanol molecules during the film process.

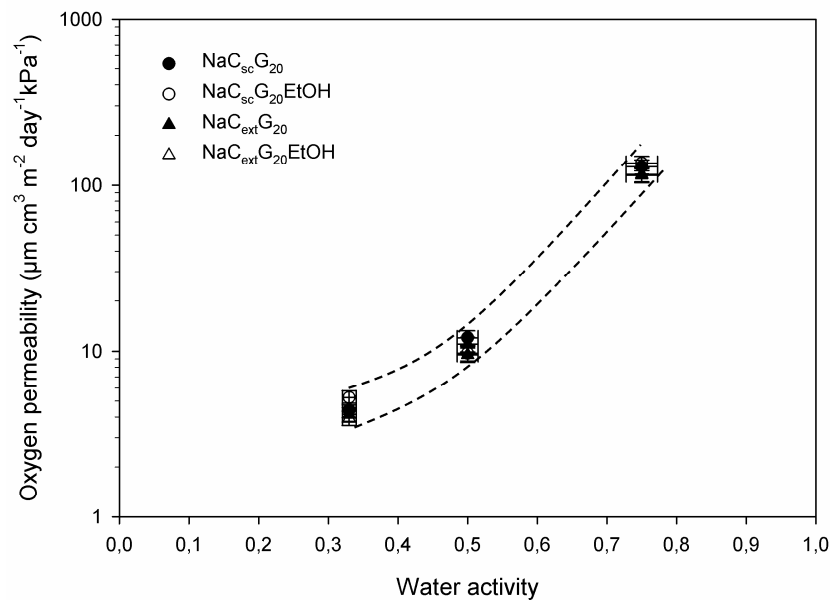


Figure 8 : Evolution of oxygen permeability coefficient of the NaC plasticized films with 20% of glycerol as a function of the water activity

IV.4. Conclusion

In this study, defect free, dense and non-brittle films of glycerol plasticized caseinate were successfully prepared according two different routes: solvent cast process and blown extrusion process, respectively. The present results emphasize that the type of fabrication process had no significant effect on oxygen and water vapor permeability of the resulting films. Moreover, it was shown that the use of ethanol as protein denaturing agent in order to facilitate the extrusion process did not lead to any consequences (neither on the polymer structural organization within the final film nor on the final gas and water transport properties). In the film series under study, the most influencing parameter on water sorption and water diffusion was the glycerol content. Glycerol-containing films showed slightly higher diffusion coefficients than glycerol-free films in all the range of water activity. In comparison with glycerol free films, glycerol plasticized films exhibited lower water uptake at low activity but higher water uptake at high activity. A detailed analysis of the water sorption mechanism based on the isotherm modeling by Park equation and on the study of the evolution of the diffusion coefficients in all the range of activity allowed to discuss the respective plasticizing effect of glycerol and water, on one hand and the ability of water molecules to form clusters within the material, on the other hand. A critical water concentration value, from which water aggregation occurred was, in particular, clearly identified for each studied film. Evaluating the thermal properties of the films as a function of glycerol content and sorbed water content provided also valuable information on plasticization of sodium caseinate. Glycerol by own decreased the glass transition temperature of sodium caseinate films. However, the analysis of the glass transition temperature evolution thanks to Gordon-Taylor equation showed that the ability of water as a plasticizer diminished with increasing contents of glycerol.

Here, it is successfully demonstrated that edible, flexible blown films based on sodium caseinate are promising packaging materials. The properties of these totally bio-sourced films can be modulated depending on the content and nature of plasticizer without being notably affected by manufacturing methods. This represents a major interest for packaging industry since these films can either be applied as solution-based coatings or be used as thermoplastic free-standing films.

IV.5. Acknowledgement

The authors would like to thank Region Rhône-Alpes for financing the Ph D thesis of Basak Yilin Colak and Fonds pour le Développement de la Recherche du technopole Alimentec for partially funding this project. We would like to thank also Centre de Diffractométrie HENRI LONGCHAMBON and Ruben Vera for XRD analysis and technical assistance.

IV.6. References

- [1] J.M. Krochta, Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, current status and opportunities. , in: A. Gennadios (Ed.) Protein-Based Edible Films and Coatings, CRC Press, Boca Raton, 2002, pp. 1-43.
- [2] J.H. Han, Antimicrobial packaging systems, in: J.H. Han (Ed.) Innovations in food packaging, Elsevier, 2005, pp. 80-107.
- [3] H. Chen, Functional properties and applications of edible films made of milk proteins, *Journal of Dairy Science*, 78 (1995) 2563-2583.
- [4] A. Gennadios, C.L. Weller, R.F. Testin, PROPERTY MODIFICATION OF EDIBLE WHEAT, GLUTEN-BASED FILMS, *Transactions of the Asae*, 36 (1993) 465-470.
- [5] A. Gennadios, C.L. Weller, R.F. Testin, TEMPERATURE EFFECT ON OXYGEN PERMEABILITY OF EDIBLE PROTEIN-BASED FILMS, *Journal of Food Science*, 58 (1993) 212-+.
- [6] J.L. Audic, B. Chaufer, Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate, *European Polymer Journal*, 41 (2005) 1934-1942.
- [7] S. Despond, E. Espuche, N. Cartier, A. Domard, Hydration mechanism of polysaccharides: A comparative study, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 43 (2005) 48-58.
- [8] S. Despond, E. Espuche, A. Domard, Water sorption and permeation in chitosan films: Relation between gas permeability and relative humidity, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 39 (2001) 3114-3127.
- [9] C. Tual, E. Espuche, M. Escoubes, A. Domard, Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 38 (2000) 1521-1529.
- [10] S. Guilbert, N. Gontard, Agropolymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics in: J.H. Han (Ed.) *Innovations In Food Packaging*, Elsevier, CA, 2005, pp. 263-276.
- [11] R.J. Avenabustillos, J.M. Krochta, WATER-VAPOR PERMEABILITY OF CASEINATE-BASED EDIBLE FILMS AS AFFECTED BY PH, CALCIUM CROSS-LINKING AND LIPID-CONTENT, *Journal of Food Science*, 58 (1993) 904-907.
- [12] J.M. Krochta, C. De Mulder-Johnston, Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities, *Food Technology*, 51 (1997) 61-74.
- [13] I. Belyamani, F. Prochazka, G. Assezat, Production and characterization of sodium caseinate edible films made by blown-film extrusion, *Journal of Food Engineering*, 121 (2014) 39-47.
- [14] S. Mezdour, P. Boyaval, J. Korolczuk, Solubility of alpha(S1)-, beta- and kappa-casein in water-ethanol solutions, *Dairy Science & Technology*, 88 (2008) 313-325.
- [15] N. Gontard, S. Guilbert, J.L. Cuq, EDIBLE WHEAT GLUTEN FILMS - INFLUENCE OF THE MAIN PROCESS VARIABLES ON FILM PROPERTIES USING RESPONSE-SURFACE METHODOLOGY, *Journal of Food Science*, 57 (1992) 190-&.
- [16] M.K. Haque, Y.H. Roos, Water sorption and plasticization behavior of spray-dried lactose/protein mixtures, *Journal of Food Science*, 69 (2004) E384-E391.

- [17] K. Khwaldia, S. Banon, S. Desobry, J. Hardy, Mechanical and barrier properties of sodium caseinate-anhydrous milk fat edible films, *International Journal of Food Science and Technology*, 39 (2004) 403-411.
- [18] E. Kristo, C.G. Biliaderis, Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate-pullulan bilayers and blends, *Food Hydrocolloids*, 20 (2006) 1057-1071.
- [19] M.J. Fabra, P. Talens, A. Chiralt, Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions, *Food Hydrocolloids*, 24 (2010) 384-391.
- [20] Z.M. Gao, L.P. Zhu, X.Q. Yang, X.T. He, J.M. Wang, J. Guo, J.R. Qi, L.J. Wang, S.W. Yin, Soy lipophilic protein nanoparticles as a novel delivery vehicle for conjugated linoleic acid, *Food & Function*, 5 (2014) 1286-1293.
- [21] A. Tanioka, K. Miyasaka, K. Ishikawa, RECONSTITUTION OF COLLAGEN-FOLD STRUCTURE WITH STRETCHING OF GELATIN FILM, *Biopolymers*, 15 (1976) 1505-1511.
- [22] S. Rivero, M.A. Garcia, A. Pinotti, Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11 (2010) 369-375.
- [23] A. Bigi, S. Panzavolta, K. Rubini, Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films, *Biomaterials*, 25 (2004) 5675-5680.
- [24] R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, A. Zagari, Crystal structure of the collagen triple helix model (Pro-Pro-Gly)(10) (3), *Protein Science*, 11 (2002) 262-270.
- [25] P. Cayot, D. Lorient, *Structures et technofonctions des protéines du lait*, Lavoisier, Paris, 1998.
- [26] P. Dole, C. Joly, E. Espuche, I. Alric, N. Gontard, Gas transport properties of starch based films, *Carbohydrate Polymers*, 58 (2004) 335-343.
- [27] I.S. Arvanitoyannis, A. Nakayama, S. Aiba, Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties, *Carbohydrate Polymers*, 37 (1998) 371-382.
- [28] P.L.M. Barreto, J. Roeder, J.S. Crespo, G.R. Maciel, H. Terenzi, A.T.N. Pires, V. Soldi, Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films, *Food Chemistry*, 82 (2003) 425-431.
- [29] K. Gekko, S.N. Timasheff, MECHANISM OF PROTEIN STABILIZATION BY GLYCEROL - PREFERENTIAL HYDRATION IN GLYCEROL-WATER MIXTURES, *Biochemistry*, 20 (1981) 4667-4676.
- [30] D. Lourdin, L. Coignard, H. Bizot, P. Colonna, Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials, *Polymer*, 38 (1997) 5401-5406.
- [31] C.A. Angell, Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions, *Chemical Reviews*, 102 (2002) 2627-2649.
- [32] S. Brunauer, L.S. Deming, W.E. Deming, E. Teller, On a theory of the van der Waals adsorption of gases, *Journal of the American Chemical Society*, 62 (1940) 1723-1732.
- [33] N.N. Hellman, T.F. Boesch, E.H. Melvin, STARCH GRANULE SWELLING IN WATER VAPOR SORPTION, *Journal of the American Chemical Society*, 74 (1952) 348-350.

- [34] H. Gocho, H. Shimizu, A. Tanioka, T.J. Chou, T. Nakajima, Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 41 (2000) 87-90.
- [35] C. Masclaux, F. Gouanve, E. Espuche, Experimental and modelling studies of transport in starch nanocomposite films as affected by relative humidity, *Journal of Membrane Science*, 363 (2010) 221-231.
- [36] V. Detallante, D. Langevin, C. Chappey, M. Metayer, R. Mercier, M. Pineri, Water vapor sorption in naphthalenic sulfonated polyimide membranes, *Journal of Membrane Science*, 190 (2001) 227-241.
- [37] F. Gouanve, S. Marais, A. Bessadok, D. Langevin, M. Metayer, Kinetics of water sorption in flax and PET fibers, *European Polymer Journal*, 43 (2007) 586-598.
- [38] P.E. Rouse, DIFFUSION OF VAPORS IN FILMS, *Journal of the American Chemical Society*, 69 (1947) 1068-1073.
- [39] M.F. Huang, J.G. Yu, X.F. Ma, High mechanical performance MMT-urea and formamide-plasticized thermoplastic cornstarch biodegradable nanocomposites, *Carbohydrate Polymers*, 63 (2006) 393-399.
- [40] X.F. Ma, J.G. Yu, J.J. Wan, Urea and ethanolamine as a mixed plasticizer for thermoplastic starch, *Carbohydrate Polymers*, 64 (2006) 267-273.
- [41] R.A. Talja, H. Helen, Y.H. Roos, K. Jouppila, Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films, *Carbohydrate Polymers*, 67 (2007) 288-295.
- [42] S. Mali, L.S. Sakanaka, F. Yamashita, M.V.E. Grossmann, Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect, *Carbohydrate Polymers*, 60 (2005) 283-289.
- [43] J.I. Enrione, S.E. Hill, J.R. Mitchell, Sorption and diffusional studies of extruded waxy maize starch-glycerol systems, *Starch-Starke*, 59 (2007) 1-9.
- [44] G.S. Park, Transport principles-solution, diffusion and permeation in polymer membranes, in: P.M. Bungay (Ed.) *Synthetic Membranes: Science, Engineering and Applications*, Reidel, Holland, 1986, pp. 57-107.
- [45] V.T. Stannett, G.R. Ranade, W.J. Koros, CHARACTERIZATION OF WATER-VAPOR TRANSPORT IN GLASSY POLYACRYLONITRILE BY COMBINED PERMEATION AND SORPTION TECHNIQUES, *Journal of Membrane Science*, 10 (1982) 219-233.
- [46] J.A. Barrie, B. Platt, THE DIFFUSION AND CLUSTERING OF WATER VAPOUR IN POLYMERS, *Polymer*, 4 (1963) 303-313.
- [47] M. Moditsi, A. Lazaridou, T. Moschakis, C.G. Biliaderis, Modifying the physical properties of dairy protein films for controlled release of antifungal agents, *Food Hydrocolloids*, 39 (2014) 195-203.
- [48] A. Broumand, Z. Emam-Djomeh, M. Hamed, S.H. Razavi, Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film, *Lwt-Food Science and Technology*, 44 (2011) 2316-2323.
- [49] K.S. Miller, J.M. Krochta, Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 8 (1997) 228-237.
- [50] P.M. Tomasula, W.C. Yee, N. Parris, Oxygen permeability of films made from CO₂-precipitated casein and modified casein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 634-639.

IV.7. Abstract

This study deals with water sorption characteristics and gas barrier properties of sodium caseinate based edible films as a function of processing type and processing additives. Two processing routes are adopted: solution casting and blown-film-extrusion. Two processing additives are used: glycerol as plasticizer and ethanol as protein denaturing agent. It is shown at first that the water and gas transport properties are neither affected by the processing technology nor by the use of ethanol during the fabrication step.

Water sorption and thermal properties of blown films prepared for glycerol contents varying from 15 to 25 wt% are then studied for a wide range of relative humidity. The determination of the water sorption isotherms and their modeling by Park's equation as well as the study of the water sorption kinetics parameters allow discussing the sorption mechanisms as a function of the respective plasticizing effect of glycerol and water, on one hand and of the ability of water molecules to form clusters within the material, on the other hand. The decrease of the glass transition temperature values of the films as a function of increasing water content is analyzed thanks to Gordon-Taylor equation and it is related to the respective plasticizing role of glycerol and water, as evidenced from water sorption analysis.

Keywords: sodium caseinate, extrusion, sorption isotherms, water diffusivity, gas permeability

CONCLUSION GENERALE

Conclusion Générale

Le principal rôle d'un emballage alimentaire est d'assurer la conservation intégrale des aliments en termes de qualité et d'hygiène, et ce, tout au long de la durée de vie du produit comprenant la production, la distribution, le stockage et la vente en rayons. Les emballages traditionnels permettent une protection passive des aliments mais ont une efficacité limitée par rapport au potentiel allongement de la durée de conservation qu'offriraient des emballages actifs intégrant des composés antimicrobiens pour allonger la durée de vie de produits frais rapidement périssables du fait de leur altération. De nos jours, cet allongement de la conservation serait particulièrement intéressant du fait des changements d'habitudes des consommateurs (par exemple l'accroissement de la consommation des aliments réfrigérés prêts à l'emploi) et de la mondialisation des marchés (qui peut engendrer de longues distances de distribution à parcourir nécessitant un allongement de la durée de vie des produits frais). En conséquence, le développement de systèmes d'emballage plus sophistiqués et performants en terme d'allongement de la durée de vie des produits frais tels que les emballages actifs antimicrobiens est particulièrement attendu. Ces systèmes contiennent un matériau de base qui contient des agents actifs présentant une activité antimicrobienne propre. Ils permettraient ainsi de contrôler la croissance des micro-organismes localisés à l'intérieur d'aliments liquides ou à la surface d'aliments solides. Dans la conception des emballages actifs antimicrobiens, le choix du matériau est une étape clé. Il doit protéger les bonnes propriétés organoleptiques de l'aliment par ses propriétés barrières et son rôle antimicrobien. Finalement, à la fin de vie de l'aliment, il doit aussi pouvoir limiter la pollution environnementale liée aux déchets d'emballage.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse portant sur la valorisation des films de caséinate de sodium pour des applications d'emballage comestibles, biodégradables et antimicrobiens fabriqués par des procédés thermomécaniques.

La première partie des travaux a concerné la fabrication de films actifs antimicrobiens à base de caséinate de sodium, de glycérol et de lysozyme par extrusion-gonflage. La difficulté et l'originalité du travail ont résidé dans le choix de la technologie. L'extrusion-gonflage n'est pas le procédé d'élaboration des films habituellement utilisé dans les laboratoires de recherche travaillant sur ce sujet alors qu'il est très fréquent dans l'industrie de la plasturgie. En revanche, les forts cisaillements et les hautes températures mise en jeu peuvent dénaturer des agents actifs

antimicrobiens comme les enzymes ou les bactériocines. C'est précisément pour cette raison que le lysozyme a été utilisé comme modèle d'agent antimicrobien alimentaire (conservateur) thermosensible. Du fait de la possibilité de mesurer de façon rapide et précise l'activité résiduelle du lysozyme, il a été possible d'avoir des réponses rapides sur la compatibilité entre la technologie de fabrication et la préservation de la stabilité d'agents antimicrobiens de nature protéique tels que le lysozyme. Il a ainsi pu être établi que le lysozyme maintient une activité enzymatique significative après avoir subi des températures et des cisaillements modérés pendant la transformation de matériaux à base de caséinate de sodium et de glycérol. En effet, à une température d'extrusion de 65°C et pour un taux de glycérol de 25wt%, 40,8% de l'activité enzymatique initiale a pu être conservée pour les granulés thermoplastiques et jusqu'à 26,4% pour les films élaborés ensuite à partir de ces granulés. Un suivi en fonction du temps et de la température de stockage des films a démontré que l'activité enzymatique résiduelle est conservée aussi bien à température ambiante qu'à -20°C pendant au moins 5 semaines. Les tests de suivi de croissance bactérienne par dénombrement en milieu liquide ont permis de vérifier que les granulés contenant le lysozyme présentent une activité antimicrobienne contre *M.luteus* (une souche bactérienne très sensible au lysozyme). De plus, les tests de traction réalisés en fonction de l'humidité relative, ont mis en évidence que les propriétés mécaniques des films n'étaient pas altérés par le lysozyme (ajouté à une teneur de 1% (w/w) dans la formulation des films) mais ne dépendaient que du taux de plastifiants et de l'humidité environnante. La biodégradabilité de ces films à base de caséinate de sodium n'a pas non plus été modifiée par l'ajout du lysozyme. Cette partie a été considérée d'une manière générale comme une étude sur l'optimisation de l'élaboration de matériaux actifs par extrusion. Même si les agents actifs utilisés pour la suite du projet n'ont pas la même sensibilité aux traitements thermomécaniques que le lysozyme, les profils de température et de cisaillement qui ont permis de préserver l'activité enzymatique du lysozyme ont aussi été adoptés pour la réalisation de l'étude du deuxième chapitre.

Dans cette deuxième partie, la nisine (un composé antibactérien de nature peptidique synthétisé par certaines souches de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) ou la natamycine (un composé antifongique synthétisé par un champignon) ont été utilisées comme agents actifs pour l'élaboration des films antimicrobiens. Ces 2 agents sont des additifs alimentaires de la catégorie des conservateurs. L'élaboration des films a donc été réalisée dans les mêmes conditions de procédé et de formulation que celles optimisées pour préserver au mieux l'activité du lysozyme.

Ce chapitre a surtout concerné la caractérisation de l'activité antimicrobienne de ces matériaux. Les résultats ont démontré que les granulés contenant la nisine présentait bien un effet bactéricide contre une souche de *K.rhizophila*. La croissance de cette souche a été complètement inhibée dès 3h d'incubation jusqu'à 30h pour certaines concentrations testées. Sur une souche de *L.innocua*, la croissance bactérienne a été empêchée pendant 5h, ce qui se traduit par un effet bactériostatique. Les films mis en œuvre à partir de ces granulés ont également présenté une inhibition importante contre *K.rhizophila*, ce qui confirme l'effet antimicrobien de ce matériau. Concernant les films contenant la natamycine, ils ont été évalués sur une souche d'*A.niger*. Les résultats ont mis en évidence que la croissance de la moisissure autour des films a été inhibée jusqu'à 7 jours. Les mêmes tests ont été réalisés également sur les matériaux ne contenant pas d'agents actifs. Dans ce cas, aucun effet antimicrobien n'a été observé. Afin de mettre en valeur la capacité antimicrobienne des matériaux transformés par extrusion-gonflage, des films actifs de caséinate de sodium ont également été préparés par voie solvant en respectant les mêmes concentrations d'agents actifs. Les résultats obtenus pour différents types de films actifs ont démontré que l'efficacité des matériaux extrudés est comparable à celle des films obtenus par voie solvant. Néanmoins, aucun test de relargage d'agent actif n'a été réalisé et c'est un point important qui reste à étudier. Cette étude a pu démontrer qu'une production en continu de films antimicrobiens de caséinate de sodium avec des agents actifs antimicrobiens est possible et qu'une commercialisation de ces produits peut être envisageable.

La troisième et dernière partie de ce travail a concerné la caractérisation physico-chimique des films thermoplastiques de caséinate de sodium. Cette étude a permis de caractériser les propriétés barrières aux gaz et les isothermes de sorption de l'eau des films en fonction du plastifiant et du co-solvant utilisés (i.e. glycérol et éthanol) pendant la transformation. La connaissance de ces propriétés est indispensable pour permettre une application concrète du produit fini dans le domaine de l'emballage. Comme précédemment, les propriétés des films extrudés ont été comparées à celles de films préparés par voie solvant. Il a été démontré que le type de procédé n'a aucune influence sur la perméabilité à l'oxygène et à la vapeur d'eau des films. De plus, l'éthanol utilisé lors de la transformation du caséinate de sodium à l'état fondu n'a pas affecté les propriétés barrières aux gaz ou les propriétés de sorption d'eau des films. Cette étude a permis de démontrer que les propriétés physico-chimiques des films comestibles à base de caséinate de sodium varient surtout en fonction du taux et de la nature du plastifiant (eau ou

glycérol). Les isothermes de sorption et les propriétés thermiques des films ont été modélisées respectivement par le modèle de Park et par le modèle de Gordon-Taylor pour améliorer la compréhension des effets plastifiant de l'eau et du glycérol. Ces modèles ont permis d'une part de déterminer une concentration critique au-delà de laquelle les molécules d'eau forment des agrégats, d'autre part de mettre en évidence que l'effet plastifiant de l'eau diminue avec une augmentation du taux de glycérol.

En se référant à l'étude réalisée, il serait possible de commercialiser ces films comestibles et antimicrobiens pour un usage d'emballage alimentaire actif qui assurera la qualité et la sécurité des produits efficacement durant la conservation et qui se biodégradera une fois utilisé. L'utilisation de ces films serait également imaginable en les combinant avec d'autres biopolymères ou avec des polymères traditionnels afin de créer de nouveaux films multi-matières et des emballages multicouches.

PERSPECTIVES

Perspectives

Cette thèse a permis de compléter nos connaissances sur ce matériau à base de caséinate de sodium. Cependant, beaucoup de choses restent à faire. Par exemple, ce matériau doit désormais être confronté à de vraies applications commerciales potentielles. Ainsi tous les aspects de mise en œuvre, de conditionnement, de contraintes industrielles, etc. doivent être pris en compte dans le cadre de nouvelles études.

Néanmoins, d'un point de vue plus fondamental, les points suivant peuvent notamment être retenus:

- ❖ Une étude sur la quantification et la cinétique de migration des agents actifs dans des milieux d'essais (simulant alimentaire) doit être envisagée. Cela permettrait d'évaluer les performances de ces films en tant qu'emballage actif pour un relargage contrôlé d'agents. En effet, le bénéfice de films antimicrobiens par rapport à une pulvérisation directe des agents antimicrobiens à la surface des aliments à conserver résiderait dans le relargage contrôlé des agents antimicrobiens incorporés dans les films, ce qui permettrait de maintenir plus durablement une concentration suffisante en agent antimicrobien dans la zone superficielle des aliments en contact direct avec ces films et d'éviter que ces agents antimicrobiens soient trop durablement en contact avec par exemple des micro-organismes ou des enzymes susceptibles de les dégrader (la matrice polymérique du film jouerait alors un rôle protecteur avant le relargage des agents qui y sont incorporés)
- ❖ Des essais destinés à mesurer l'activité antimicrobienne des films doivent désormais être réalisés dans des conditions réelles de stockage sur les surfaces en contact avec des aliments cibles. Ces informations aideraient à mettre au point le produit fini pour des applications spécifiques.
- ❖ Grâce aux optimisations sur les paramètres d'élaboration, des agents actifs aussi thermosensibles que le lysozyme, la nisine ou la natamycine conservent une activité antimicrobienne sur des souches sensibles malgré la température et le cisaillement produit lors des traitements thermomécaniques. Il est cependant possible d'incorporer dans des matériaux actifs d'autres agents antimicrobiens qui possèdent une meilleure thermostabilité comme le sorbate de potassium (E 202), le propionate de calcium (E 282) ou l'acide lactique (E 270).

- ❖ Les films hydrosolubles et comestibles/biodégradables de caséinate de sodium peuvent être utilisés pour des applications non-alimentaires. Ces films trouveraient une place dans le marché de matériaux plastiques grâce à leur nature hydrosoluble et entièrement biosourcée. Des applications variées peuvent être envisageables telles que : sachets hydrosolubles et biodégradables pour des pastilles de lave vaisselle ou pour des sacs à linge hydrosoluble pour le traitement du linge contaminé des hôpitaux. Pour un tel objectif, il serait intéressant d'étudier la fabrication des films à partir de caséinate non employable comme ingrédient alimentaire.

Résumé :

La mondialisation des marchés, les changements d'habitudes de consommation et les préoccupations croissantes concernant la sécurité alimentaire et l'environnement sont des éléments moteurs pour le développement des films d'emballage comestibles/biodégradables antimicrobiens. Une utilisation en masse de ce type de film est dépendante principalement des verrous technologiques car le mode de fabrication actuellement utilisé pour ce genre de film consiste à utiliser un procédé (voie solvant) qui n'est pas toujours adapté à une production importante et continue.

L'étude présentée ici permet de montrer la possibilité d'obtenir des films comestibles antimicrobiens à partir de caséinate de sodium en utilisant les procédés traditionnels de la plasturgie : extrusion bi-vis et extrusion-gonflage. Grâce aux optimisations des paramètres d'élaboration tels que la température de transformation, le taux de cisaillement et le taux de plastifiant, les matériaux contenant un agent actif naturel : le lysozyme, la nisine ou la natamycine ont gardé en partie leurs activités antimicrobiennes. Par des caractérisations mécaniques et physico-chimiques des films thermoplastiques, il a été démontré que ces films ont des propriétés mécaniques et barrières similaires à ceux fabriqués par voie solvant. Ces propriétés dépendent principalement du taux de plastifiant.

Ainsi, il est possible de fabriquer des films comestibles antimicrobiens de caséinate de sodium avec de bonnes propriétés mécaniques et barrières qui ne sont pas affectées par la transformation thermomécanique et qui peuvent être adaptées en fonctions des applications en variant le taux de plastifiant.

Mots clés: Caséinate de sodium, extrusion, films antimicrobiens, films comestibles, biodégradable, perméabilité à l'oxygène, perméabilité à la vapeur d'eau.

Abstract

Because food market becomes international, consumers are changing their habits and they are more concerned about food security and environmental issues, there are driving forces for the development of edible/biodegradable antimicrobial packaging films. However, fabrication process (solution-casting) of these kinds of films isn't always suitable for a continuous industrial big production.

The present study demonstrates the suitability of sodium caseinate based edible antimicrobial films to be fabricated by some conventional plastic transformation processes: twin-screw extrusion and blown-film extrusion. Thanks to the optimizations of elaboration parameters such as extrusion temperature, shear and plasticizer ratio, the materials incorporated with one of the following active agents: lysozyme, nisin or natamycin, partially kept their antimicrobial activity. Physical-chemical film characterization of films emphasized that the type of transformation process doesn't have any influence on tensile or gas barrier properties. These properties are mainly affected by plasticizer type and content.

Thus, sodium caseinate based edible antimicrobial films can be produced successfully by thermo-mechanical processes without losing good mechanical and gas barrier properties.

Keywords: Sodium caseinate, extrusion, antimicrobial films, edible films, biodegradable, oxygen permeability, water vapor permeability.