



**HAL**  
open science

# Développement et caractérisation de matériaux antimicrobiens extrudés à base de caséines : mise au point d'étiquettes bio-résistantes pour l'optimisation de la traçabilité en fromagerie

Elodie Chevalier

## ► To cite this version:

Elodie Chevalier. Développement et caractérisation de matériaux antimicrobiens extrudés à base de caséines : mise au point d'étiquettes bio-résistantes pour l'optimisation de la traçabilité en fromagerie. Matériaux. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSES042 . tel-02109670

**HAL Id: tel-02109670**

**<https://theses.hal.science/tel-02109670v1>**

Submitted on 25 Apr 2019

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

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



N° d'ordre NNT : 2017LYSES042

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de **L'Université Jean Monnet**

**Ecole Doctorale EDSIS 488**  
**Ecole Doctorale Science Ingénierie Santé**

**Spécialité de doctorat :**  
**Chimie et Sciences des Matériaux**

Soutenue publiquement le 25/10/2017, par :  
**Elodie Chevalier**

---

**Développement et caractérisation de  
matériaux antimicrobiens extrudés à base  
de caséines**

Mise au point d'étiquettes bio-résistantes pour  
l'optimisation de la traçabilité en fromagerie

---

Devant le jury composé de :

Frédéric DEBEAUFORT,	Professeur des Universités,	Rapporteur
Anne-Marie REVOL-JUNELLES,	Professeur des Universités,	Rapporteur
Christophe CHASSENIEUX,	Professeur des Universités,	Examineur
Frédéric PROCHAZKA,	Maitre de conférences, HDR,	Directeur de thèse
Nadia OULAHAL	Maitre de conférences, HDR,	Directeur de thèse
Gilles ASSEZAT,	Ingénieur d'études,	Membre invité

## Remerciements

A l'issu de cette thèse, je suis convaincue que malgré mes moments de solitude lors de la rédaction du manuscrit, la thèse est un travail de partage et de collaboration faisant intervenir un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'engagement, ont contribué de près ou de loin à la réalisation et l'aboutissement de ce travail et que j'espère pouvoir remercier du fond du cœur dans ces pages. Mes remerciements vont au Professeur Anne-Marie REVOL-JUNELLES du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) de l'Université de Lorraine et au Professeur Frédéric DEBEAUFORT du laboratoire de Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) de l'Université de Bourgogne pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger mon travail. Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Pr. Christophe CHASSENIEUX de l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans (IMMM) d'avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse. De même, je suis particulièrement reconnaissante à Monsieur Jean-Paul MAITRE dirigeant de la société Labelys et à Monsieur Gilles ASSEZAT, ingénieur d'études à l'IMP, de l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de cette recherche en acceptant mon invitation pour ce jury de thèse.

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein de deux laboratoires de la région Auvergne Rhône-Alpes. Le laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères de l'Université Jean Monnet (IMP@UJM) m'a permis de mener à bien la production et la caractérisation du matériau et le laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA) de l'université Lyon 1 m'a permis d'évaluer le potentiel actif et notamment antimicrobien du matériau. Cette thèse a été réalisée grâce à la subvention ARC Environnement de la région Rhône-Alpes.

Je souhaite remercier les Professeurs Christian CARROT et Pascal DEGRAEVE pour l'accueil qu'ils m'ont fourni dans leurs laboratoires, pour leur soutien et pour les opportunités de déplacement dans des congrès et séminaires de l'autre côté de l'océan et dans toute l'Europe pour partager l'avancée de mes travaux avec la communauté scientifique, au cours de ces trois années de doctorat.

Mes plus sincères et profonds remerciements vont à mes deux directeurs de thèse, sans lesquels ce projet n'aurait pas eu lieu et qui m'ont fait l'honneur de diriger ce travail. Un grand merci à Frédéric PROCHAZKA, directeur de thèse@IMP, pour m'avoir accordé sa confiance sur ce projet, pour sa disponibilité, son écoute et sa patience. Notre collaboration m'a permis d'acquérir des connaissances scientifiques et techniques et de les appliquer au sein de l'entreprise LACTIPS dont il est l'un des co-fondateurs. Un immense merci à Nadia OULAHAL, directrice de thèse@BioDyMIA, qui, malgré ses nombreuses occupations, a trouvé le temps de m'écouter et de m'orienter. Je la remercie pour ses précieux conseils et sa rigueur scientifique qui m'ont permis de mener à bien ce projet sur 3 ans. Je la remercie également de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec un réseau de collaborateur du monde industriel de l'agroalimentaire et l'opportunité de développer mes compétences d'encadrement auprès de stagiaires.

Nos réunions, votre expertise, votre expérience et nos réflexions ont été le moteur de ce projet qui m'a énormément appris et avec lequel j'ai grandi.

Un immense merci à Gilles ASSEZAT, ingénieur d'étude, qui m'a tout appris sur l'extrusion et qui m'a accordé sa confiance. Grâce à lui j'ai pu remettre en question de nombreux résultats ce qui a engendré de nombreuses questions supplémentaires... mais cela m'a permis d'aller plus loin dans la réflexion autour de ce projet. Merci pour toutes ses campagnes bivis qui vont énormément me manquer. Un grand merci également pour ces longues discussions tardives à refaire le monde... un monde de bioplastique... qui laisse rêveur !

Je remercie les équipes d'enseignants-chercheurs et techniciens des deux laboratoires qui m'ont aidé dans ce projet, pour leur transfert de connaissances et leur disponibilité. Un grand merci notamment à :

\_@IMP : Yvan CHALAMET, Melinda DESSE, Marlène DESLOIR, Caroline PILLON et Claude RAVEYRE

\_@BioDyMIA : Isabelle ADT, Amandine COTTAZ, Emilie DUMAS, Coralie DUPAS, Adem GHARSALLAOUI, Sandrine GOUIN et Catherine JOLY.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers l'entreprise LACTIPS et ses équipes, et particulièrement sa directrice Marie-Hélène GRAMATIKOFF qui m'a accordé sa confiance au cours de la dernière année de thèse sur des missions d'expertise dans le cadre des projets de R&D et de la formation des équipes.

Je remercie les industriels qui ont collaborés avec moi au cours de ces trois années et notamment la société LABELYS en la personne de M. MAITRE pour son expérience, son temps, son implication et bien évidemment la précieuse matière première. Merci également à M. BOUDON et M. RIGOLET de l'entreprise MONTS&TERROIRS pour m'avoir fait confiance et m'avoir donné l'opportunité de réaliser des tests *in situ* sur des fromages de Comté. Merci à M. NOTZ du CTFC (Centre Technique des Fromages Comtois) qui a également partagé son expérience dans le domaine de la traçabilité fromagère et plus généralement en fromagerie.

Je ne peux pas oublier mes stagiaires qui ont permis à ce projet d'avancer beaucoup plus rapidement et surtout qui m'ont permis de développer mes capacités d'encadrement ; merci à Asma CHAABANI, Quentin CHEVALIER et Nicoleta COZMA pour leur implication dans ce projet.

Ces trois années de thèse ont donné lieu à de belles rencontres et des amitiés qui ont rendu cette période d'autant plus agréable. Merci à Alix, Fanny, Marie et Basak ainsi que vos boyfriends Loïc, Thomas et Reda de m'avoir accueilli lorsque je suis arrivée seule en première année. Un profond merci à Lynda pour avoir été ma co-bureau pendant deux ans, pour avoir supporté mon caractère assez trempé. Je la remercie également pour sa patience, son expertise en microbiologie et surtout son calme olympien et pour m'avoir montré que ma vie de thésarde était plutôt aisée sans enfant ;) Je remercie également Chedia pour sa bonne humeur et nos sorties bressanes ainsi que Alessandro pour les mêmes raisons, c'est-à-dire sa bonne humeur mais cette fois les sorties stéphanoises. Merci également à ma chère amie Claire pour sa joie de vivre contagieuse lors de ses visites dans la région ou lors de nos courtes vacances.

J'aimerais remercier les personnes qui n'ont pas hésité à m'héberger pour mes missions stéphanoises de ces deux dernières années en m'offrant leur hospitalité chaleureuse et ainsi éviter les bouchons lyonnais (pas ceux où l'on mange bien), tout en profitant de dîners plus qu'agréables, pour effectuer mes recherches dans les meilleures conditions possibles, merci à Alessandro, Maxime et à la famille RIVIERE.

Enfin, j'aimerais remercier ma famille, et particulièrement mes parents adorés qui ont toujours cru en moi, qui m'ont soutenu et qui m'ont permis de choisir ma voie. Merci à mon grand-père Pierre de m'avoir toujours soutenu et de m'avoir tant donné, j'aurais aimé te rendre tout cela en te rendant fier, j'espère que tu l'aurais été...

Mes derniers remerciements vont à celui qui a été présent lors de moments de crise dirons-nous en cette dernière ligne droite, qui a quitté Paris pour m'apporter son soutien et sa patience ... Merci pour ton épaule parfois nécessaire, tes petits plats très réconfortants et tes blagues hasardeuses toujours à point nommé... Merci !

En résumé, un **grand merci** à tous !

Et, bonne lecture... !



*Dessin de Philippe Geluck : Le Chat*

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>i</b>
<b>Glossaire</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des valorisations scientifiques</b> .....	<b>xi</b>
<i>Communications scientifiques</i> .....	<i>xi</i>
<i>Publication acceptée</i> .....	<i>xii</i>
<i>Publications soumises</i> .....	<i>xii</i>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>I-1</b>
<b>Chapitre I. Synthèse bibliographique</b> .....	<b>I-8</b>
Table des figures .....	I-9
Table des tableaux .....	I-10
I.1 La traçabilité en fromagerie .....	I-11
I.1.1 Aspect législatif concernant les fromages AOP.....	I-11
I.1.2 Exemples d'étiquetage des fromages AOP.....	I-12
I.1.3 Fabrication et dépôt du marquage obligatoire en caséine sur les fromages .....	I-14
I.2 Les biopolymères .....	I-18
I.2.1 Lexique des « bio » concepts .....	I-18
I.2.2 D'un monde de « plastiques » vers un monde de « bioplastiques » .....	I-20
I.2.3 Différentes origines de biopolymères.....	I-24
I.2.4 Les composites .....	I-26
I.2.5 Les additifs .....	I-27
I.2.6 Propriétés des biomatériaux.....	I-34
I.2.7 Les matériaux comestibles et à usage alimentaire .....	I-42
I.2.8 Les matériaux actifs et fonctionnalisés .....	I-46
I.3 La caséine, une protéine bien connue ? .....	I-67
I.3.1 La caséine, une protéine du lait .....	I-68
I.3.2 L'utilisation des caséines.....	I-78
I.3.3 Procédés de fabrication de films .....	I-80

I.3.4	<i>Histoire des matériaux à base de caséine</i> .....	I-84
I.3.5	<i>Une multitude de films à base de caséine ?</i> .....	I-85
I.4	Références bibliographiques.....	I-93
<b>Avant-Propos</b> .....		<b>I-117</b>
	Références avant propos .....	I-120
<b>Chapitre II. Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration</b> .....		<b>II-121</b>
	Table des figures .....	II-122
	Table des tableaux .....	II-122
II.1	Introduction.....	II-123
II.2	Graphical abstract.....	II-126
II.3	Abstract.....	II-127
II.4	Highlights .....	II-127
II.5	Keywords .....	II-127
II.6	Introduction.....	II-128
II.7	Material and methods.....	II-130
	II.7.1 <i>Materials/Chemicals</i> .....	II-130
	II.7.2 <i>Casein sheet preparation</i> .....	II-130
	II.7.3 <i>Physicochemical characterization</i> .....	II-131
	II.7.4 <i>Water sensitive properties</i> .....	II-132
	II.7.5 <i>Mechanical properties</i> .....	II-134
	II.7.6 <i>Statistical analyses</i> .....	II-134
II.8	Results and Discussion .....	II-135
	II.8.1 <i>Physicochemical characterization</i> .....	II-135
	II.8.2 <i>Water sensitive properties</i> .....	II-140
	II.8.3 <i>Mechanical properties</i> .....	II-145
II.9	Conclusions.....	II-147
II.10	Acknowledgements.....	II-147



II.11	Conclusions générales et perspectives - Chapitre II.....	II-148
II.12	Références.....	II-150

**Chapitre III. Antimicrobial potential of organic acids against Escherichia coli and their incorporation in rennet casein based material ..... III-154**

	Table des figures .....	III-155
	Table des tableaux .....	III-156
III.1	Introduction.....	III-157
III.2	Abstract.....	III-160
III.3	Keywords .....	III-160
III.4	Introduction.....	III-161
III.5	Materials and methods .....	III-163
	<i>III.5.1 Materials/Chemicals .....</i>	<i>III-163</i>
	<i>III.5.2 Active rennet casein film preparation.....</i>	<i>III-163</i>
	<i>III.5.3 Antibacterial activity.....</i>	<i>III-164</i>
	<i>III.5.4 Biodegradability.....</i>	<i>III-167</i>
	<i>III.5.5 Statistical analysis.....</i>	<i>III-168</i>
III.6	Results and discussion.....	III-169
	<i>III.6.1 Modeling of organic acid salts antimicrobial potential by microdilution method.....</i>	<i>III-169</i>
	<i>III.6.2 Design of experiment: Antibacterial effect of a blend of weak organic acid salts.....</i>	<i>III-171</i>
	<i>III.6.3 Antimicrobial agents incorporation in extruded casein based material analysed by agar disc diffusion method.....</i>	<i>III-173</i>
	<i>III.6.4 Biodegradability.....</i>	<i>III-178</i>
III.7	Conclusion .....	III-179
III.8	Acknowledgements.....	III-179
III.9	Etude complémentaire.....	III-180
III.10	Conclusions générales et perspectives – Chapitre III .....	III-187
III.11	Références.....	III-189

**Chapitre IV. Casein/wax blend extrusion for production of edible films as carriers of potassium sorbate – A comparative study ..... IV-194**

	Table des figures .....	IV-195
--	-------------------------	--------

Table des tableaux .....	IV-195
IV.1 Introduction .....	IV-196
IV.2 Graphical abstract.....	IV-198
IV.3 Abstract.....	IV-199
IV.4 Keywords: .....	IV-199
IV.5 Introduction .....	IV-200
IV.6 Material and methods.....	IV-203
<i>IV.6.1 Materials/Chemicals .....</i>	<i>IV-203</i>
<i>IV.6.2 Casein sheet preparation.....</i>	<i>IV-203</i>
<i>IV.6.3 Visual and morphological characterization .....</i>	<i>IV-204</i>
<i>IV.6.4 Mechanical properties .....</i>	<i>IV-205</i>
<i>IV.6.5 Water sensibility properties.....</i>	<i>IV-205</i>
<i>IV.6.6 Potassium sorbate release in water analysis by HPLC .....</i>	<i>IV-207</i>
<i>IV.6.7 Antimicrobial activity.....</i>	<i>IV-207</i>
<i>IV.6.8 Statistical analyses.....</i>	<i>IV-207</i>
IV.7 Results and discussion.....	IV-208
<i>IV.7.1 Visual and morphological characterization .....</i>	<i>IV-208</i>
<i>IV.7.2 Mechanical properties .....</i>	<i>IV-212</i>
<i>IV.7.3 Water sensitive properties (WWP, MC, TSM, SW) .....</i>	<i>IV-217</i>
<i>IV.7.4 Potassium sorbate release in water analysis by HPLC .....</i>	<i>IV-219</i>
<i>IV.7.5 Antimicrobial activity of sheets.....</i>	<i>IV-220</i>
IV.8 Conclusion .....	IV-223
IV.9 Acknowledgements.....	IV-223
IV.10 Etude complémentaire.....	IV-224
IV.11 Conclusions générales et perspectives – Chapitre IV .....	IV-226
IV.12 Références.....	IV-228

**Conclusions générales..... 234**

**Perspectives ..... 238**

Références complémentaires .....	242
<b>ANNEXES .....</b>	<b>243</b>
ANNEXE A : Poster présenté lors de la journée de la recherche de l'EDSIS à Saint Etienne le 16 juin 2016 .....	244
ANNEXE B : Publication dans Food Hydrocolloids (Chapitre II) : Chevalier E., Assezat G., Prochazka F., Oulahal N. (2017) Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, Food Hydrocolloids, <a href="https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028">https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028</a> .	245
<b>Résumé : .....</b>	<b>255</b>
<b>Mots clés : .....</b>	<b>256</b>
<b>Abstract: .....</b>	<b>257</b>
<b>Keywords: .....</b>	<b>258</b>

## Glossaire

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AOP** : Appellation d'Origine Protégée

**ATCC** : "American Type Culture Collection

**a<sub>w</sub>** : activité de l'eau

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CRBM** : Cheese Ripening Bacteria Media

**DO** : Densité Optique

**EB** : Allongement à la rupture

**FDA** : Food and Drug Administration

**GRAS** : Generally Recognized As Safe

**HPLC** : High performance Liquid  
Chromatography

**LDPE** : Low Density PolyEthylene

**MATS** : Microbial Adhesion To Solvents

**MEB** : Microscopie Electronique à Balayage

**MIC** : Minimal Inhibitory Concentration

**PHA** : Polyhydroxyalcanoate

**PHB** : Poly-β-hydroxybutyrate

**PHV** : Polyhydroxyvalerate

**PLA** : Acide polylactique

**SEM** : Scanning Electron Microscopy

**T** : Température

**TS** : Tensile strength ou contrainte maximale

**TSA** : Tryptone Soja Agar

**TSB** : Bouillon Tryptone Soja

**UFC** : Unité Formant Colonie

**USDA** : Unite Stated Department of  
Agriculture

**YM (ou MY)** : Module de Young ou  
module d'élasticité

**WVP** : Water Vapor Permeability

## Liste des valorisations scientifiques

### Communications scientifiques

- ❖ Communication orale au séminaire **GDR SYMBIOSE** à Nantes du 8-10 avril 2015 : Le GDR Symbiose rassemble des acteurs français sous la tutelle du CNRS et de l'INRA cherchant à valoriser des biopolymères d'origine variée comme sources de synthons et de matériaux fonctionnels.

Elodie Chevalier, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, *Elaboration d'un matériau antimicrobien comestible et biodégradable à base de caséine. Mise au point d'étiquettes bio-résistantes pour la traçabilité des fromages*

- ❖ Communication orale en anglais lors du **JIP-JEPO** à Saint Sébastien (Espagne) du 14-18 septembre 2015 : 1st French-Spanish Joint Congress for Young Researchers in Polymers.

Elodie Chevalier, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, *Production of an antimicrobial edible casein-based material. Application : Bio-resistant labels for traceability of cheese*

- ❖ Poster présenté à la journée scientifique de **l'ARC Environnement** le 1er octobre 2015 à Lyon.

Elodie Chevalier, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, *Production d'un matériau comestible et antimicrobien à base de caséine. Application : Etiquettes biorésistantes pour la traçabilité des fromages*

- ❖ Poster présenté à la **journée de la recherche** de l'EDSIS à Saint Etienne le 16 juin 2016 : obtention du premier prix du jury pour la vulgarisation du sujet de thèse par présentation de poster et présentation de 3 minutes (ANNEXE A)

Elodie Chevalier, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, *Production d'un matériau comestible et antimicrobien à base de caséine. Application : Etiquettes biorésistantes pour la traçabilité des fromages*

- ❖ Communication orale en anglais au congrès **Biopolymers and bioplastics** à San Antonio, Texas, USA. Communication title:

Elodie Chevalier, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, *Production of an antimicrobial edible casein-based material. Application: Bio-resistant labels for traceability of cheese*

- ❖ Communication orale en anglais au congrès **MATBIM** à Porto, Portugal.

Elodie Chevalier, Asma Chaabani, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, *Production of an antimicrobial edible casein-based material. Application: Bio-resistant labels for traceability of cheese*

## Publication acceptée

- ❖ Elodie Chevalier, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal (2017) ***Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration***, *Food Hydrocolloids*.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>  
(ANNEXE B, sous presse)

## Publications soumises

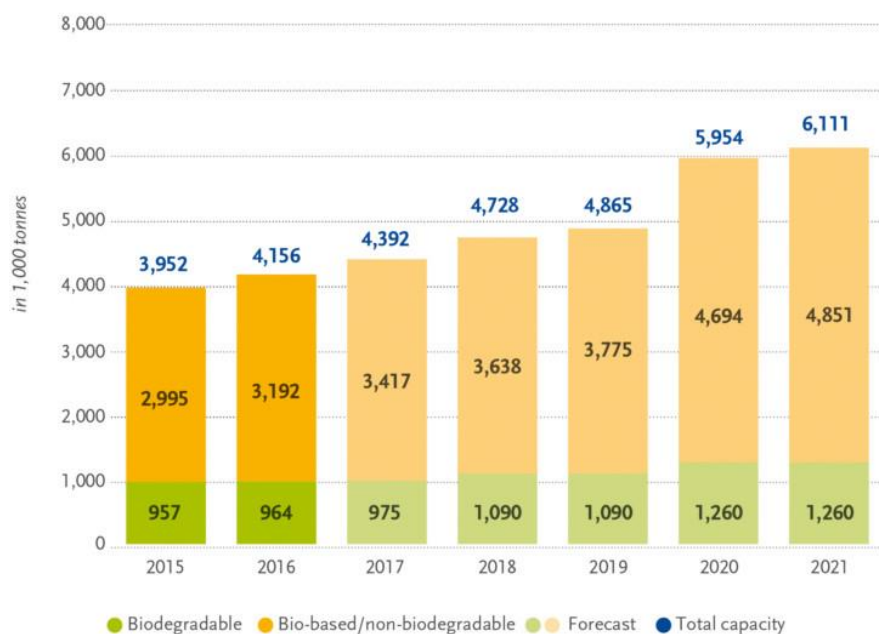
- ❖ Elodie Chevalier, Asma Chaabani, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, ***Antimicrobial potential of organic acids against Escherichia coli and their incorporation in rennet casein based material***, *International Dairy Journal*, le 25 juillet 2017
- ❖ Elodie Chevalier, Asma Chaabani, Gilles Assezat, Frédéric Prochazka, Nadia Oulahal, ***Casein/wax blend extrusion for production of edible films as carriers of potassium sorbate – A comparative study***, *Food Packaging and Shelf Life*, le 20 septembre 2017

## Introduction générale

A partir de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les matières précieuses et semi-précieuses (ivoire, os, écaille de tortue...) vont progressivement être remplacées par des matières plastiques issues dans un premier temps de polymères naturels telles que la cellulose ou la caséine. Ces matériaux, dit plastiques artificiels, vont être moulés et modulés et offrir un large éventail de possibilités d'application. Ainsi, dans un premier temps en 1862, Alexander Parkes présente la Parkesine à l'exposition universelle de Londres, un nouveau matériau obtenu par la dissolution de la nitrocellulose dans l'alcool. Trop onéreux par la présence d'alcool dans sa composition, la Parkesine a tendance également à se déformer et se fissurer. En 1869 apparaît le celluloid inventé par les frères Hyatt qui contient du nitrate de cellulose végétale et un agent plastifiant, du camphre. Ce matériau étant inflammable, son utilisation est limitée, il est utilisé dans la fabrication de balles de tennis de table, de boules de billard et dans l'industrie cinématographique. Quelques années plus tard, en 1889, le chimiste français Auguste Trillat fabrique de la galalithe (de gala « lait » et lithos « pierre ») par durcissement de la caséine coagulée à l'aide du formol. Cependant, ce n'est qu'en 1897 que les applications pour ce matériau sont développées ; Wilhelm Kirsche et Adolf Spitteler posent un brevet sur la fabrication de cette matière. Plus dure que la corne, plus brillante que l'os, imitant l'ivoire et colorable, la galalithe ou erinoid (en Angleterre) ou aladdinite, karolith, kyloid et ameroid (aux Etats-Unis), est utilisée entre autres pour la fabrication de boutons, boucles, stylos, manches de couteaux. A partir du début du XX<sup>ème</sup> siècle, les plastiques synthétiques apparaissent et outrepassent largement tout autre production. Ils sont issus de la réaction de produits intermédiaires obtenus à partir du charbon ou du pétrole. Depuis, les matériaux plastiques se développent et se diversifient pour occuper à présent un espace considérable de notre quotidien. La production de matières plastiques a atteint 322 millions de tonnes en 2015, soit une progression annuelle de 3,8% (source : PlasticsEurope). Les plastiques synthétiques ont de nombreux avantages et sont facilement transformables, ce qui leur vaut leur succès. Ils sont plus légers à résistance égale que l'acier ou l'aluminium et insensible à la corrosion. La fabrication de composites permet des avancées technologiques conséquentes. Leurs performances aussi variées soient elles sont appliquées dans de nombreux domaines tels la santé, le bâtiment, l'automobile, l'aérospatiale, l'emballage, la décoration, la bureautique, le sport...

Cependant, de nouvelles problématiques sont apparues quant à la fabrication et l'utilisation de ces plastiques. Certains composants (phtalates, Bisphénol A...) toxiques pour la santé et l'environnement sont largement décriés par la société et proscrits de la formulation. La production mondiale croissante en plastiques synthétiques pose également des problèmes liés à la pétrochimie et au devenir des plastiques usagés. La prise de conscience, notamment dans les sociétés occidentales, des enjeux environnementaux se développe et incite à de nouveaux progrès. Une utilisation raisonnée des matériaux, une amélioration du recyclage et de la biodégradabilité, et l'utilisation de matières premières non toxiques et renouvelables sont les points clés d'un développement durable de matières plastiques pour notre quotidien. L'industrie des matières plastiques tend à se rapprocher de ce qui se faisait précédemment jusqu'au XXème siècle, en utilisant davantage de ressources renouvelables pour la fabrication de matières plastiques biosourcées. La Figure 0-1 suivante montre les capacités de production mondiales croissantes des bioplastiques ainsi que les prévisions sur les prochaines années. Même si ces bioplastiques ne représentent pour le moment que 1% des plastiques produits annuellement, le marché augmente déjà de 20 à 100% par an.

*Global production capacities of bioplastics*



*Figure 0-1 : Capacité de production de bioplastiques en 2015 et 2016 et prévision jusqu'en 2021 (source : European Bioplastics)*

Techniquement, un grand nombre de ressources renouvelables ont pu être transformées en matière plastique mais très peu sont commercialisées. En effet, en excluant les



composites (notamment avec ajout de polymères synthétiques), les matériaux biosourcés sont souvent transformés en films par voie dite « humide » ou « solvant ». Ce procédé consiste à dissoudre la matière dans un solvant qui est ensuite évaporé pour former un film. Cette technique très décrite en littérature est aisément applicable en laboratoire mais, l'est beaucoup moins à l'échelle industrielle. En outre, de par l'utilisation de solvants (même s'il s'agit souvent d'eau) et de par l'étape d'évaporation de ce dernier, cela en fait une méthode en contradiction avec les valeurs environnementales recherchées pour ce type de matériaux.

Dans ce contexte général, des travaux de recherche pour le développement et la compréhension de nouveaux matériaux biosourcés et biodégradables sont primordiaux. Il est également intéressant de constater l'essor des matériaux et films comestibles. En effet, l'utilisation de ressources renouvelables souvent naturelles et comestibles, permet de produire un matériau avec une valeur ajoutée supplémentaire, la comestibilité. Face aux nouveaux modes de consommation, l'industrie agroalimentaire est très intéressée par ce genre de matériau. De plus, de la matière première au consommateur, les aliments peuvent être affectés par leur environnement. Des altérations physiques, chimiques et microbiologiques peuvent altérer la qualité de la denrée, voir la rendre impropre ou dangereuse à la consommation. Dans le secteur agroalimentaire, les travaux de recherche s'orientent encore plus spécifiquement vers des matériaux fonctionnalisés composés notamment d'agents actifs permettant la protection des denrées alimentaires.

Le travail présenté dans ce manuscrit a pour objectif de développer d'un matériau comestible par une technologie facilement industrialisable, l'extrusion. Ce n'est que depuis une dizaine d'années que cette technologie est développée et appliquée sur des matériaux comestibles (Figure 0-2, A). De la même manière, depuis la dernière décennie, l'étude de films fonctionnalisés et notamment antimicrobiens a connu un essor considérable (Figure 0-2, B).

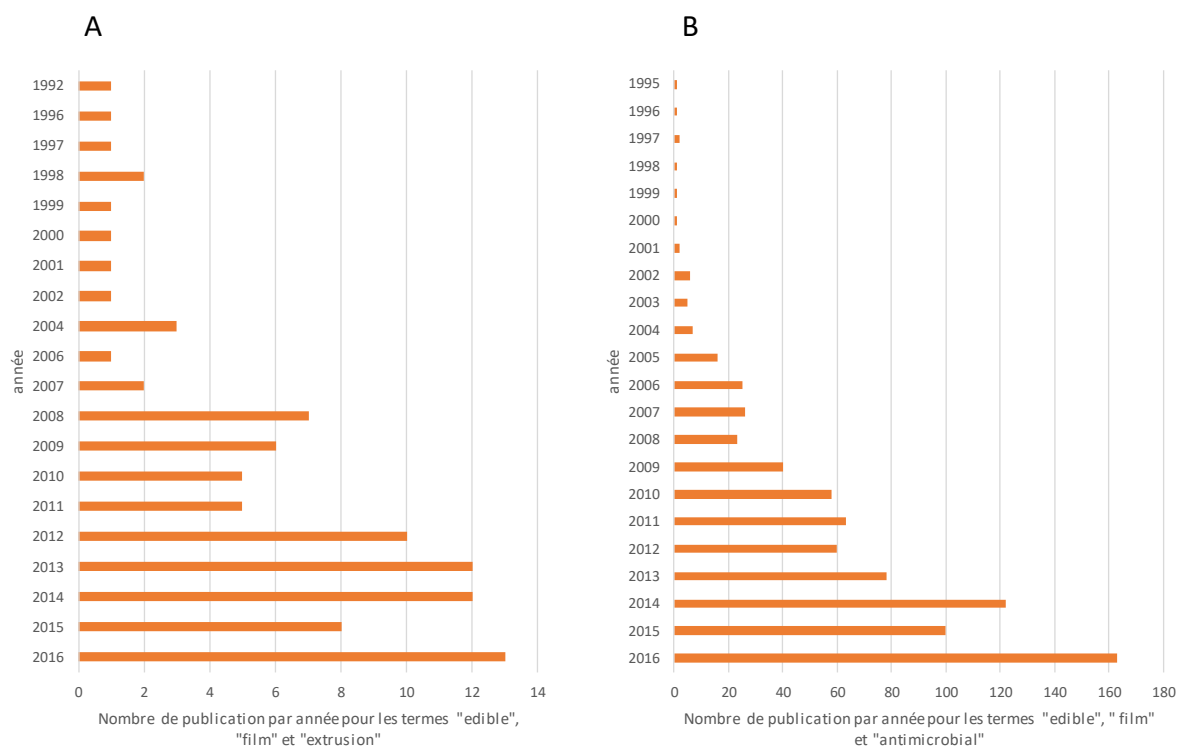


Figure 0-2 : Nombres de publications scientifiques publiées par année en fonction des mots clés A : "edible", "film" et "extrusion"; B: "edible", "film" et "antimicrobial" (recherche sur web of science à la date du 21/08/2017)

Les attentes sociétales et environnementales concernant l'industrie des matières plastiques poussent vers un retour à l'utilisation de ressources renouvelables ; or, la caséine, protéine majoritaire du lait, a déjà connu un âge d'or au début du XXème siècle avec la commercialisation de la galalithe et se trouve être une protéine filmogène, disponible et aisément extractible. La caséine est donc une matière première de choix pour la production de matériaux. De nombreux auteurs ont développé des films et composites à partir de caséine par voie solvant à l'échelle du laboratoire et depuis quelques années, des films ont même pu être produits par extrusion et extrusion gonflage au sein du laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymère à Saint Etienne. Ce savoir-faire a d'ailleurs été breveté (*Patent WO2012010421, 26/01/2012*) et a donné naissance à la société Lactips produisant des films hydrosolubles à partir de caséine. Cependant, dans la littérature, une confusion apparaît parfois concernant le terme « caséine » car malgré une même origine, cette protéine peut être obtenue par différentes méthodes d'extraction (notamment coagulation acide ou enzymatique) suivi d'un traitement chimique ou non (neutralisation par des hydroxydes) ce qui affecte leurs structures primaires et leurs caractéristiques (liaisons chimiques, structures, présence de minéraux). Une fois cette distinction faite, on peut s'apercevoir que les caséinates (caséine extraite par coagulation acide puis neutralisée par ajout d'hydroxyde de sodium, potassium ou calcium) ont été fortement

étudiés en voie humide et en extrusion pour le développement de films hydrosolubles (Figure 0-3). Par contre, les autres types de caséine (caséine présure et caséine acide), qui sont insolubles sont très peu utilisées comme le montre la Figure 0-3.

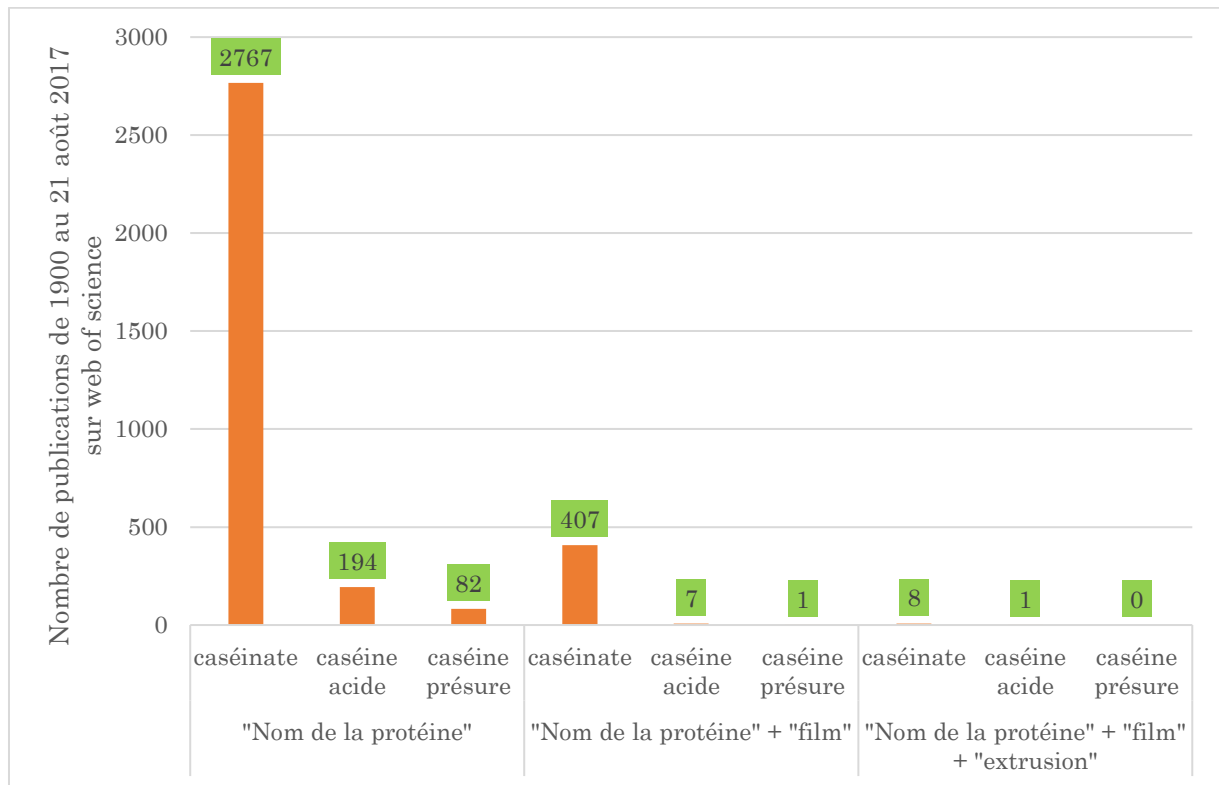


Figure 0-3 : Nombres de publications scientifiques sur web of science jusqu'au 21/08/2017 concernant les différentes caséines (caséine acide, caséine présure et caséinate), le terme "film" et le terme "extrusion"

Enfin, l'intérêt pour les caséines dans ces travaux de recherche est également poussé vers le développement industriel car l'industrie fromagère est demandeuse de matériaux à base de caséine pour servir d'étiquette de traçabilité des fromages d'appellation d'origine protégée.

C'est en partant de l'ensemble de ces constats que mes travaux de recherche ont commencé afin de répondre aux problématiques suivantes :

- Quel impact le type de caséine et la méthode d'extraction de celle-ci ont-ils sur les caractéristiques d'un matériau produit par le procédé d'extrusion bivis ?
- Une matrice caséine transformée par extrusion peut-elle servir de support à des molécules actives antimicrobiennes et avec quel potentiel ?

Deux laboratoires de la région Rhône-Alpes ont collaboré dans ce projet pour apporter leur expertise dans ce projet pluridisciplinaire :

- Dans le laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP@UJM) à Saint Etienne, les différentes formulations présentées dans ce manuscrit ont été produites par extrusion bivis et ont ensuite été caractérisées (propriétés mécaniques, propriétés physiques et biodégradabilité).
- Dans le laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires (BioDyMIA) à Bourg en Bresse, le matériau a été également caractérisé d'un point de vue physico-chimique et son potentiel en tant que support de molécules actives antimicrobiennes a été évalué.

Ce manuscrit présente les recherches et développements effectués dans ces deux laboratoires. Le document s'articule autour des différentes problématiques rencontrées, présentées ici en quatre chapitres repris dans la Figure 0-4 :

- Dans un premier temps, une étude bibliographique, permet d'observer le contexte de cette étude en partant de la nécessité industrielle (étiquette de traçabilité en fromagerie) et plus généralement l'intérêt des biopolymères ; puis, en se focalisant sur les matériaux comestibles à usage alimentaire et notamment fonctionnalisés (propriétés antimicrobiennes) pour enfin évaluer le potentiel des caséines pour le développement de matériaux comestibles, biodégradables et antimicrobiens.
- Dans le second chapitre, une étude comparative mise en place entre différents types de caséines commercialisées (caséine présure, caséine acide, caséinate de sodium) permettra une meilleure compréhension des relations structures/propriétés dans des matériaux produits exclusivement par extrusion.
- Le troisième chapitre, en utilisant un matériau extrudé à base de caséine présure comme support de conservateurs alimentaires (sels d'acides organiques) permettra d'établir le potentiel de cette matrice et des agents actifs sur une souche modèle d'*Escherichia coli*. En se plaçant notamment dans des conditions typiques de caves d'affinage de fromagerie (forte humidité et température de 15°C), les propriétés antimicrobiennes apportées par ces conservateurs sous ces conditions spécifiques ont été déterminées avant d'appliquer les résultats obtenus sur la capacité antimicrobienne du matériau cette fois support des agents de conservation.

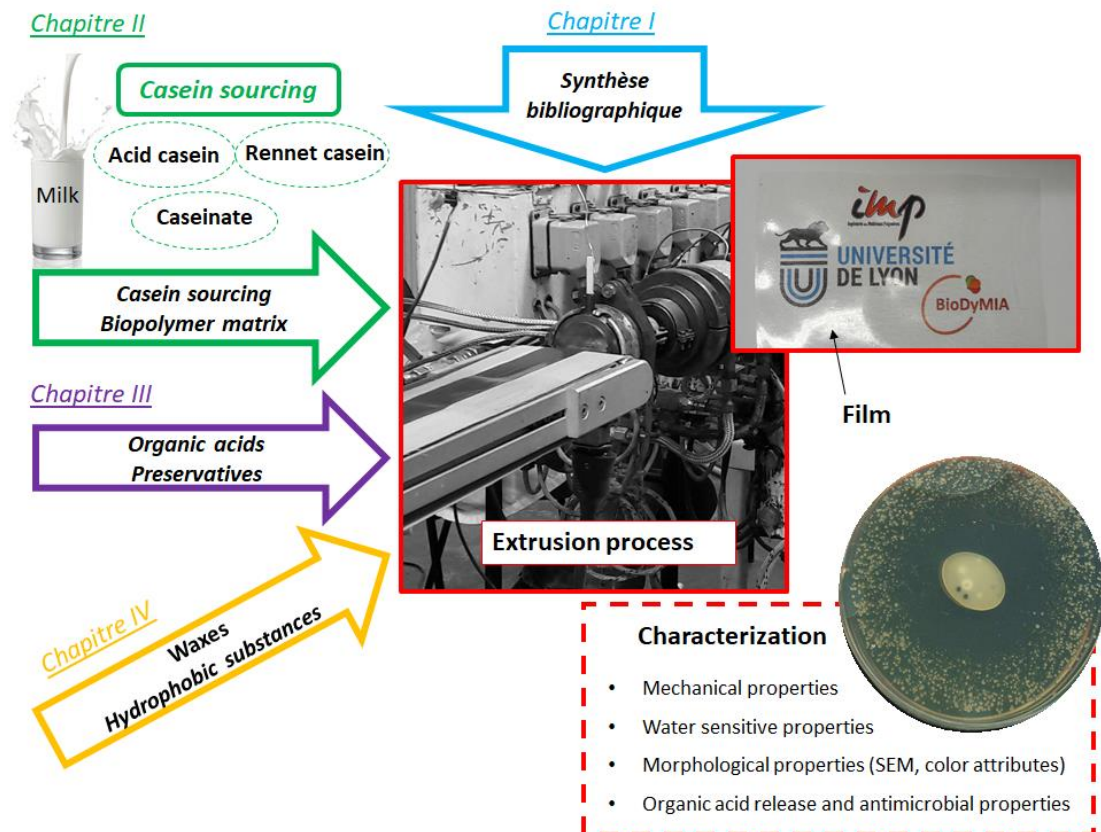


Figure 0-4 : Organisation générale des chapitres du manuscrit

- Enfin, dans un quatrième chapitre, le développement de matériaux composites à base de caséine et de cires sera décrit. Protéine hydrophile, la caséine forme une matrice très sensible à l'humidité, ce qui peut affecter son potentiel antimicrobien et notamment le relargage de molécules actives par gonflement induit par l'eau. L'extrusion de matériaux composites a été testée à partir de caséine présure et de différentes cires (cire d'abeille, cire de candelilla et cire de carnauba) censées apporter un caractère hydrophobe. Une étude comparative de ces matériaux composites a mis en évidence l'impact de l'origine de la cire sur les propriétés physico-chimiques et mécaniques. Le potentiel antimicrobien des sels d'acides organiques a été de nouveau analysé avec cette fois la présence de composés hydrophobes dans la matrice de caséine.
- En parallèle des deux derniers chapitres, des expérimentations axées plus spécifiquement sur l'application possible sur des fromages ont été réalisées afin de tester les matériaux actifs ainsi développés.

# Chapitre I. Synthèse bibliographique

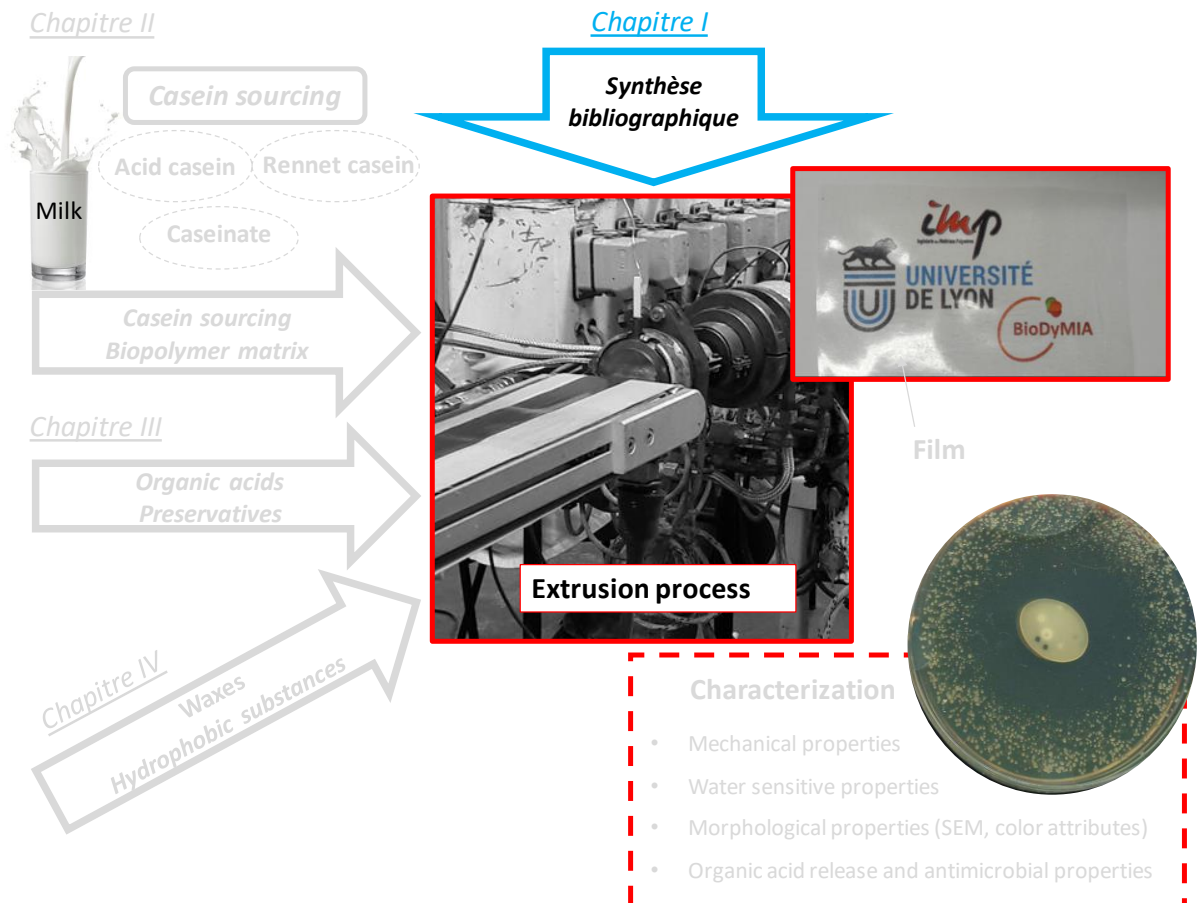


Figure I-1 : Organisation générale du manuscrit - Chapitre I

## Table des figures

Figure I-1 : Organisation générale du manuscrit - Chapitre I .....	I-8
Figure I-2 : Plaques de caséine vertes sur des fromages de Comté .....	I-12
Figure I-3 : Fabrication des Reblochons fermiers et laitiers que l'on distingue par une étiquette en caséine verte ou rouge (plaquette publicitaire du syndicat interprofessionnel du reblochon) .....	I-13
Figure I-4 : Exemples de plaques de caséines commercialisées .....	I-14
Figure I-5 : Schéma représentant le procédé de production actuel des plaques de caséine .....	I-15
Figure I-6 : Dépose manuelle de plaques de caséine sur un Emmental Grand Cru .....	I-16
Figure I-7 : Evolution du Comté et de sa plaque de caséine au cours de l'affinage en cave .....	I-17
Figure I-8 : Distribution de la demande européenne en plastiques par secteurs de marché en 2015 [18]	I-20
Figure I-9 : Analyse du cycle de vie d'un biopolymère (illustration d'un biopolymère à base de caséine)	I-21
Figure I-10 : Pourcentage de la production laitière initiale perdue et gaspillée dans différentes régions aux différentes étapes de production, transport, et utilisation en 2009 (source FAO, 2009) .....	I-22
Figure I-11 : Représentation des différentes origines de biopolymères biosourcés .....	I-24
Figure I-12 : Structures possibles d'un film composite à base de lipides [24] .....	I-26
Figure I-13 : Classification des substances hydrophobes en fonction de leur caractère barrière à l'eau [24] .....	I-29
Figure I-14 : Représentation schématique des fonctions de protection et de transfert entre un aliment et l'enrobage ou film qui l'entoure d'après Debeaufort et al., 1998 [109] .....	I-43
Figure I-15 : A : Réponse de <i>L. innocua</i> à l'ajout direct de nisine et B : Relargage de nisine à pH 5.5 dans un système liquide à partir de films contenant différentes concentrations de l'antimicrobien [177] .....	I-58
Figure I-16 : Schéma représentant la préservation d'un aliment avec ou sans enrobage/film comestible actif ; (a) détérioration liée à des transferts d'eau, (b) détérioration liée à des transferts de gaz, (c) détériorations liées à un développement microbien [129] .....	I-62
Figure I-17 : Cinétique de diffusion du sorbate de potassium (1) et de la natamycine (2) dans des films de protéines de lactosérum A) à différentes valeurs de pH de la solution de casting et B) à différentes concentrations de NaCl ajoutées [202] .....	I-64
Figure I-18 : Législation Européenne concernant les matériaux pour contact alimentaire [207] .....	I-66
Figure I-19 : Diagramme schématique des zones hydrophiles, hydrophobes, chargées et non chargées des différentes caséines à pH 6,6 (adapté et modifié de Kessler et al., 2013 et Swaisgood, 2003 [218], [219]) .....	I-70
Figure I-20 : Représentation schématique de l'hydrolyse de la caséine $\alpha$ par la chymosine [225] .....	I-72
Figure I-21 : Représentation de caséine (sous le modèle en structure interne uniforme) et des mécanismes de coagulation (acide et enzymatique) [230], [231] .....	I-75

Figure I-22 : Récapitulatif des différents modèles de structure et d'organisation de la micelle de caséine [230], [231], [233]–[238].....	I-77
Figure I-23 : Deux approches pour la mise en forme de polymères biosourcés [244].....	I-81
Figure I-24 : Schématisation du potentiel de transformation des caséines .....	I-86

## Table des tableaux

Tableau I-1 : Comparaison des caractéristiques de différents polymères [23] .....	I-25
Tableau I-2 : Tableau récapitulatif des films à base d'hydrocolloïdes et de cires ainsi que leur procédé d'obtention et les caractéristiques apportées par l'ajout de cires.....	I-31
Tableau I-3 : Liste de biopolymères extrudés et leurs propriétés adapté de Gomez-Estaca, 2016 [76]... I-38	
Tableau I-4 : Liste non exhaustive d'ingrédients et additifs à la base de formulation de films ou enrobages comestibles [108] .....	I-45
Tableau I-5 : Propriétés fonctionnelles nécessaires aux films comestibles en fonction de l'application visée [131] .....	I-47
Tableau I-6 : Conditions de stockage de différentes denrées alimentaires et facteurs déterminants pour leur durée de vie [111].....	I-49
Tableau I-7 : Liste des additifs alimentaires qui peuvent être utilisés dans des emballages antimicrobiens [150] .....	I-53
Tableau I-8 : Liste des sources d'huiles essentielles et de leurs constituants étudiés dans la littérature [154] .....	I-56
Tableau I-9 : Présentation des acides organiques et de leurs sels : structure chimique, propriétés physiques et aspect réglementaire.....	I-60
Tableau I-10 : Etudes de l'activité anti-Escherichia coli des acides organiques et de leurs sels. Expression de la Concentration Minimale Inhibitrice (MIC) déterminée en g/L dans chaque cas).....	I-61
Tableau I-11 : Composition du lait moyen (% de masse) de différentes espèces [210] .....	I-68
Tableau I-12 : Composition protéique moyenne du lait de vache (selon Walstra et Jenness, 1984 [211])I-69	
Tableau I-13 : Propriétés des caséines $\alpha_{S1}$ , $\alpha_{S2}$ , $\beta$ et $\kappa$ (NOTE : Les variations génétiques et des degrés de phosphorylation différents induisent les écarts) [220]–[223].....	I-71
Tableau I-14 : Les différents types de caséines commercialisées (caséine présure, caséine acide et caséinate) et leurs propriétés [229] .....	I-74
Tableau I-15 : Utilisations et fonctions des caséines en alimentaire [229] .....	I-79



# Chapitre I : Synthèse bibliographique

## I.1 La traçabilité en fromagerie

### I.1.1 Aspect législatif concernant les fromages AOP

La traçabilité des produits alimentaires est primordiale afin de justifier de la qualité organoleptique et sanitaire de ces denrées. Les consommateurs sont conscients du marquage apposé sur le fromage avant la vente en direct indiquant notamment la dénomination commerciale du produit (« business to consumer ») représenté par des étiquettes non comestibles mais aptes au contact alimentaire. Ces étiquettes contiennent des informations telles la dénomination, la teneur en matière grasse, la DDM (Date de Durabilité Minimale), les informations sur le fabricant, la provenance et la marque de salubrité. Cependant, une traçabilité est déjà mise en place par un autre marquage pour les fromages dit d'Appellation d'Origine Protégée (AOP) en aval pour une traçabilité en B to B (Business to Business), généralement entre des affineurs et leurs grossistes et revendeurs.

Dans le cadre des fromages AOP, la législation française et européenne décrit l'utilisation de plaques de caséine pour la traçabilité de fromages bien spécifiques. En effet, depuis plus de 30 ans en France, des plaques de caséine sont apposées sur des fromages AOP afin de prouver la qualité de ce type de fromage et de prouver le respect du cahier des charges par le décret du 18 mars 1982, l'arrêté du 8 septembre 1983 et l'arrêté du 28 novembre 2007 [1]–[3]. De nombreux arrêtés français et règlements d'exécution européens ont été ajoutés au fur et à mesure à la réglementation française du 8 septembre 1983 et à la réglementation européenne relative à la protection des indications géographiques et des appellations d'origine des produits agricoles et des denrées alimentaires [1], [4]. Il est demandé dans ces articles de rendre obligatoire l'apposition d'une marque en caséine incorporée au fromage pendant la fabrication avec des caractéristiques précises (couleur, taille et informations d'identification). Cette étiquette en caséine permet d'améliorer la traçabilité du produit, d'attester la région d'origine et d'établir une relation entre chaque lot de lait reçu, conforme aux exigences constantes du cahier des charges.

### I.1.2 Exemples d'étiquetage des fromages AOP

Le règlement (CE) N° 510/2006 relatif à la protection des indications géographiques et des appellations d'origine des produits agricoles et des denrées alimentaires est sollicité par les syndicats interprofessionnels pour modification et enregistrement du cahier des charges des fromages AOP qui impose à ce moment-là un marquage par plaques de caséine pour la traçabilité [4], [5].

En plus de leur rôle de protection des AOP et de traçabilité, les étiquettes en caséine imposées par arrêtés sont approuvées par les groupements ou syndicats de producteurs, lesquels les mettent à la disposition des producteurs des fromages concernés afin de mieux suivre les quotas de ces fromages de grande qualité et de contrôler l'avenir de la filière par la limitation des quotas pour ne pas déséquilibrer le marché.

Le Comté est le fromage français AOP le plus commercialisé avec environ 54 704 tonnes commercialisées en 2015 (source Chiffres clés 2015, ODG, INAO/CNAOL). La plaque de caséine verte placée sur les fromages de Comté permet une meilleure traçabilité et permet au Comité Interprofessionnel de Gestion du Comté (CIGC) une meilleure maîtrise des quantités produites. Cette plaque est composée de caséines et de chlorophylle naturelle afin d'obtenir des étiquettes biocompatibles avec le fromage. Dans le cas du Comté, une plaque de caséine verte, de forme ovale de dimensions 105 mm par 60 mm, indiquant l'origine France, l'appellation Comté, le mois et l'année de fabrication, le code du département et le code de la fruitière. La typographie elle-même de ces informations est réglementée (modèle d'inscription, taille des lettres...). Deux autres plaques de caséine transparentes quant à elles entourent la plaque verte et indiquent le jour de fabrication et le numéro de cuve (Figure I-2). Ces différentes caractéristiques sont décrites dans l'arrêté du 8 septembre 1983 [1].



Figure I-2 : Plaques de caséine vertes sur des fromages de Comté

Le Reblochon est également un fromage AOP commercialisé à près de 16 000 tonnes en 2015 (source ODG, INAO/CNAOL). Le Reblochon bénéficie depuis 1958 d'une Appellation d'Origine Protégée correspondant à un cahier des charges spécifiques permettant de garantir l'origine, la traçabilité et la qualité du fromage auprès des consommateurs. Des étiquettes en caséine verte ou rouge selon s'il s'agit d'un Reblochon fermier ou laitier [6] sont incorporées au fromage lors de sa fabrication comme décrit dans la Figure I-3.

**DU LAIT... AU FROMAGE !**

Dans la famille Reblochon, il en existe 2

<i>les spécificités de la fabrication fermière</i>	<i>les étapes de fabrication du Reblochon</i>	<i>les spécificités de la fabrication laitière</i>
Le lait de chaque troupeau est transformé directement à la ferme.	La traite a lieu deux fois par jour.	Le lait est conservé à la ferme jusqu'au passage du camion de lait, une fois par jour.
La fabrication a lieu deux fois par jour, juste après chaque traite ; le lait est transformé encore chaud.	Tous les Reblochons sont fabriqués à partir de lait cru et entier.	La fabrication a lieu en coopérative une fois par jour, après assemblage des laits de plusieurs exploitations. Le lait est refroidi pour le stockage et le transport. Il sera réchauffé pour la fabrication.
Toutes les étapes de fabrication se font à la main.	<b>Emprésurage - décaillage</b> Sous l'action de la présure, le lait coagule et forme un caillé qui sera découpé en petits grains.	
Les moules sont recouverts d'une toile de lin.	<b>Moulage - pressage et pose de la pastille de caséine</b> Les grains de caillé sont versés dans des moules puis pressés. On pose ensuite la pastille de caséine qui permet la traçabilité des fromages (la caséine est une protéine du lait, donc comestible).	La pastille de caséine est rouge.
La pastille de caséine est verte.	Un poids recouvre ensuite chaque fromage afin de l'égoutter.	
Le séchage et l'affinage sont souvent réalisés sur des planches d'épicéa. L'affinage se poursuit à la ferme ou chez un affineur.	<b>Salage - séchoir - affinage</b> Les Reblochons sont ensuite salés (en saumure ou à sec) et placés sur des planches pour finir de s'égoutter. L'affinage dure minimum 15 jours en cave.	
Ce logo sera toujours présent sur l'emballage d'un Reblochon fermier.	<b>Emballage</b> Tous les Reblochons sont emballés avec une fine plaque d'épicéa qui permet de réguler l'humidité et de poursuivre l'affinage.	
Vous pourrez également acheter les Reblochons fermiers à la ferme.	Entre la traite et votre assiette, 21 jours minimum se sont écoulés. Le Reblochon est vendu en grande surface, ou dans votre crèmerie traditionnelle.	Vous retrouverez également les Reblochons laitiers dans les magasins des coopératives.



Figure I-3 : Fabrication des Reblochons fermiers et laitiers que l'on distingue par une étiquette en caséine verte ou rouge (plaquette publicitaire du syndicat interprofessionnel du reblochon)

Sur de nombreux autres fromages français tels le Chevrotin, l'Abondance, le Beaufort, le Salers, le Morbier ... un marquage en plaques de caséine est obligatoire pour prouver la qualité en réponse aux cahiers des charges établis et permettre la traçabilité des denrées.

Des fromages italiens comme le Grana Padano ou l'Asiago [7] ; des fromages espagnols tels le Queso Manchego et l'Idiazabal [8] ; ou encore portugais avec l'exemple du Queijo Serra da Estrela [9] sont des fromages d'Appellation d'Origine Protégée répondant à un cahier des charges et dont le marquage par une étiquette en caséine est obligatoire.

### I.1.3 Fabrication et dépôt du marquage obligatoire en caséine sur les fromages

#### I.1.3.1 Fabrication des plaques de caséine

Deux entreprises dans le monde fournissent les industries fromagères avec ce biomatériau à base de caséine : Het Kaasmerk–Matec et Labelys. Ces entreprises produisent des plaques de caséine pour le marquage obligatoire officiel de certains fromages AOP mais, ils peuvent aussi fournir des plaques de différenciation avec un rôle marketing ou des plaques avec un rôle plus technique comportant nombre, numéro de série ou QR code par exemple comme outils de gestion de la production et aide à la traçabilité (Figure I-4).



Figure I-4 : Exemples de plaques de caséines commercialisées

La fabrication actuelle des plaques de caséine est réalisée par un procédé en batch comme présenté dans le schéma en Figure I-5. La matière première qui est la caséine présure sous forme de poudre est mélangée à des matières d'origine végétale (glycérol et éthanol) qui permettront la production d'un polymère plastifié dans un moule sous pression à 90°C. La matière reste sous pression pendant 5 heures pour former un bloc de 200 kg (correspondant à environs 43 000 plaques de type Comté par exemple). Les blocs sont stockés et maturés une quinzaine de jours pour qu'ils durcissent par séchage et perte d'eau avant d'être découpés sur une dérouleuse, pour obtenir des bobines d'une longueur d'environ 600 mètres. Le rouleau ainsi obtenu est ensuite transféré sur une banderoleuse afin d'obtenir des laizes de 15 cm. Ces laizes sont ensuite perforées afin de faciliter l'évacuation du lactosérum de la plaque de caséine au moment du moulage du fromage et ainsi garantir une meilleure adhésion de la plaque sur le fromage. Viennent ensuite les étapes de découpe et d'impression des étiquettes selon la réglementation en vigueur ou selon la demande des clients.

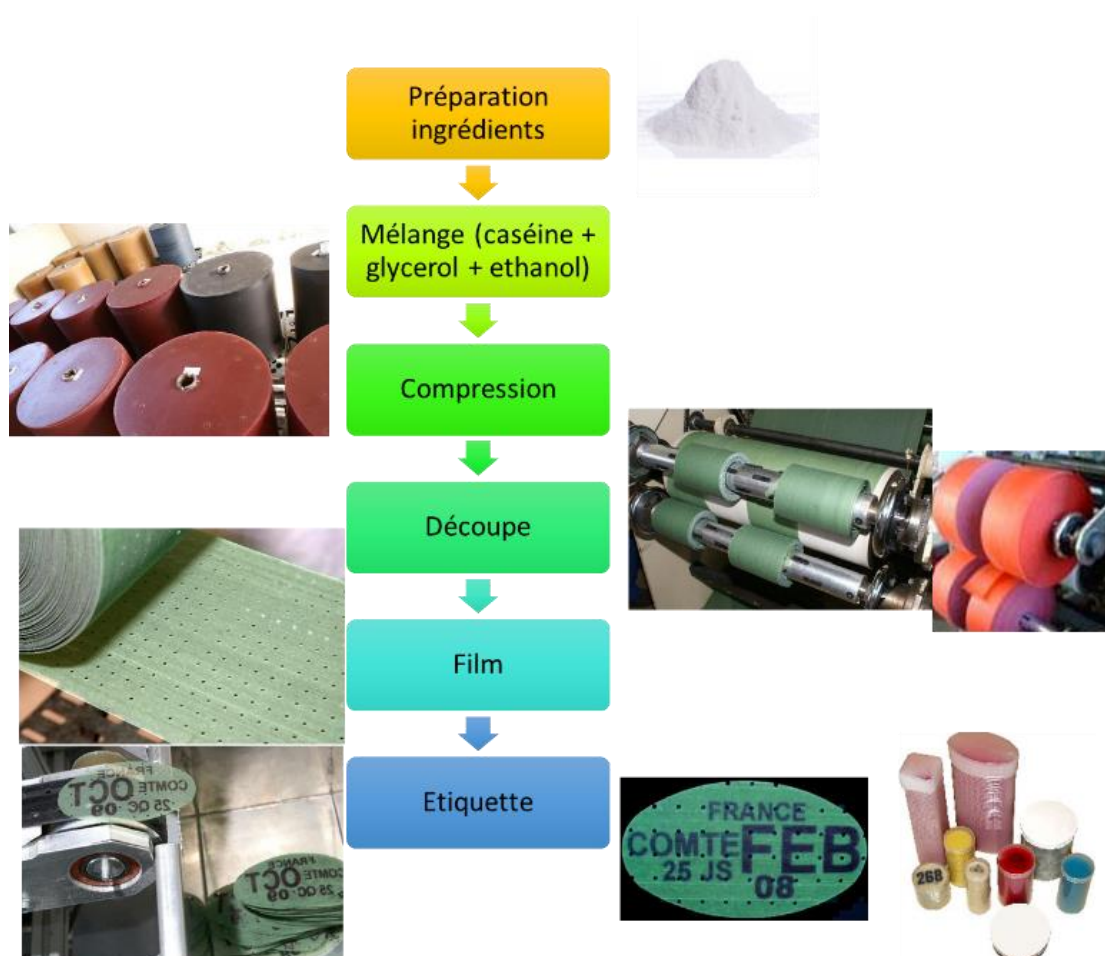


Figure I-5 : Schéma représentant le procédé de production actuel des plaques de caséine

### *I.1.3.2 Dépôt des plaques de caséine*

Quel que soit le type de fromage, pâtes pressées cuites ou non ou pâtes molles à croûte fleurie ou lavée, les plaques de caséine sont apposées la plupart du temps manuellement sur le caillé au moment du moulage (voir Figure I-6). Cette étape est propice à la dépose de l'étiquette car grâce à la forte teneur en eau du caillé à ce moment-là, l'étiquette aura une bonne adhésion sur le fromage.



*Figure I-6 : Dépense manuelle de plaques de caséine sur un Emmental Grand Cru*

De nombreux fromages AOP nécessitent un affinage (période de maturation) plutôt long (4 à 24 voire 36 mois dans le cadre du Comté). Au cours de l'affinage, les fromages vont développer leurs goûts, saveurs et textures particulières. Dans les caves d'affinage, des conditions particulières de température et d'humidité permettent l'évolution du fromage par des transformations biochimiques et microbiologiques. Entre autres phénomènes, le sel du caillé migre dans la pâte et l'extérieur du fromage s'assèche pour donner naissance à la croûte. Les soins apportés aux fromages, les conditions des caves et les planches sur lesquelles reposent les fromages, apportent la flore microbienne complexe qui continuera à développer les saveurs, l'aspect et la texture du fromage en question [10], [11].

Lors de l'affinage, la flore microbienne complexe se sert du fromage comme substrat mais, également de la plaque de caséine. La problématique industrielle, en partie à l'origine de ce projet, est la lisibilité des plaques de caséine pour des affinages « longs ». En effet, le Comté par exemple, possède une étiquette en caséine verte comportant les informations essentielles concernant sa traçabilité comme imposées par la loi mais, celle-ci est déjà difficilement lisible après une semaine d'affinage et clairement recouverte et illisible après 3 mois d'affinage (voir Figure I-7).



Figure I-7 : Evolution du Comté et de sa plaque de caséine au cours de l'affinage en cave

Le matériau de remplacement visé dans ce projet correspond ainsi à différentes attentes industrielles. Tout d'abord, l'élaboration d'un procédé de fabrication moins coûteux et continu pour la fabrication d'étiquettes permettrait de répondre à une attente économique des industriels. L'amélioration de la traçabilité alimentaire par la fabrication d'un matériau actif par des solutions naturelles pour améliorer la conservation des aliments (clean label) sera également une priorité dans ce projet.

Le travail étant basé sur la protéine majoritaire du lait, la caséine, avec des visées agroalimentaires, le matériau biosourcé créé sera produit de manière à être biodégradable et comestible. Ces caractéristiques donneront à ce matériau un potentiel intéressant pour de nombreuses applications en emballage ou étiquetage en agroalimentaire (viande, produits secs, ...). Afin de saisir l'impact du choix des caséines comme matière première pour ce type de matériau, il convient d'évaluer les autres matériaux similaires déjà étudiés ou commercialisés.

## I.2 Les biopolymères

### I.2.1 Lexique des « bio » concepts

Le terme « **biomatériau** » aurait pu être utilisé dans ce chapitre mais, un biomatériau est généralement défini par l'application jusqu'à présent majoritairement commercialisée (car forte valeur ajoutée) dans le domaine biomédical, c'est-à-dire qu'un biomatériau se définit comme substance ou matière destinée à être implantée dans un organisme vivant pour remplacer un organe ou un tissu (source : Larousse). Dans le cadre de ce travail, un biomatériau sera considéré comme un terme plus générique à « **biopolymères** ». En effet, les biopolymères peuvent être définis comme des polymères issus exclusivement d'organismes vivants ou synthétisés à partir de ressources renouvelables [12]. Les deux caractères souvent associés aux biopolymères sont leur origine « **biosourcée** » et leur « **biodégradabilité** ».

La définition à tendance à paraître d'autant plus complexe que certains plastiques biosourcés ne sont pas biodégradables (polyéthylène biosourcé, bio-PET, bio-PVC, acétate de cellulose). Il existe également des polymères pétrosourcés biodégradables qui sont obtenus par synthèse comme la polycaprolactone, les copolyesters et les polymères vinyliques [13].

On confond par exemple souvent les matériaux dit « biofragmentables » avec des polymères biodégradables issus de la pétrochimie. Certains polymères biofragmentables sont obtenus à partir de polymères traditionnels pétrosourcés (polyéthylène par exemple) et d'un polymère biosourcé (amidon ou cellulose par exemple). Des additifs pro-dégradants sont d'ailleurs souvent ajoutés pour aider la rupture chimique de chaînes afin que les microorganismes puissent rapidement atteindre et dégrader le polymère biosourcé. Dans cette même catégorie, on retrouve également les polymères oxo-dégradables comme du polyéthylène contenant du dithio isocyanate de fer (ou de nickel ou de manganèse) ou du stéarate de nickel agissant comme agent oxydant pour favoriser la fragmentation du matériau [14], [15]. Ces matériaux fragmentables ne sont en aucun cas reconnus comme biodégradables selon les normes en vigueur (ISO 17556 : 2012, ISO 14855 : 2005, ISO 14851 : 1999) [16].



Pour mieux cerner les biopolymères, voici la définition pour chacune de leurs deux caractéristiques principales, sachant que pour de nombreux organismes comme *European Bioplastics*, les biopolymères sont définis comme biosourcés, biodégradables ou les deux [17].

Selon le BPI (Biodegradable Product Institute), les termes « biosourcé » et « biodégradable » sont parfois confondus. L'institut redonne ainsi la définition d'un matériau issu de ressources renouvelables ou matériau « **biosourcé** » comme, un matériau organique dans lequel le carbone vient d'une source biologique contemporaine (non pétrosourcé). Par conséquent, pour être classé de biosourcé, un matériau doit contenir du carbone récemment fixé présent dans des sources biologiques afin de ne pas inclure dans cette définition les matériaux pétrosourcés.

Comme solution de fin de vie d'un produit, la « **biodégradabilité** » va utiliser la capacité des microorganismes à décomposer la matière en atomes élémentaires dans un certain environnement. L'environnement dans lequel opèrent ces microorganismes doit être parfaitement précisé car un matériau n'est généralement pas dégradé de la même manière dans du compost, du sol, des digesteurs « anaérobie » ou en environnement marin. Souvent, il y a une attente intrinsèque que les polymères biosourcés soient également biodégradables mais, en réalité, il n'y a aucune garantie qu'un polymère issu de ressources renouvelables ait une biodégradabilité significative d'où l'importance de toujours réaliser des études de biodégradabilité pour déterminer l'impact à long terme des matériaux sur l'environnement. Pour qu'un plastique soit biodégradable et sans risque pour l'environnement, il faut que tous les composants de ce plastique le soient. La sécurité vis-à-vis de la toxicité humaine et environnementale doit être évaluée par des protocoles analytiques standardisés (protocoles ISO : International Organization for Standardization ou ASTM : American Society of Testing and Materials) par des agences ayant autorités afin de pouvoir déclarer un matériau biodégradable.

## I.2.2 D'un monde de « plastiques » vers un monde de « bioplastiques »

Les plastiques se retrouvent dans de nombreux objets de notre vie quotidienne, dans l'agriculture, dans l'électronique, dans l'habillement, dans la communication, dans la construction, dans les transports, dans la médecine et bien évidemment dans les emballages, comme le montre la Figure I-8. L'augmentation de l'utilisation de plastique à travers le monde de 1,5 millions de tonnes en 1950 à 232 millions de tonnes en 2010 avec une croissance de 3-4% en plus ces dernières années relance le débat sur les inquiétudes environnementales liées à ces plastiques et leur traitement post-usage.

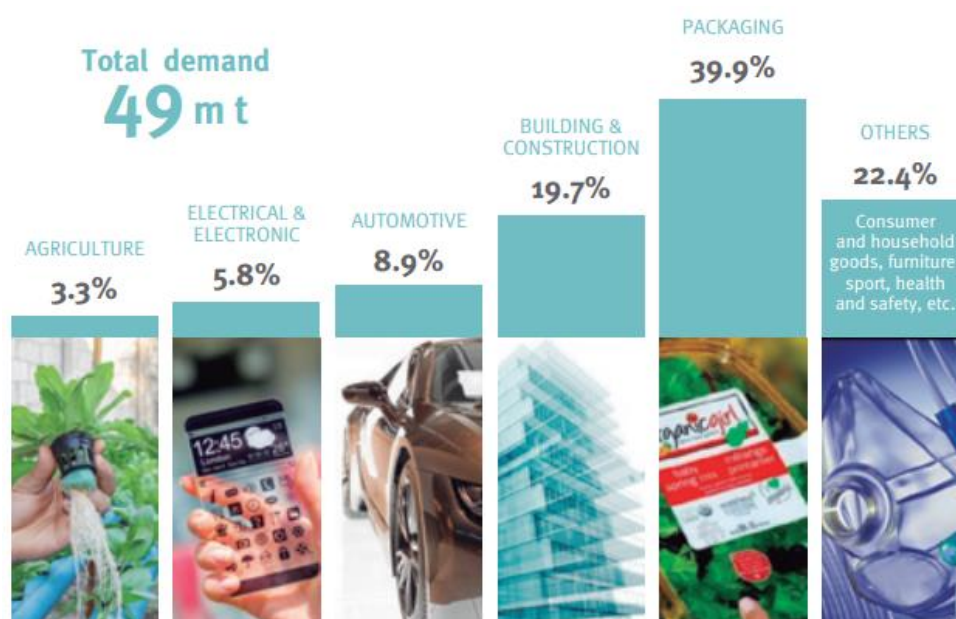


Figure I-8 : Distribution de la demande européenne en plastiques par secteurs de marché en 2015 [18]

La crise pétrolière du milieu des années 70 a forcé l'intérêt pour des solutions alternatives aux produits pétrosourcés. Au vu de la quantité de plastique produite qui ne cesse d'augmenter, ces alternatives se retrouvent aujourd'hui inévitables. Avec l'avancée des découvertes en génétique et les technologies liées à l'ADN, la fabrication de bioplastiques a été étudiée à partir de microorganismes (PHB, PHA and PLA, qui est polymérisé à partir de monomères d'acide lactique produits par fermentation microbienne de sucres et amidons dérivés de plantes). Malgré l'augmentation du coût du pétrole, ce type de bioplastique n'est pas encore compétitif dû au coût de production élevé. Malgré tout, parmi les bioplastiques actuellement disponibles, le PLA, les amidons et les PHA sont les ressources les plus attractives industriellement par leur facilité de production par des méthodes conventionnelles et par leurs propriétés physiques comparables aux plastiques traditionnels.

Les inquiétudes concernant le réchauffement climatique, la sécurité et l'approvisionnement des ressources industrielles à venir, a largement fait croître le marché pour les plastiques biosourcés. Ces derniers sont devenus une alternative aux plastiques pétrosourcés traditionnels cependant, il faut prendre en compte plus de facteurs que la simple origine de la matière première pour considérer un matériau durable comme notamment son cycle de vie dans son ensemble [19], [20]. L'analyse du cycle de vie va permettre d'étudier un matériau de la récolte de sa matière première à sa production et jusqu'à la fin de sa vie après utilisation afin de déterminer son impact environnemental et son potentiel concernant le développement durable. Le schéma suivant permet de voir l'importance de l'étude du cycle de vie dans son ensemble pour la production de bioplastiques et également pour l'exemple de bioplastiques produits à partir de protéines laitières (Figure I-9).

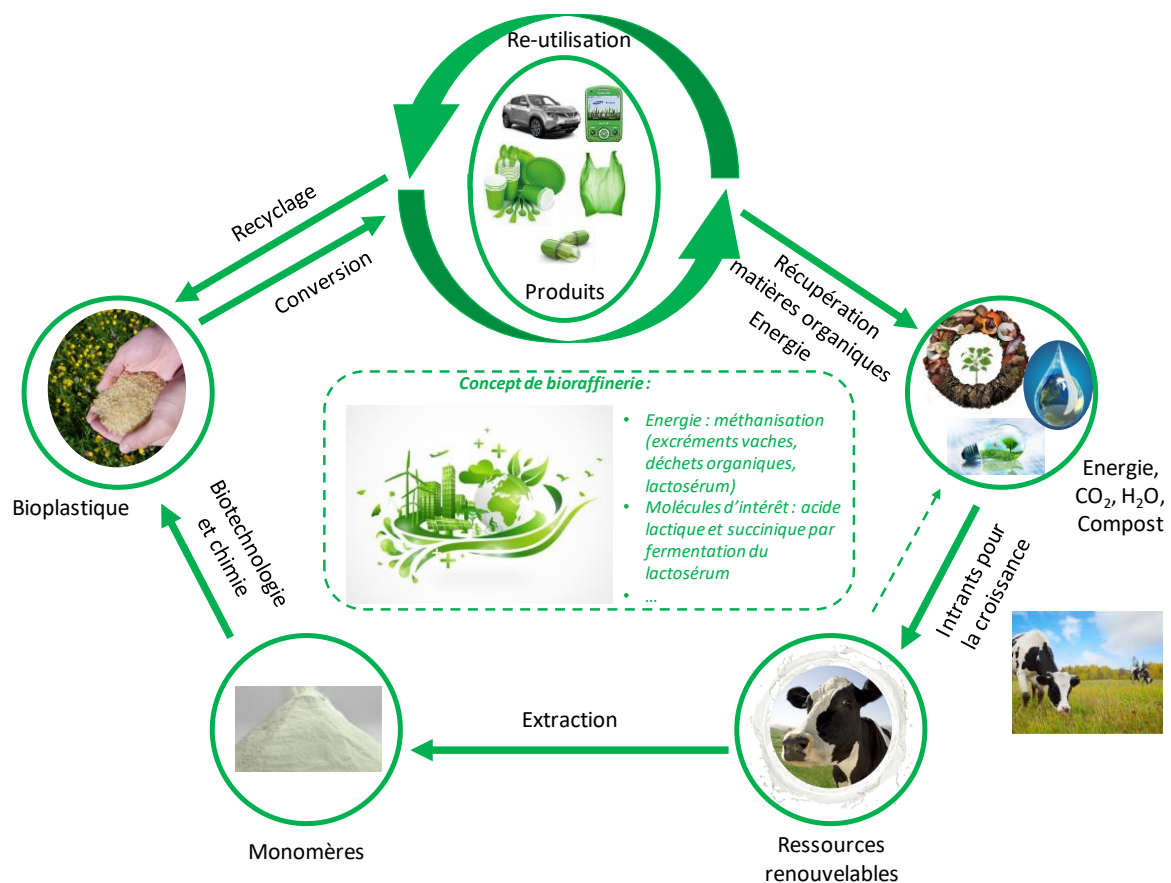


Figure I-9 : Analyse du cycle de vie d'un biopolymère (illustration d'un biopolymère à base de caséine)

De plus en plus, les recherches se tournent sur des déchets ou coproduits qui sont disponibles en grande quantité et qui pourraient être valorisés en tant que matière plastique sans pour autant faire de la concurrence aux ressources destinées à l'alimentation. Ce qui peut être le cas de la caséine dans le cas de lait contaminé par des antibiotiques et donc refusés pour l'alimentation ou bien pour les caséine transformées par des procédés non alimentaire pour leur utilisation dans des colles ou peintures et enfin, on retrouve une grande quantité de caséine qui a dépassé sa date limite d'utilisation et qui pourraient être valorisées dans d'autres secteurs industriels que l'alimentaire. Pour avoir des déchets ou coproduits biosourcés d'une manière générale, le plus simple est de regarder ceux issus de l'agriculture, des industries forestières et de l'industrie agroalimentaire. Concernant les produits laitiers et plus précisément le lait, dans les pays industrialisés 40 à 65% des pertes en déchets ont lieu au niveau de la consommation du produit. D'autres pertes de lait ont lieu lors de la production à cause des maladies comme la vache folle ou la dévalorisation du lait en tant que « non alimentaire » dû à la présence d'antibiotiques par exemple. La Figure I-10 présente les pertes alimentaires significatives au niveau des produits laitiers en 2009 dans différentes régions du monde prouvant ainsi le potentiel d'une filière de valorisation de ces déchets alimentaires.

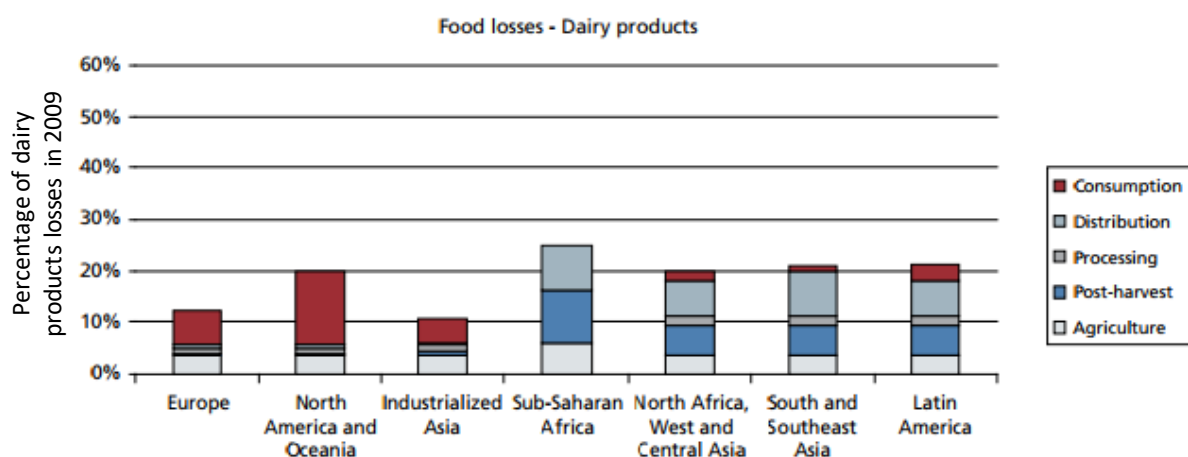


Figure I-10 : Pourcentage de la production laitière initiale perdue et gaspillée dans différentes régions aux différentes étapes de production, transport, et utilisation en 2009 (source FAO, 2009)

Les applications principales de ces matériaux biodégradables sont la collecte de déchets organiques, les applications dans le secteur de l'agriculture et l'horticulture (pots de plantes, films de protection du sol) et l'emballage alimentaire. Dans ce dernier domaine d'application qu'est l'emballage alimentaire, l'utilisation de matériaux biodégradables est un marché de plus en plus attractif puisqu'il permet de réduire l'utilisation de matériaux synthétiques et qu'il attire les consommateurs respectueux de l'environnement qui sont de plus en plus nombreux [21].

Si on considère ces biopolymères pour leurs applications en tant que bioemballages, ils doivent répondre aux directives européennes suivantes : « Matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires » (90/128/EEC) [22]. Cependant, dans ce type de législation écrite pour les plastiques pétrosourcés, les protéines par exemple ou d'autres ingrédients et additifs utilisés dans la formulation de biopolymères ne font pas partie des substances autorisées et les tests de migration obligatoires sont bien trop stricts pour être appliqués à des biopolymères. Il faut donc obligatoirement passer à des emballages comestibles pour pouvoir prétendre satisfaire la législation mais cette fois-ci des aliments.

Dans la thématique de ce sujet de thèse, un matériau biodégradable et comestible est recherché afin de correspondre à la demande des industries agroalimentaires. De plus, dans le cadre d'une collaboration avec des affineurs-fromagers, nous nous intéresserons plus particulièrement aux matériaux à base de protéines laitières, les caséines.

### I.2.3 Différentes origines de biopolymères

Les biopolymères correspondent à des matériaux synthétisés par les êtres vivants tels les végétaux, les animaux et les microorganismes. Un grand nombre de ressources renouvelables telles les sucres et polysaccharides, les huiles végétales, la lignine et les protéines ont déjà été étudiées pour la réalisation de polymères biosourcés. Il suffit de pouvoir former une matrice ayant suffisamment de cohésion et de continuité pour que ces matières premières soient à l'origine de biopolymères. Ci-dessous (Figure I-11) est présentée la répartition des biopolymères disponibles à partir de ressources naturelles renouvelables :

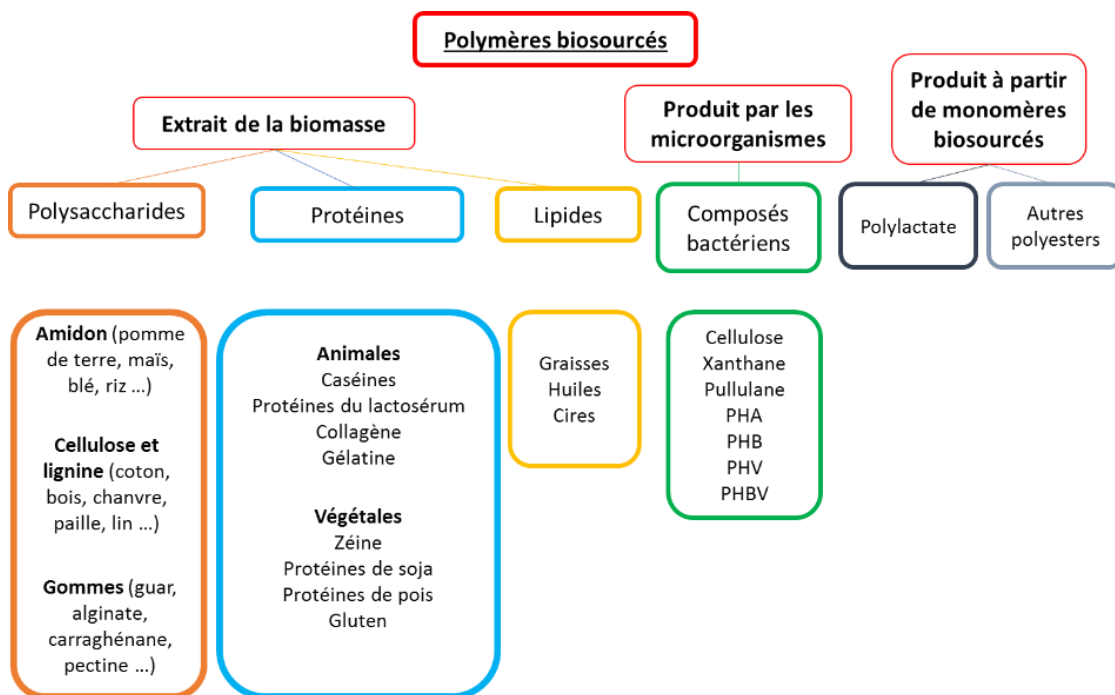


Figure I-11 : Représentation des différentes origines de biopolymères biosourcés

Le Tableau I-1 présente quant à lui quelques-unes des différences remarquables des biopolymères en comparaison avec des polymères synthétiques pétrosourcés ou en mélange [23].

Tableau I-1 : Comparaison des caractéristiques de différents polymères [23]

	<b>Polymères pétrosourcés</b>	<b>Polymères biofractionnables</b>	<b>Biopolymères</b>
<b>Exemples</b>	Polyéthylène (PE) Polystyrène Polypropylène	Mélange de polymères synthétiques et naturels : PE+amidon, PE+cellulose	Cellulose Amidons Protéines
<b>Biodégradabilité</b>	Non (au moins 500 ans)	Seulement la partie biosourcée	Oui
<b>Compostabilité</b>	Non	Faible	Oui
<b>Prix</b>	Peu coûteux	Moyen	Assez cher (2-10 fois plus cher que les polymères traditionnels)
<b>Propriétés physiques et mécaniques</b>	Très bonnes et grande diversité	Diversité	Assez bonnes mais moins de diversité pour le moment
<b>Toxicité</b>	Oui lors de la combustion	Oui lors de la combustion	Non si aucun additif toxique ajouté
<b>Matière première</b>	Non renouvelable	Partie non renouvelable + partie renouvelable	Renouvelable

Les propriétés disponibles dans la catégorie des biopolymères restent encore assez limitées en comparaison avec celles de polymères traditionnels mais, leur part de marché ne cesse de croître notamment par leur développement sur des applications à courte durée de vie et à usage unique. Le développement des biopolymères est d'autant plus important dans les pays occidentaux où les consommateurs sont très impliqués dans la protection de l'environnement. On retrouve ainsi les biopolymères dans les secteurs médicaux, agricoles et alimentaires principalement.

## I.2.4 Les composites

Un biopolymère composite permet de modifier les propriétés finales du matériau en adéquation avec l'application visée. Les composites peuvent être formés couche par couche ou provenir d'un mélange de différents biopolymères afin d'obtenir un matériau homogène.

Les lipides sont par exemple souvent associés à d'autres matrices (protéines ou polysaccharides) pour former un matériau multicouche ou une émulsion afin d'améliorer les propriétés barrière à l'eau du film final. Les différentes structures possibles pour ce type de composite sont présentées dans la Figure I-12 suivante d'après Debeaufort et al. [24] :

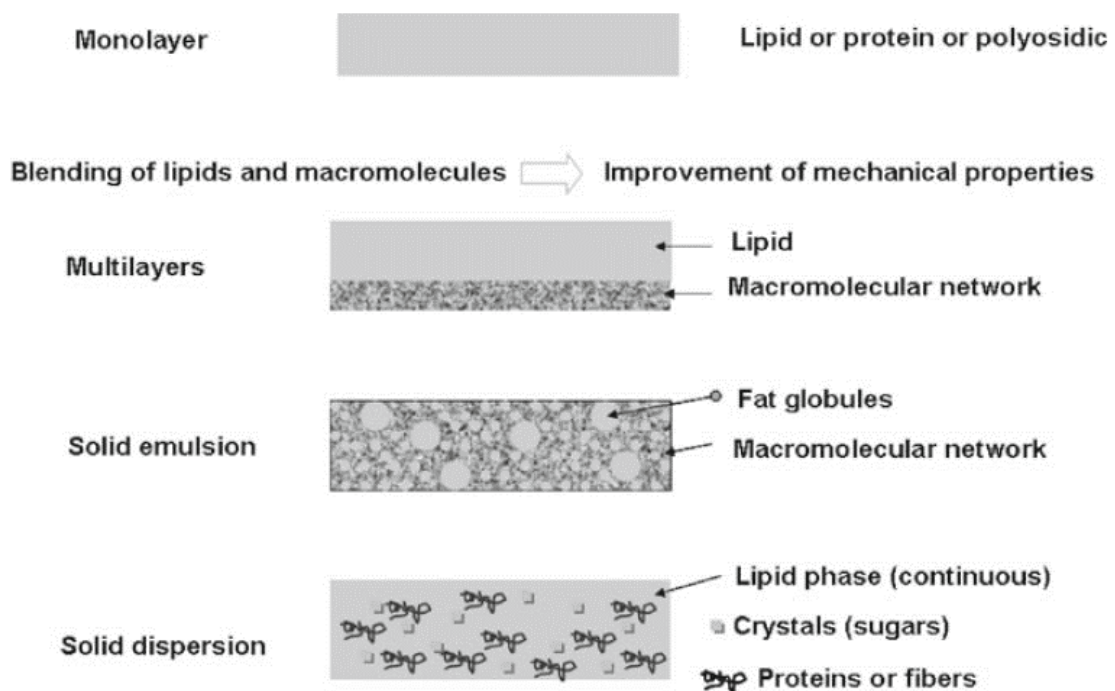


Figure I-12 : Structures possibles d'un film composite à base de lipides [24]

Le mélange de biopolymères permet d'obtenir un film avec des propriétés uniques qui combine les meilleurs attributs de chaque ingrédient du mélange [25].

Les propriétés physico-chimiques et mécaniques des plastiques peuvent être modifiées par un grand nombre d'ajouts. La charge est couramment utilisée pour réduire le coût du matériau ou pour renforcer ses propriétés physiques comme la contrainte à la rupture par exemple. Les fibres, particulièrement de bois, de verre ou de carbone sont souvent ajoutées aux formulations des composites pour réduire les coûts et obtenir de nouvelles propriétés. L'incorporation de fibres naturelles provenant de différentes sources (végétales, animales



ou minérales) permet d'obtenir un matériau composite biodégradable si elles sont ajoutées à une matrice polymère elle aussi biodégradable, ce qui en fait un composite renouvelable. De plus, de nombreuses études cherchent à valoriser les co-produits de l'agriculture en utilisant des fibres pour produire des matériaux composites. Les fibres issues de la production d'huile de soja ont été incorporées à un mélange de poly(3-hydroxybutyrate-co-valerate) et polylactide à 30% par Nanda et al. ; cela leur a permis d'améliorer le module de Young du matériau composite et ainsi de démontrer le transfert efficace de la contrainte de la matrice vers les fibres [26].

### I.2.5 Les additifs

Afin d'améliorer les propriétés des matériaux, de nombreux additifs peuvent être ajoutés à la formulation.

De nombreux composés peuvent être ajoutés aux formulations à base de biopolymères comme des cires, de la lignine, des émulsifiants, des antioxydants, des antimicrobiens, des produits nutraceutiques, des arômes et des colorants ... [27]–[30]. Comme les additifs peuvent être divers et cumulés, la composition des films doit être ajustée en conséquence afin de garder une structure homogène et des propriétés satisfaisantes [31]. La plupart de ces additifs sont ajoutés afin de promouvoir de nouvelles fonctions aux biopolymères et ainsi leur permettre de protéger les aliments dans le cadre d'emballages actifs contre l'oxydation et la détérioration microbienne, et ainsi garantir une meilleure qualité et sécurité des produits (voir paragraphe ultérieur : I.2.8). On peut également incorporer des stabilisants qui vont aider à contrôler la détérioration biologique et/ou chimique du matériau. Les colorants sont quant à eux des petites particules permettant de changer la couleur du plastique sans induire de réactions chimiques [32], [33]. Les solvants restent souvent assez restreints afin de pouvoir garder un caractère biodégradable voir comestible et sont donc souvent l'éthanol, des acides organiques ou de l'eau.

Les additifs sont soumis au type de matrice polymérique utilisé ainsi qu'au mélange formulé mais, également au type de procédé de fabrication mis en place. Certains additifs naturels sont notamment volatiles et/ou thermolabiles ainsi, le procédé doit être en accord avec ce type d'additif pour éviter son inactivation. Del Nobile et son équipe ont montré que des extraits de thym et de citron ainsi que du lysozyme garde une meilleure activité antimicrobienne lorsqu'ils sont incorporés en extrusion au PCL (Polycaprolactone) que lorsqu'ils sont incorporés au PLA ou au LDPE car ces derniers sont extrudés à une température deux fois plus élevée [34].

### *1.2.5.1 Cas particulier des plastifiants*

Dans le cas des thermoplastiques, les films doivent être flexibles et avoir une bonne tenue afin d'être manipulés et ne pas se briser lors du transport et du stockage des denrées alimentaires, d'où l'ajout de plastifiants (eau, sorbitol, glycérol, polyéthylèneglycol ...). Les plastifiants de qualité alimentaire qui permettent la production de films et enrobages comestibles sont les polyols (glycérol, sorbitol, polyéthylèneglycol), les sucres (glucose, miel) et les lipides (monoglycérides, phospholipides, surfactants) [35].

Les plastifiants ont un groupement hydroxyle qui leur permet une bonne compatibilité avec la plupart des polymères. Ce sont donc des composants essentiels surtout dans le cas des films à base de protéines et polysaccharides afin d'éviter d'avoir un film rigide et cassant dû aux considérables interactions par des liaisons faibles entre les molécules du polymère [36]. Les plastifiants augmentent la thermoplasticité et donc la flexibilité et la processabilité des films en se plaçant entre les molécules du polymère et en interférant avec les interactions polymère-polymère [36], [37]. Les plastifiants augmentent le volume libre des structures du polymère et la mobilité moléculaire des molécules ce qui va augmenter le ratio des régions amorphes par rapport aux régions cristallines et également diminuer la température de transition vitreuse [36], [38]. La plupart des plastifiants sont hydrophiles et hygroscopiques et attirent les molécules d'eau. L'eau étant également le plastifiant le plus couramment utilisé pour les biopolymères avec cependant, le risque de perte lors d'une déshydratation à faible humidité relative [36], [37]. De ce fait, d'autres plastifiants que l'eau sont utilisés dans la composition afin de réduire la perte d'eau, d'augmenter le taux d'eau lié et de maintenir une activité en eau élevée. Les plastifiants vont affecter les propriétés mécaniques du matériau final (module d'élasticité, allongement) mais également la perméabilité aux gaz et à la vapeur d'eau [39], [40]. Chaque plastifiant aura une efficacité de plastification différente en fonction de la taille et de la forme de ses molécules, en fonction du nombre d'atomes d'oxygène et de leur distance spatiale dans la structure du plastifiant et en fonction de sa capacité à lier l'eau. Les molécules d'eau ont un effet plastifiant considérable sur les films à base de protéines en particulier. L'eau comme les autres plastifiants facilite le mouvement des chaînes de protéines par l'ajout de liaisons faibles et augmente la flexibilité du réseau. Par contre, un trop grand taux de plastifiant peut diminuer la cohésion du réseau car dans ce cas, trop de liaisons plastifiant-plastifiant rentrent en compétition.

### I.2.5.2 Cas particulier des composés hydrophobes

Les composés hydrophobes ont déjà été énoncés précédemment pour leur propriété filmogène et pour leur caractère hydrophobe mis à contrepartie dans des matériaux composites. En fonction de leur concentration dans la formulation finale, ils seront considérés comme additifs ou comme partie d'un composite.

La nature hydrophobe des films et enrobages à base de lipides leur confère une grande résistance à l'eau. La classification des substances hydrophobes selon leur perméabilité à la vapeur d'eau est donnée par la Figure I-13 ci-dessous [24] :

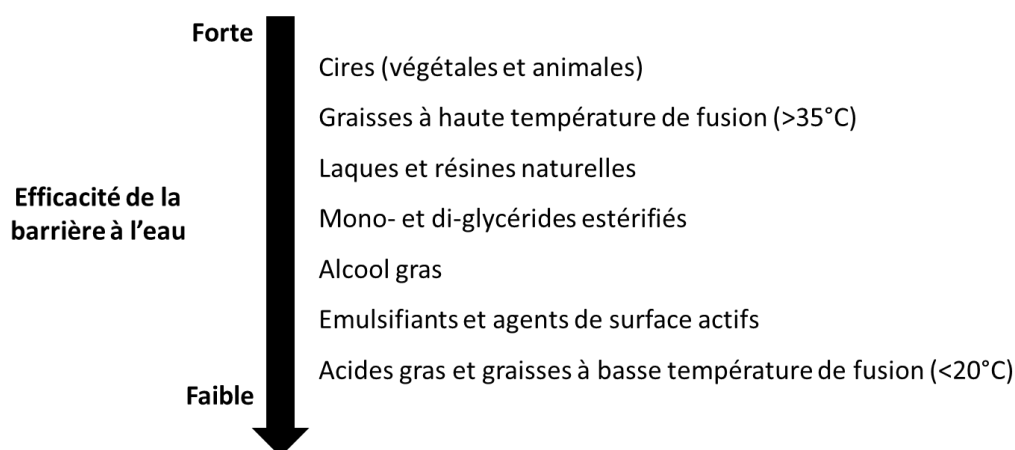


Figure I-13 : Classification des substances hydrophobes en fonction de leur caractère barrière à l'eau [24]

Ces films sont donc utilisés pour empêcher la migration d'humidité dans les denrées alimentaires [41]. Cette caractéristique est l'atout majeur des lipides car c'est ce qu'il manque aux films de protéines et de polysaccharides. Une formulation composite à base de protéines ou polysaccharides associée à des lipides ou cires pourrait permettre de conjuguer idéalement la barrière à l'eau des uns et la barrière à l'huile et à l'oxygène des autres. Ce dernier point sera abordé plus loin dans le paragraphe relatif au relargage contrôlé.

La capacité barrière des films de protéines peut ainsi être améliorée par l'ajout de composés hydrophobes [21]. Comme présenté en Figure I-12, une première approche consiste à intégrer les lipides ou autres composés hydrophobes aux solutions afin de préparer une émulsion qui sera ensuite étalée et séchée pour obtenir un film.

Shellhammer et Krochta ont étudié l'influence de l'ajout de différents types de composés hydrophobes et leur teneur sur la perméabilité à la vapeur d'eau de films à base d'isolats de protéines de lactosérum et de glycérol [42]. Ainsi, de la cire de candelilla, de carnauba et d'abeille ont été testées. Dans leur étude, la perméabilité à la vapeur d'eau diminue avec l'augmentation de la teneur en cire (jusqu'à la limite de 50% de contenu en cire). Des films ont pu être formés avec des teneurs en cire d'abeille jusqu'à 70-80% mais jusqu'à seulement 40% pour les autres cires.

Les composés hydrophobes peuvent également former une couche à part entière déposée sur une autre couche faite à partir d'un hydrocolloïde. Quand une couche hydrophobe est déposée sur une couche à base d'hydrocolloïdes, la barrière à la vapeur d'eau est supérieure à celle d'une émulsion des mêmes ingrédients [43]. C'est pour cette raison que dans le cas des émulsions, la répartition des lipides dans la matrice est très importante. La structure en multicouche est également plus complexe et demande plus d'étapes. De plus, la délamination des couches reste un problème récurrent entre des matériaux polaires et apolaires, malgré l'ajout de tensioactifs.

Qu'ils soient ajoutés comme additifs ou ingrédients dans la formulation, les composés hydrophobes peuvent être incorporés de différentes manières dans la matrice d'hydrocolloïdes principale comme le montre la Tableau I-2.

Le Tableau I-2 suivant permet de voir l'avancée des recherches concernant l'ajout de cires dans des matrices d'hydrocolloïdes servant principalement à l'enrobage de denrées alimentaires mais également en tant que film pour l'emballage.

Tableau I-2 : Tableau récapitulatif des films à base d'hydrocolloïdes et de cires ainsi que leur procédé d'obtention et les caractéristiques apportées par l'ajout de cires

Cires	Matrice support	Procédé - Incorporation	Propriétés	Références
Cire d'abeille : acide oléique (émulsifiant) 30% (m/m protéine)	Protéine de lactosérum	Solution casting	- Augmente le relargage du lysozyme à partir du film - Activité antimicrobienne (+ lysozyme) des films contre <i>Listeria innocua</i>	Boyaci, 2016 [44]
Cire de candelilla 10% (m/m polysaccharide ou protéine)	Carboxyméthylcellulose ou amidon de pomme de terre ou isolat de protéine de soja ou gélatine	Solution casting	- Bon transport de l'acide ascorbique	Kowalczyk, 2016 [45]
Cire de candelilla 10% (m/m polysaccharide ou protéine)	Carboxyméthylcellulose ou amidon de pomme de terre ou isolat de protéine de soja ou gélatine	Solution casting	- Propriétés du films biopolymère/cire de candelilla améliorées par l'ajout d'extraits ethanoliqes de houblon	Kowalczyk, 2016 [46]
Cire de carnauba Ratio cire : alginate = 17,94 : 1	Alginate de sodium	Enrobage d'aubergines par une émulsion	- Fermeté mieux conservée - Meilleure activité antioxydante	Singh, 2016 [47]
Cire d'abeille : acide oléique (émulsifiant) Ratio : 5:1	Hydroxypropyl méthylcellulose	Enrobage de tomates cerise avec préparation d'une émulsion	- Enrobage avec benzoate de sodium efficace pour inhiber <i>Alternaria alternata</i> - Contrôle de la perte en eau amélioré - Amélioration de l'aspect visuel et de la brillance	Fagundes, 2015 [48]
Cire de candelilla (+ huile de jojoba)	/	Enrobage de pomme avec préparation d'une émulsion (ajout d'extrait de tarbush)	- Enrobage réduit la perte en masse, les changements d'apparence, d'activité de l'eau et de fermeté	De Leon-Zapata, 2015 [49]
Cire de carnauba (+ acide stéarique) Ratio testé : 0.1 - 0.4 % (m/m)	Amidon de manioc	Enrobage de tranches de pomme avec préparation d'une émulsion	- Meilleure formulation : 3% amidon de manioc + 1,5% glycérol + 0,2% de cire de carnauba + 0,8% acide stéarique => matrice cohésive, meilleures propriétés mécaniques, barrière à l'humidité et échange de gaz - Formulation à haute teneur en cire (0,4% m/m) : plus rigide, surface non-homogène, haute perméabilité à l'oxygène et à la vapeur d'eau	Chiumarelli, 2014 [50]
Cire de carnauba et shellac	/	Enrobage de pomme fuji avec préparation d'une émulsion	- Avec enrobage : consistance conservée dans le temps, moins de perte de masse - Avec ajout de citronnelle : baisse de la flore totale aérobie	Jo, 2014 [51]
Cire de carnauba (0-15%)	Gomme de pommier-cajou (70-85%) et amidon de manioc (15-30%)	Solution casting	- WVP et solubilité diminuent : bonne résistance à l'humidité - Effet plastifiant de la cire : diminution de la température de transition vitreuse - TS diminue - EB augmente - Opacité augmente - Apparition de discontinuités de surface	Rodrigues, 2014 [52]
Cire d'abeille Cire de carnauba Cire de candelilla (± tween 80) 5-10%	Amidon à haute teneur en amylose	Solution casting	- WVP diminue (mais ajout de tween 80 augmente WVP) - Hydrophobicité la plus importante pour la cire de carnauba dû à une rugosité plus importante du film - Ajout de cire et tween 80 augmente l'angle de contact et donc l'hydrophobicité	Muscat, 2013 [53]

Cires	Matrice support	Procédé - Incorporation	Propriétés	Références
Cire d'abeille, cire de carnauba, cire de candelilla 5% m/m zéine	Zéine	Solution casting	- Production d'un matériau composite flexible - Taux de relargage du lysozyme 2,5 à 17 fois plus faible - Taux de relargage d'autant plus faible que le point de fusion des cires est haut et que le matériau devient tortueux avec les agrégats de particules de cires	Arcan, 2013 [54]
Cire de jojoba liquide	Chitosane	Solution casting	- Amélioration de l'activité antimicrobienne du chitosane avec l'ajout de cire (valeurs de CMI diminuent)	Guirguis, 2013 [55]
Cire de carnauba : acide stéarique Ratio testé : 0:0 - 0,4:0,6 % (m/m)	Amidon de manioc	Enrobage de tranches de pomme avec préparation d'une émulsion	- Stabilité de l'émulsion et résistance à la vapeur d'eau fortement affectés par la concentration en cire - Propriétés mécaniques et solubilité fortement affectés par la cire et le glycérol	Chiumarelli, 2012 [56]
Cire de riz Ratio cire : pullulane = 0:1 / 1:5 / 1:2 / 1:1	Pullulane + Gomme arabique	Solution casting	- WVP diminue quand le ratio de cire augmente - Films avec ratio 1:1 réalisable	Shih, 2011 [57]
Cire de carnauba 5% m/m zéine	Zéine	Solution casting	- Matériau composite zéine-cire avec profile de relargage différent du film zéine seule dans l'eau mais profile de relargage similaire sur milieu d'agar - Film zéine-cire moins flexible mais TS et MY similaires	Alkan, 2011 [58]
Cire d'abeille Cire : matrice = 3:1	Gélatine et carraghénane	Enrobage saucisses séchées	- Réduction de la perte de masse	Tyburcy, 2010 [59]
Cire d'abeille	Hydroxypropyl méthylcellulose	Solution casting Emballage mandarines	- Réduction de la perte de masse et de fermeté	Navarro-Tarazaga, 2008 [60]
Cire d'abeille 40% (m/m pectine)	Pectine	Enrobage d'avocat par une émulsion	- Protection de l'enrobage contre les altérations physico-chimiques et microbiennes	Maftoonazad, 2007 [61]
Cire d'abeille 0-40% m/m amidon	Amidon de pois	Solution casting	- TS et e diminuent - MY augmente - WVP diminue - OP augmente - Cire incorporée à plus de 30% implique des changements dans les propriétés physiques et thermiques	Han, 2006 [62]
Cire d'abeille ou cire de carnauba (+ acide stéarique) 40% m/m	Protéine de lactosérum ou hydroxypropyl méthylcellulose	Enrobage de tranches de pomme avec préparation d'une émulsion	- Cire d'abeille plus efficace contre le brunissement enzymatique que la cire de carnauba	Perez-Gago, 2005 [63]
Cire d'abeille Cire de carnauba Cire : matrice = 1:1	Isolat de protéines de lactosérum	Solution casting	- La cire d'abeille a un effet plastifiant alors que la cire de carnauba a un effet anti-plastifiant - WVP diminue	Talens, 2005 [64]
Cire de candelilla : huile minérale ou acide oléique ou cire d'abeille Ration : 67:33	Gomme de mesquite (caroube américain)	Enrobage de citron vert Persan avec préparation d'une émulsion	- Meilleure formulation avec l'huile minérale et la cire : meilleure conservation de la couleur, moins de perte de masse et WVP diminue	Bosquez-Molina, 2003 [65]
Cire de carnauba	Caséine	Solution casting	- Allongement plus faible (que mélange caséine - amidon)	Jagannath, 2003 [66]

Cires	Matrice support	Procédé - Incorporation	Propriétés	Références
Cire de carnauba et candelilla 0 - 30% m/m caséine	Caséine acide (acide lactique)	Solution casting	- Séparation de phase partielle entre caséine et cire - WVP diminue (mais faiblement), WVP candelilla < WVP carnauba - Perméabilité à l'oxygène similaire - Films thermoscellables	Chick, 2002 [67]
Cire de candelilla 0.8% m/v	Protéine de lactosérum	Solution casting	- solubilité et teneur en humidité diminuent	Kim, 2001 [68]
Cire d'abeille Cire de candelilla Cire de carnauba (+ matières grasses du lait) 0 - 90% du poids de film sec	Protéines de lactosérum	Solution casting	- WVP de la cire d'abeille et matières grasses du lait plus faible que les autres formulation - WVP diminue de manière non linéaire avec ajout de cires - TS et MY diminuent avec ajout de cires - EB similaire avec ajout de cires	Shellhammer, 1997 [42]
Cire d'abeille Cire : matrice = 1:1	Caséinate de calcium ou de sodium	Enrobage de carottes	- Résistance à la vapeur d'eau améliorée - Réduction du blanchiment et du taux de respiration	Avena-Bustillos, 1994 [69]
Cire d'abeille	Gluten de blé	Solution casting	- Améliore la barrière à l'humidité - Film opaque, faible et se désintégrant dans l'eau facilement	Gontard, 1994 [70]
Cire d'abeille Cire de candelilla Cire de carnauba Cire microcristalline	Méthylcellulose	Solution casting sur film de méthylcellulose	- Perméabilité à l'oxygène de la cire de candelilla et de carnauba 2 fois plus faible que HDPE mais 10 fois plus élevée que PET - Perméabilité à l'oxygène de la cire d'abeille et de la cire microcristalline 6-9 fois plus importante que cire de candelilla et carnauba - WVP : Cire de candelilla < cire de carnauba < cire microcristalline < cire d'abeille - WVP HDPE < WVP cire de candelilla < WVP PP	Donhowe, 1994 [71]
Cire de grain de Sorgho : Triglycéride à chaîne moyenne Cire de Carnauba : Triglycéride à chaîne moyenne Ratio testés : 1:25,3 / 1:11,5 / 1:7,4	Film de zéine	Bicouche par casting	- WVP diminue - TS similaire - EB augmente - moins jaunâtre (+b) - plus opaque (L)	Weller, 1998 [72]
Cire d'abeille	Chitosane	Composite : Cire d'abeille : chitosan = 12.5 : 1 Multicouches : Cire d'abeille - chitosane - cire d'abeille Par méthode de solution casting Protection de fraises fraîches	- Composite : film transparent - Matériau 3 couches : blanchâtre et mat - Ajout de cire d'abeille : effet bénéfique sur les infections fongiques, la perte de masse et le taux de respiration, la conservation de la texture et de la couleur ainsi que la conservation de l'acidité, du pH, des solides solubles et des sucres.	Velickova, 2013 [73]
Cire de candelilla 0 - 7.5%	Isolat de protéines de lactosérum	Extrusion / compression / casting	- Influence du procédé sur le matériau avec cire (morphologie et propriétés) - L'extrusion semble allonger les particules de cire - Modification des propriétés barrières et mécaniques	Janjarasskul, 2014 [74]
NOTES :	EB = allongement à la rupture	TS (Tensile Strength) = Contrainte maximale	WVP (Water Vapor Permeability) = Perméabilité à la vapeur d'eau	MY = Module de Young = Module d'élasticité

## I.2.6 Propriétés des biomatériaux

Les principaux biopolymères sont les protéines, les polysaccharides, les lipides et les résines sont utilisés seuls ou en combinaison. Les caractéristiques physico-chimiques de ces biopolymères vont grandement influencer les propriétés des films et enrobages qui en résulteront [75]. Cependant, la comparaison des propriétés des biopolymères reste délicate car les procédés mis en œuvre dans les travaux sont souvent différents et impliquent de nombreuses variables comme les variables d'extrusion, les plastifiants, les additifs... De plus, les méthodes analytiques sont également différentes (vitesse de traction, conditionnement des spécimens test en humidité...) et jouent également un rôle sur les résultats. Par conséquent, seul un tableau proposant des résultats obtenus pour des biopolymères fabriqués par extrusion est proposé ici (Tableau I-3 adapté de Gomez-Estaca [76]) afin de correspondre à la technique développée dans ce projet, c'est-à-dire en extrusion, permettant une industrialisation du matériau plus aisée. Les différentes techniques de production de films seront détaillées par la suite plus en détails (dans la partie I.3.3).

### I.2.6.1 Propriétés thermiques

Les polymères peuvent se différencier par leurs propriétés thermiques. A faible température (et faible humidité dans le cas des polymères hydrophiles), les polymères se retrouvent sous forme principalement cristalline et le mouvement des chaînes est ralenti. Généralement, les biopolymères sont résistants mais fragiles avec une région élastique assez courte mais, lorsque la température augmente (au-dessus de la température de transition vitreuse,  $T_g$ ), une rotation autour des liaisons C-C est possible. Cette température de transition vitreuse est caractéristique de chaque polymère et des conditions qui l'entourent (comme l'humidité par exemple). Très peu de matériaux sont constitués uniquement de composés polymériques. Généralement, de nombreux additifs tels que des plastifiants, des charges, des lubrifiants, des pigments ou des stabilisants permettent d'apporter des propriétés plus intéressantes et plus stables dans le temps au matériau en fonction de l'application recherchée. C'est cette combinaison de polymères et d'additifs que l'on nomme « plastique ».

Les polymères peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur réponse thermique. Les polymères thermoplastiques qui représentent environ 90% des polymères produits deviennent mous et fluides quand ils sont chauffés et se figent en refroidissant car les chaînes de polymères sont liées entre elles par des liaisons faibles. Quant aux thermodurcissables, ils sont fortement réticulés (liaisons covalentes) et sont généralement



formés par polymérisation par condensation et ne peuvent pas subir plusieurs fois le même cycle de production, ils ne sont pas recyclables.

### *1.2.6.2 Propriétés mécaniques*

Dans le cadre des matériaux pour l'emballage alimentaire, une de leur fonction principale est de protéger l'aliment de tout dégât physique qui pourrait être causé par un impact physique, la pression, les vibrations ou tout autre impact. Une analyse des propriétés mécaniques permet de classer les différents matériaux selon leur réponse à différents stimuli. Ainsi, des tests mécaniques permettent de déterminer la résistance à la traction, l'allongement à la rupture, le module d'élasticité, la résistance à la compression, la résistance à la perforation, à l'abrasion, la force d'adhésion et bien d'autres caractéristiques.

Les propriétés des biopolymères vont être grandement impactées par les conditions de formulation, notamment le taux de plastifiant et autres additifs et également les conditions expérimentales du test comme la température ou l'humidité. L'incorporation d'un fort taux de plastifiant va diminuer la résistance à la traction et augmenter l'allongement à la rupture [77], [78]. Il en est de même à fort taux d'humidité car les biopolymères étant souvent très sensibles à l'humidité, ils absorbent l'eau qui jouera au sein de la matrice un rôle de plastifiant [36], [77], [79]. La température est également une variable qui affecte les propriétés mécaniques du matériau. La résistance physique des biopolymères diminue de manière drastique quand la température augmente au-dessus de la température de transition vitreuse, de plus, l'augmentation du taux de plastifiant et l'augmentation de l'humidité vont faire diminuer cette température de transition vitreuse [25], [38], [78].

Les films à base de protéines sont cassants sans ajout de plastifiant et ne peuvent que très rarement trouver une application leur correspondant. L'ajout de plastifiant aide à briser les liaisons hydrogène pour que la structure se relâche et obtenir un film plus flexible. La manière dont les chaînes du polymère vont interagir va déterminer les propriétés mécaniques de celui-ci et les conditions expérimentales impactent fortement ces interactions.

Les films sont souvent caractérisés par des paramètres mécaniques comme la résistance à la traction (Tensile Strength : TS), l'allongement à la rupture (Elongation at break : EB) et le module de Young ou d'élasticité (Young's modulus : YM). La résistance à la traction est importante dans les emballages car elle détermine l'épaisseur nécessaire aux emballages. Ces paramètres vont notamment dépendre de la vitesse de traction utilisée dans les tests. Des variations assez importantes sont retrouvées dans la littérature comme le montre l'exemple des films de caséinate de sodium qui ont été testés par 3 équipes avec une même vitesse de traction et qui donne les résultats suivants : TS = 36,9 MPa, EB = 18 % ; TS = 2,98 MPa, EB = 29,9 % ; TS = 3,8 MPa, EB = 204,05 %, respectivement pour Chen et al., Banerjee et Chen et Li et Chen [80]–[82]. La comparaison des propriétés mécaniques des biopolymères reste assez délicate car les paramètres déterminés dépendent fortement de l'orientation du matériau et donc de la méthode de production (extrusion, voie solvant compression) mais également, de la méthode utilisée pour la préparation des échantillons comme le conditionnement en humidité, la découpe des éprouvettes de test, la température et l'humidité lors du test et de chaque formulation de film en plus de la vitesse de traction précédemment évoquée. Le Tableau I-3 permet de répertorier différentes propriétés mécaniques de biomatériaux produits en extrusion.

### *1.2.6.3 Propriétés barrière*

La qualité des produits alimentaires est souvent détériorée par des phénomènes de transfert de masse comme l'adsorption d'humidité ou d'huile, le passage d'oxygène, les pertes d'arômes, l'adsorption d'odeurs indésirables ou la migration de composants de l'emballage dans l'aliment [31], [36], [43]. Ces phénomènes de transfert ont lieu entre l'aliment et l'environnement atmosphérique, entre l'aliment et l'emballage ou entre les différents ingrédients de l'aliment [31], [36], [83]. La pénétration de l'oxygène atmosphérique peut oxyder les aliments et donc les détériorer ; les solvants, encres et autres additifs peuvent migrer dans l'aliment ; l'eau peut être absorbée par le film et en changer ses propriétés ou bien l'eau peut être absorbée par l'aliment et en détériorer ses propriétés organoleptiques et sa qualité. Tous ces exemples montrent l'importance de déterminer les propriétés barrière du matériau afin de les contrôler ou du moins de l'associer à la protection d'un aliment adapté à ses propriétés pour en contrôler la qualité sensorielle et la sécurité microbiologique. Généralement, des tests de perméabilité à la vapeur d'eau, de sorption, de perméabilité à l'oxygène et autres gaz, de perméabilité aux arômes, de résistance aux huiles et de diffusion des additifs sont réalisés pour caractériser le matériau avant des essais plus poussés sur des matrices alimentaires. Le Tableau I-3 présente quelques-unes de ces propriétés pour différentes compositions de biopolymères.

Les matériaux peuvent être hydrophiles, hydrophobes ou bien les deux. La plupart des biopolymères sont de bonnes barrières à l'oxygène. Ils ont cependant une perméabilité à la vapeur d'eau beaucoup plus importante que les polymères classiques (sauf dans le cas de biopolymères à base de lipides). Comme pour les propriétés mécaniques, les propriétés barrières sont très impactées par la formulation (plastifiant notamment) et par les conditions environnementales (humidité et température). En effet, les plastifiants réduisant la température de transition vitreuse vont augmenter la perméabilité des films à certains migrants ; l'augmentation de l'humidité relative va augmenter la perméabilité des films à l'oxygène et l'augmentation de la température augmentera aussi la perméabilité des films aux différents migrants [25], [38], [84].

Tableau I-3 : Liste de biopolymères extrudés et leurs propriétés adapté de Gomez-Estaca, 2016 [76]

Protein	Processing	Plasticizer	Variables studied	Properties	Reference
Zein	Single or twin screw extrusion, hot pressing or blowing	70% oleic acid and 5% DMG-130	Type of extrusion processing	TS: 3.1–4.2 MPa EB: 46.9–120.4 % YM: 101.1–102.1 MPa	Wang, 2003 [85]
Sunflower protein isolate	Single screw extrusion	30–70% glycerol and 0–30% water	Glycerol and moisture content Extruder die temperature	TS: 0.6–6.7 MPa EB: 9.3–43 % YM: 14–95 MPa Swelling: 50.8–209 %	Rouilly, 2006 [86]
Whey protein isolate	Twin screw extrusion, slit die	Glycerol and water	Glycerol and moisture content	TS: 3.1–4.1 MPa EB: 121–132 % YM: 30.6–46.5 MPa	Hernandez-Izquierdo, 2008 [87]
Whey protein isolate	Twin screw extrusion	Glycerol (24%) and water (16%)	Addition of WPI in thermoplastic starch matrix	TS: 3.07–5.73 MPa EB: 2.83–32.76 % YM: 143.71–230.35 MPa WVP: 2.45–4.63 *10 <sup>-12</sup> g m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa	Azevedo, 2017 [88]
Whey protein isolate	Twin screw extrusion, slit die	Glycerol (50%) and water (15%)	Addition of candelilla wax on barrier and tensile properties	TS: ~2 MPa EB: 50–100 % YM: 20–30 MPa WVP: ~40 g mm m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> kPa OP: ~25 μm m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> kPa <sup>-1</sup>	Janjarasskul, 2014 [74]
Sodium caseinate	Twin screw extrusion, blowing	Glycerol (17–33%) and water (40–80% RH)	Glycerol and moisture content	TS: ~1–18 MPa EB: ~50–140 % YM: <10–400 MPa WVP: ~1–4.5 g mm/m <sup>2</sup> h kPa	Belyamani, 2014 [89]

Protein	Processing	Plasticizer	Variables studied	Properties	Reference
Sodium caseinate	Twin screw extrusion, blowing	Glycerol (15-25%) and water	Film processing condition and glycerol amount	WVP: $\sim 1-50 * 10^{-9} \text{ g m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ OP: $5-100 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$	Colak, 2015 [78]
Wheat gluten	Single screw extrusion, flat sheet die	30% glycerol	1-2% salicylic acid addition	TS: 1.8-3 MPa EB: 47.3-53.9 % YM: 27-36.7 MPa	Ullsten, 2006 [90]
Wheat gluten	Single screw extrusion, flat sheet die	30% glycerol	3-5% sodium hydroxide/salicylic acid addition Die temperature Ageing	TS: 1.4-2.4 MPa (day 1) EB: 79-143 MPa (day 1) YM: 10-95 MPa (day 1)	Ullsten, 2009 [91]
Wheat gluten	Single screw extrusion, flat sheet die	6% water and 30% glycerol	10-20% urea	TS: 3.6-2.2 MPa (10-20% urea) EB: 70-87 % (10-20 % urea) YM: 7-3 MPa (10-20 % urea) WVTR: 32-57 g mm/m <sup>2</sup> day OP: 0.16-0.32 cm <sup>3</sup> mm/m <sup>2</sup> day atm	Türe, 2011 [92]
Feather keratin	Single screw extrusion, slit die	Glycerol and water	Fibre size Sodium sulfite content Barrel (100 and 120°C) and die (120 and 140°C) temperatures Glycerol/water ratio	TS: $\sim 350-500 \text{ MPa}$ EB: $\sim 0.25-0.67 \%$ YM: $\sim 350 \text{ MPa}$	Barone, 2005 [93]
Soy protein isolate	Twin screw extrusion, pelletizing, single screw extrusion, flat sheet die	Glycerol, water and/or methyl glucoside	Type and content of plasticizer Cross-linking agents: zinc sulfate, epichlorohydrin, glutaric dialdehyde	TS: 7.1-40.6 MPa EB: 3-185 % YM: 17-1220 MPa Water absorption: 90-109 %	Zhang, 2001 [94]

Protein	Processing	Plasticizer	Variables studied	Properties	Reference
Pigskin gelatin	Single screw extrusion, thermo-pressing	Glycerol and/or sorbitol (20%)	Type of plasticizer	TS: 17.3–20.4 MPa EB: 161.3–215.9 % YM: 489.9–569.9 MPa	Park, 2008 [95]
Fish-skin gelatin	Twin screw extrusion, thermo-pressing	Glycerol (20–25%), water	Temperature (110 and 120°C), glycerol content	TS: 1.51–2.41 MPa EB: 256–293 % YM: 84–132 MPa	Krishna, 2012 [96]
Beef gelatin	Twin screw extrusion	Glycerol (0.2-1.1%), water	Effect of plasticizer content	TS: 1.75-3.49 MPa EB: 2.54-3.46 % WVP: ~40 g mm m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> kPa OP: 20-130 cm <sup>3</sup> μm/m <sup>2</sup> day kPa	Hanani,2013 [97]
Pigskin gelatin	Single screw extrusion	Glycerol (0.25-8.75%), water	Process preliminary study	TS: 19.5-33.9 MPa EB: 40.3-157.8 % WVP: 0.16 g mm m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> kPa	Andreucetti, 2012 [98]
Cassava starch / Gelatin	Single screw extrusion	Glycerol or sorbitol (30%)	Properties of copolymer films and plasticizer type	TS: 33,58-405.84 g/mm <sup>2</sup> EB: 304,22-2218.33 % WVTR: 0.04-0.96 g/m <sup>2</sup> /day OTR: 1.59-2.93 cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /day	Thumtharuk, 2017 [99]
Corn starch / Pectin	Single screw extrusion	Glycerol (30%)	Water susceptibility and reactive extrusion with citric acid	TS: 1-9 Mpa EB: 0-2 % YM: 0.1-0.4 MPa	Da Roz, 2016 [100]
Corn starch / Gelatin	Single screw extrusion	Water	Addition of cellulose	TS: 0.7-1.3 Mpa EB: 16-32 % YM: 90-100 MPa	Rodriguez-Castellanos, 2015 [101]

Protein	Processing	Plasticizer	Variables studied	Properties	Reference
Cassava starch / chitosan	Single screw extrusion	Glycerol (18-25%)	Addition of chitosan	TS: 1-6 Mpa EB: 0-60 % YM: 0-120 MPa	Pelissari, 2012 [102]
Potato flour / Starch	Twin-screw extruder	Glycerol + Triethyl citrate (25-35%)	Film characterization	TS: 0.8-2.5 Mpa EB: 4-11 % YM: 25-38 MPa	Zhang, 2012 [103]
Corn starch	Twin-screw extruder	Water	Effect of amylose content	TS: 12.68-23.82 Mpa EB: 2.28-4.95 % YM: 730.7-1217.2 MPa	Li, 2011 [82]
Tapioca starch	Single screw extruder	Glycerol (18%)	Evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect	TS: 1.2-3 Mpa EB: 40-120 % YM: 10-110 kPa WVP: $3.7-6.7 * 10^{10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}$	Flores, 2010 [104]
Starch / Pullulan	Twin-screw extruder	Glycerol (25-50%)	Effect of extrusion and glycerol content	TS: 1-15 Mpa EB: 25-110 % WVP: $2-2.5 * 10^{12} \text{ g cm cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$	Yan, 2012 [105]
Starch	Twin-screw extruder	Glycerol and water	Effect of extrusion	TS: 0.23-2.91 Mpa EB: 45.79-90.83 % YM: 2.89-37.94 MPa WVP: $12.3-19.9 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$	Pushpadass, 2009 [106]
Corn starch	Single screw extruder	Glycerol (0-31%) and water (0-31%)	Effect of extrusion	TS: 1.71-12.35 Mpa EB: 4.17-12.15 %	Das, 1998 [107]

TS: tensile strength; EB: elongation at break; YM: Young's modulus; WVTR: water vapour transmission rate; OP: oxygen permeability.

### I.2.7 Les matériaux comestibles et à usage alimentaire

Par définition, un enrobage ou un film comestible constitue une fine couche de matériau qui peut être consommée et apporte des propriétés supplémentaires à l'aliment. Ces propriétés peuvent être une barrière à l'oxygène ou autres gaz, aux microorganismes externes à l'aliment, à l'humidité ; peuvent permettre une protection physique, restreignent les échanges avec des composés volatiles et peuvent être supports d'ingrédients fonctionnels. Ce qui permet de différencier un film d'un enrobage est l'aptitude des films à se « tenir » seul contrairement à un enrobage (« coating ») qui doit être appliqué directement sur son support [108].

Les enrobages et films comestibles peuvent être à base de lipides (paraffine, cires), à base de polysaccharides (amidon, chitosan, algues) et à base de protéines (zéine, gluten, caséine) ou bien une combinaison de ces différentes sources. Les films constitués d'un polymère dit « filmogène » vont souvent pouvoir être formulés en combinaison avec d'autres additifs qui vont leur apporter les propriétés recherchées dans certaines applications (plastifiants, colorants, ...).

Il existe différents mécanismes de formation d'un film de biopolymère, cela inclut les forces intermoléculaires comme les liaisons covalentes (ponts disulfure ou réticulation), électrostatiques, hydrophobes ou ioniques. Afin de garder le caractère comestible recherché dans ces films et enrobages, il faut que le procédé de fabrication soit compatible avec la qualité alimentaire recherchée. Dans cette optique, des modifications du pH, l'ajout de sel, le chauffage, la modification enzymatique, le séchage, l'utilisation de solvants de qualité alimentaire ou la réaction chimique avec des agents chimiques de qualité alimentaire sont les mécanismes utilisés pour développer les propriétés filmogènes du polymère [108].



Intrinsèquement, de par sa nature comestible, un matériau comestible est également biodégradable [36]. Pour maintenir un caractère comestible, tous les composants (c'est-à-dire les biopolymères, les plastifiants et les autres additifs) doivent être de qualité alimentaire et les procédés, les équipements et le lieu de production doivent également être appropriés et dédiés à l'alimentaire [79]. Les films et enrobages comestibles doivent être plus stables d'un point de vue biochimique, physico-chimique et microbiologique que la denrée qu'ils renferment pour avoir une réelle fonction de protection. Dans le schéma suivant, on peut retrouver les fonctions principales de protection d'un enrobage ou d'emballage face aux différents transferts qui ont lieu entre l'aliment, l'environnement et l'emballage.

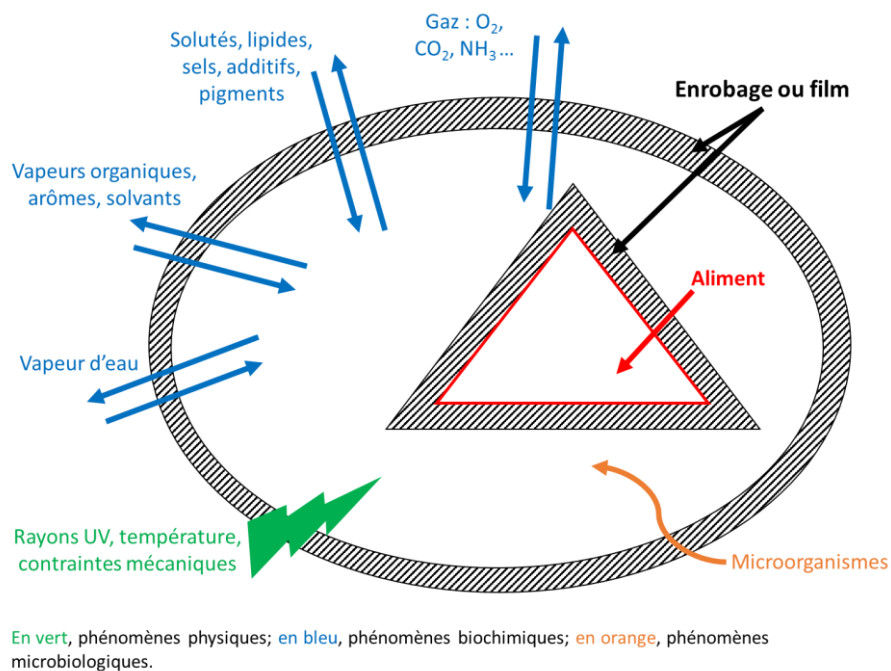


Figure I-14 : Représentation schématique des fonctions de protection et de transfert entre un aliment et l'enrobage ou film qui l'entoure d'après Debeaufort et al., 1998 [109]

Grâce aux différentes fonctions de protection notamment ajoutées aux films comestibles, la structure traditionnellement rencontrée en emballage de produit alimentaire peut être complètement repensée [21], [31]. On note notamment l'exemple de produits qui sont emballés dans un film plastique puis dans un emballage en carton, dont l'emballage primaire en plastique pourrait être remplacé par un film actif protégeant le produit et augmentant sa durée de vie en rayon. Les films et enrobages comestibles vont permettre une manipulation facilitée de certains produits fragiles grâce à cette enveloppe protectrice supplémentaire. Le développement de stratégie uni-dose en alimentaire ou en pharmaceutique connaît également un grand essor grâce aux films comestibles.

Les films comestibles ont été développés depuis le 15<sup>e</sup> siècle ; en Asie, la peau du lait de soja chauffé (correspondant aux protéines et lipides principalement) dit « yuba » était utilisée [110]. Les cires sont également utilisées depuis plusieurs siècles, depuis le 12<sup>e</sup> siècle plus exactement, pour protéger les agrumes mais, la commercialisation de fruits recouverts de cires tels que les pommes ou les poires est beaucoup plus récente (années 1930) [31]. De nos jours, les films et enrobages comestibles sont de plus en plus utilisés sur des produits tels que les fruits, les légumes, les confiseries, le chocolat, et les noix [21], [111]. Des films à base de collagène sont utilisés pour former des boyaux pour les saucisses [112], [113]. De nombreux autres films à base d'amidon, de cellulose, d'hydroxypropylméthylcellulose ont entre autres été étudiés mais, peu sont commercialisés pour le moment contrairement aux enrobages comestibles qui sont très présents sur les fruits et légumes, les confiseries et les noix. Ces enrobages sont généralement à base de cires, de gomme-laque, de zéine ou de sucres [21]. Le maintien et l'amélioration de la qualité des produits sont recherchés pour de nombreux produits en retardant la déshydratation en surface, l'absorption d'humidité, l'oxydation des ingrédients, la perte d'arômes et la détérioration microbiologique. Il s'agit donc d'une protection physico-chimique mais, également d'une amélioration sensorielle importante de l'aspect visuel, la couleur, l'aspect de surface... [21].

Une bonne propriété barrière aux gaz permet de retarder le taux de respiration des produits frais ; comme c'est le cas de nombreux fruits et légumes, un enrobage comestible ralentit la respiration, l'oxydation et donc l'activité des polyphénol-oxydases qui sont en cause du brunissement enzymatique [28], [114]–[116]. Les fruits et légumes sont également protégés de la déshydratation grâce à des enrobages. La perte d'eau étant l'un des facteurs principaux de détérioration des produits frais [38]. Une bonne propriété barrière à l'eau permet quant à elle de mélanger des produits à forte teneur en eau avec des ingrédients déshydratés (comme par exemple dans un mélange de céréales et de fruits ou bien entre une pâte et sa garniture) [43], [117], [118]. La propriété barrière à l'huile est mise en avant dans les produits frits (frites, poissons) afin qu'ils résistent aux huiles de friture pour en contenir moins dans le produit final [119], [120]. Un mélange d'hydrocolloïdes (protéines et polysaccharides) permet également de créer une barrière aux composés apolaires et dont de prévenir les transferts d'arômes ou de matières grasses [121].

L'hydrosolubilité ou la liposolubilité du matériau a une grande importance en fonction de l'application visée. En effet, dans certains cas, une forte hydrosolubilité peut être recherchée pour une application uni-dose à dissoudre dans de l'eau comme dans le cas du café soluble ou de soupes déshydratées par exemple. Un matériau soluble dans les matières grasses permet aux consommateurs de cuire leurs aliments dans l'emballage par exemple.

Le

Tableau I-4 suivant adapté de Han, 2005 [108] permet d'avoir un aperçu des différentes associations possibles pour l'élaboration de films et enrobages comestibles :

Tableau I-4 : Liste non exhaustive d'ingrédients et additifs à la base de formulation de films ou enrobages comestibles [108]

<b>Ingrédients et additifs utilisés dans l'élaboration de films et enrobages comestibles</b>	
<b>Fonction dans la formulation</b>	<b><i>Matériaux</i></b>
<b>Polymères filmogènes</b>	<p><u>Protéines</u> : collagène, gélatine, caséine, protéine du lactosérum, zéine, gluten, protéine de soja, protéine du blanc d'œuf, protéine myofibrillaire du poisson, protéine de sorghum, protéine de pois, protéine du son de riz, protéine de la graine de coton, protéine d'arachide, kératine</p> <p><u>Polysaccharides</u> : amidon, amidon modifié, cellulose modifiée, alginate, carraghénane, pectine, pullulane, chitosane, gomme gellane, gomme xanthane</p> <p><u>Lipides</u> : cires (abeille, paraffine, carnauba, candelilla, son de riz), résines (shellac, terpène), acetoglycérides</p>
<b>Plastifiants</b>	Glycérol, propylène glycol, sorbitol, sucrose, polyéthylène glycol, sirop de maïs, eau
<b>Additifs fonctionnels</b>	Antioxydants, antimicrobiens, nutriments, nutraceutiques, pharmaceutiques, arômes, colorants
<b>Autres additifs (auxiliaires technologiques)</b>	<p>Emulsifiants et agents texturants (lécithine, Tween, Span) : pour stabiliser les émulsions</p> <p>Acides et bases : pour solubiliser les protéines</p> <p>Agents réticulant (aldéhydes) : pour réticuler les réseaux protéiques</p> <p>Enzymes : solubilisation de polymères par hydrolyse ou création de liaisons intra- et intermoléculaires (transglutaminase)</p> <p>Sels ou chélateurs d'ion : inducteurs de gélification ou non, de coacervation (sels de calcium en présence d'alginate ou polyphosphate en présence de caséine présure)</p>

### I.2.8 Les matériaux actifs et fonctionnalisés

Les films et enrobages comestibles ont pour objectif d'améliorer ou maintenir la qualité des produits alimentaires en les protégeant des détériorations physiques, chimiques et biologiques. Ces fonctions de protection sont recherchées pour améliorer la qualité des produits alimentaires, augmenter leur durée de vie, améliorer la sécurité et la qualité [122]–[128] et par la même occasion remplacer le « suremballage » qui concerne certains produits [21]. L'application d'un film permet de renforcer les propriétés physiques d'un aliment et d'améliorer son attrait visuel ou tactile [129] simplement grâce aux propriétés inhérentes du biopolymère filmogène. Pour apporter des propriétés plus spécifiques et bien plus actives, telles qu'une protection contre les transferts d'humidité, les modifications chimiques induites par la lumière, contre l'oxydation ou la croissance de microorganismes, les matériaux doivent être réfléchis bien en aval et incorporer des ingrédients ou additifs qui les rendront actifs, fonctionnalisés. Ces matériaux sont fonctionnalisés comme barrière aux gaz, aux huiles, aux vapeurs et sont le support de molécules actives comme des antioxydants, des antimicrobiens, des colorants ou des arômes [21], [130].

Afin de sélectionner un film ou enrobage approprié, il faut déterminer le type d'application pour ce matériau afin d'en cibler les attributs et les contraintes. En effet, dans le cas de produits secs, il faudra un matériau avec une bonne barrière à l'humidité et dans le cas de produits à forte humidité, il faudra utiliser un matériau insoluble. Le cycle de vie des produits alimentaires doit prendre en compte différents paramètres comme les températures et lieux de stockage, les procédés de transformation, l'exposition à la lumière, aux chocs et autres altérations du produit pour bien répondre à la demande industrielle d'une meilleure qualité et d'un prolongement de la durée de vie. Le Tableau I-5 donne des exemples d'applications pour des fonctionnalités qui peuvent être celles de films et enrobages comestibles [131].

Tableau I-5 : Propriétés fonctionnelles nécessaires aux films comestibles en fonction de l'application visée [131]

Propriétés fonctionnelles	Qualités requises	Applications
<b>Fournir une protection contre l'humidité et/ou l'oxygène</b>	Bonne aptitude à l'enrobage Faibles perméabilités à l'oxygène et/ou à l'eau	Aliments frais (poisson, fromage, viande, fruits), à humidité intermédiaire, secs (noix, snacks, fruit secs) ou congelés
<b>Limiter la dessiccation superficielle</b>	Film humide (se déshydrate avant l'aliment)	Aliments frais ou congelés
<b>Retarder la détérioration microbienne de surface</b>	Incorporation d'un agent antimicrobien	Aliments humides ou à humidité intermédiaire
<b>Maintenir les différences d'<math>a_w</math>, contrôler les transferts (solutés pigments, arômes) dans un aliment hétérogène</b>	Bonnes propriétés barrières à l'eau, aux solutés et/ou aux matières grasses	Aliments hétérogènes (pâtisseries, biscuits, pizzas, confiseries), mélanges de produits secs pour apéritif, petit déjeuner, potages, aliments surgelés hétérogènes
<b>Empêcher l'absorption de solutés ou d'huile par l'aliment</b>	Bonnes propriétés barrières aux solutés, aux huiles	Aliments congelés saumurés (crevettes, crabes), déshydratés par osmose ou frits
<b>Améliorer les propriétés mécaniques et renforcer la structure de l'aliment</b>	Bonne adhésion et cohésion	Cacahouètes, crevettes, produits texturés, pâtisseries, aliments secs, lyophilisés, aliments en croûte et décorés
<b>Protéger individuellement des petits morceaux d'aliments</b>	Surface non collante Bonnes propriétés barrières et mécaniques	Cubes de fromage, fruits secs et à humidité intermédiaire, cubes de glace
<b>Empêcher l'agglomération de petites pièces</b>	Surface sèche et non collante	Cubes de fromages, fruits secs, produits frits, produits congelés
<b>Améliorer l'aspect de surface</b>	Lisse, brillant, homogène	Produits de boulangerie, de confiserie, fruits frais et secs, snacks
<b>Modifier la couleur, l'arôme ou le goût de l'aliment</b>	Support colorants, arômes Bonnes propriétés barrières	Applications multiples
<b>« Piéger » les arômes durant la fabrication et l'entreposage</b>	Bonnes propriétés barrières	Fruits à humidité intermédiaire, aliments secs
<b>Portions prés dosés d'ingrédients destinés à être dispersés dans des produits alimentaires</b>	Aptitude à former une « capsule » soluble ou dispersible à chaud ou à froid	Additifs à finalité nutritionnelle, additifs alimentaires, concentrés de levure ou d'enzymes, arômes, épices, sauces Potages déshydratés, boissons instantanées, édulcorants, assaisonnements, préparations aromatiques

### *I.2.8.1 Différents types d'altérations à ralentir*

Des changements physico-chimiques ou microbiologiques sont à l'origine de la détérioration des denrées alimentaires comme le brunissement enzymatique, l'hydrolyse et l'oxydation des lipides, la dénaturation, l'hydrolyse et la réticulation des protéines, l'hydrolyse et la synthèse de polysaccharides, ou la dégradation des pigments par exemple [132]. En plus de ces phénomènes inhérents aux aliments, des facteurs enzymatiques, physiques, chimiques et microbiologiques vont intervenir et faire de la matrice alimentaire un système complexe à étudier. Chaque matériau doit donc être optimisé pour protéger la denrée alimentaire de manière efficace.

Le matériau sélectionné peut agir de deux manières pour ralentir les altérations, soit il agit préventivement car il apporte une protection contre des facteurs d'altération tels la lumière, l'oxygène ou bien il agit après l'impact d'altération avec des agents actifs lors du stockage du produit alimentaire comme par l'action de molécules antioxydantes ou antimicrobiennes par exemples. Les propriétés barrières du matériau sont mises à profit spécifiquement pour chaque application [133].

Le Tableau I-6 résume des conditions typiques de stockage de différentes denrées alimentaires et les facteurs déterminants pour leur durée de vie. Ce tableau liste également les propriétés barrières optimales [111].

Tableau I-6 : Conditions de stockage de différentes denrées alimentaires et facteurs déterminants pour leur durée de vie [111]

Food	Typical time/temp.	Quality factors determining shelf-life						Required gas composition			Optimal required barrier properties		
		Microbiology	Colour	Oxidation	Structure	Flavour	Others	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Light	Other	
<b>Animal derived products</b>													
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	High	(High)	High	-
Cured fish products	5°C 4w	X	X	X	-	-	-	High 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)	-
<b>Fruits and vegetables</b>													
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
<b>Dry products</b>													
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, grease
<b>Beverages</b>													
Water	Room temp. 1 yr	X	-	-	-	X	Migration, absorption	-	-	-	High	-	Aroma
Juice	5°C-room temp. 5d-1 yr	X	X	X	-	X (Scalping)	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	-
<b>Frozen foods</b>													
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)	-
<b>Others</b>													
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	-	-

#### I.2.8.1.1 Les antioxydants

Des antioxydants naturels ont pu être incorporés avec succès dans des films et enrobages comestibles permettant ainsi de retarder l'auto-oxydation des produits alimentaires à haute teneur lipidique [108], [134]–[138].

La viande fraîche demande un haut taux d'oxygène à sa surface pour assurer la couleur rouge de l'oxymyoglobine pour rester attrayante pour le consommateur. Il faut donc un emballage perméable à l'O<sub>2</sub> ou une atmosphère avec de l'oxygène pour conserver cette couleur rouge. Différentes atmosphères modifiées ont été testées mais, en trop fortes doses par exemple de CO<sub>2</sub> (>25%) qui permet de préserver la viande plus longtemps, une décoloration et un arrière-goût apparaissent [139]. Concernant les emballages perméables à l'oxygène, le problème est le développement et la croissance microbienne qui se fera rapidement en présence d'oxygène. Différents auteurs ont ainsi testés des films antioxydants, antimicrobiens pour préserver la qualité de différentes viandes, la couleur ou les deux et ainsi apporter deux fonctions au film [140].

La détérioration des fruits de mer et poissons est due à l'autolyse par des enzymes intrinsèques, à l'activité métabolique des microorganismes et à l'oxydation. Une des solutions envisagées pour garantir une qualité à plus long terme est de diminuer le taux d'oxygène et donc de développer des matériaux avec une bonne barrière à l'O<sub>2</sub> [141]. Pour le moment, les auteurs se concentrent plutôt sur des ajouts de molécules antimicrobiennes et antioxydantes comme les huiles essentielles [142] associées à des films comestibles à base de gomme par exemple qui vont diminuer les pertes de masse du produit, les changements de pH, la détérioration de la texture et de la couleur, l'oxydation des lipides et le développement microbien.

#### I.2.8.1.2 Protection physique

Un exemple de protection physique apparaît nécessaire pour les œufs qui sont fragiles et nécessitent un matériau permettant d'absorber les chocs mais la condensation sur la coquille et la pénétration de microorganismes doivent être évitées. Un enrobage à base de chitosane qui empêche la perte de dioxyde de carbone et de l'humidité semble améliorer la durée de vie des œufs [143], [144].



#### I.2.8.1.3 Hydrophobicité

Concernant les aliments secs, il est nécessaire d'utiliser un matériau avec une bonne barrière à l'humidité pour prolonger la qualité et la durée de vie de ce type de produit [117], [119].

Dans une étude d'Avena-Bustillos et al., l'enrobage de carottes épluchées par une émulsion de caséinate de calcium ou de sodium et de lipides a permis d'améliorer la résistance à la vapeur d'eau, le blanchiment et le taux de respiration de celles-ci [69]. La formulation à base de caséinate de calcium et de cire d'abeille qu'ils ont testé donne les meilleurs résultats concernant la résistance à la vapeur d'eau mais, cette formulation apporte une apparence blanchâtre sur les carottes. Cette étude montre qu'il faut faire le choix de l'application visée avant de chercher à améliorer certaines propriétés du matériau. Dans cette étude, le meilleur enrobage sera un compromis entre une bonne résistance à la vapeur d'eau et une apparence translucide ; par contre dans le cadre de l'élaboration d'un film ayant les mêmes propriétés, il peut être envisagé de choisir l'émulsion contenant de la cire d'abeille car l'apparence d'un emballage a moins d'importance.

#### I.2.8.1.4 Les films et enrobages antimicrobiens

La plupart des exemples cités précédemment montrent que ce n'est pratiquement jamais une seule propriété qui est modifiée pour améliorer un produit mais une combinaison de propriétés à optimiser. La qualité microbiologique des denrées alimentaires est d'ailleurs dépendante de certaines de ces propriétés (barrière à l'eau, barrière physique, hydrophobicité). Tout en cherchant à élaborer des films antimicrobiens, il faut également optimiser les propriétés précédemment énoncées pour améliorer la durée de vie et la qualité des denrées. Afin d'évaluer les propriétés antimicrobiennes d'une substance, on fait souvent référence à la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est, par définition, la plus petite concentration d'antimicrobien suffisante pour inhiber *in vitro* la croissance d'un microorganisme.

Une large gamme de bactéries et moisissures (champignons et levures) est représentée dans l'alimentaire. Chaque type d'aliment est associé à un groupe d'organismes spécifiques (microbiote). Le développement au cours du temps de ce microbiote est déterminé par différents facteurs comme sa charge initiale, le pH du produit, l'activité de l'eau, le potentiel redox, les nutriments (minéraux, sucres et vitamines), les composés antimicrobiens, la structure physique du produit, la température de stockage et l'humidité relative. Un matériau actif, antimicrobien est la solution actuellement la plus étudiée afin de limiter le développement des microorganismes dans les denrées alimentaires. Ces

matériaux doivent correspondre à l'application ciblée car ils seront influencés par l'activité de l'eau, les conditions de stockage (sur leur propriété mécaniques), l'humidité relative, la migration des différents composés antimicrobiens et les gaz qui pourront être ajoutés comme atmosphère modifiée.

Il y a deux modes d'action pour les films antimicrobiens :

- **Par migration ou relargage** : l'inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes se fait par migration des agents antimicrobiens de l'emballage vers l'aliment. Pour les composés volatiles, ils migrent d'abord vers l'espace de tête puis condensent sur la surface de la denrée. Pour les composés non volatils, le contact entre l'emballage et la denrée va jouer un rôle important dans la migration de celui-ci.
- **Par immobilisation** : ce mécanisme est notamment utilisé dans le cas de composés antimicrobiens de grade non alimentaire. Dans ce cas, l'inhibition microbienne se fait sans migration de composés.

Dans ces deux modes d'action, pour obtenir une inhibition des microorganismes ciblés, il faudra que la concentration en molécules antimicrobiennes soit suffisante à la surface de l'aliment. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est, par définition, la plus petite concentration d'antimicrobien suffisante pour inhiber *in vitro* la croissance d'un microorganisme.

Les films comestibles ont été démontrés bons vecteurs de molécules actives antimicrobiennes [124], [127], [145], [146]. L'efficacité de la molécule active incorporée dépend du biopolymère support de cette molécule (sa structure et ses caractéristiques), de l'agent antimicrobien, des caractéristiques physico-chimiques du produit qui doit être protégé et des différentes interactions entre ces structures.

Les molécules antimicrobiennes les plus étudiées et utilisées dans des films et enrobages comestibles sont les huiles essentielles, les acides organiques et les bactériocines.

D'un point de vue réglementaire, seul certains agents antimicrobiens sont autorisés à être utilisés dans des emballages actifs selon le Règlement CE N°450/2009 relatif aux matériaux et objets actifs et intelligents destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires [147]. Les additifs autorisés font partis des additifs alimentaires autorisés dans le Règlement CE N°1333/2008 ou dans le Règlement CE N°1332/2008 relatif aux enzymes [148], [149].

Le Tableau I-7 présente une liste non exhaustive des additifs qui peuvent être incorporés selon la réglementation en vigueur dans les pays [150] :

Tableau I-7 : Liste des additifs alimentaires qui peuvent être utilisés dans des emballages antimicrobiens [150]

Additive	Code Assigned by Legislative Authority		
	Australia/New Zealand <sup>1</sup>	Europe <sup>2</sup>	U.S.A. <sup>3</sup>
Acetic acid	260	E260	GRAS
Benzoic acid	210	E210	GRAS
Butylated hydroxyanisole (BHA)	320	E320	GRAS
Butylated hydroxytoluene (BHT)	321	E321	GRAS
Carvarcol			FA
Citral			GRAS
Citric acid	330	E330	GRAS
p-Cresol			FA
EDTA			FA
Estragole (methyl chavicol)			GRAS
Ethanol		E1510	GRAS
Ethyl paraben		E214	GRAS
Eugenol			GRAS
Geraniol			GRAS
Glucose oxidase	1102		GRAS
Hexamethylenetetramine (HMT)		E239	
Konjac glucomannan		E425	GRAS
Lactic acid	270	E270	GRAS
Lauric acid			FA
Linalool			GRAS
Lysozyme	1105	E1105	GRAS
Malic acid	296	E296	GRAS
Methyl paraben	218	E218	
Natamycin	235	E235	FA
Nisin	234	E234	GRAS
Phosphoric acid	338	E338	GRAS
Polyphosphate		E452	GRAS
Potassium sorbate	202	E202	GRAS
Propionic acid	280	E280	GRAS
Propyl paraben	216	E216	GRAS
Sodium benzoate	211	E211	GRAS
Sorbic acid	200	E200	GRAS
Succinic acid		E363	GRAS
Sulfur dioxide	220	E220	GRAS
Tartaric acid	334	E334	GRAS
Tertiary butylhydroquinone (TBHQ)	319		FA
α-Terpineol			FA
Thymol			FA

Source: CFR (1988); Davidson and Branen (1993); Maga and Tu (1995); Lück and Jager (1997); Saltmarsh (2000); Taubert (2000).

<sup>1</sup>Assignment of a number signifies that additive is approved by the Australian and New Zealand Food Authority (ANZFA) and The Australian New Zealand Food Standards Council (ANZFSC) as being safe for food use.

<sup>2</sup>Assignment of an "E" number signifies that additive has been approved by the European Communities (EC) Scientific Committee on Food (SCF).

<sup>3</sup>Classification in accordance with Food and Drug Administration (FDA) Title 21 of the Code of Federal Regulations (21 CFR) wherein substances intended for use in the manufacture of foodstuffs for human consumption are classified into 3 categories: food additives (FA), prior-sanctioned food ingredients and substances generally recognised as safe (GRAS).

#### I.2.8.1.5 Les huiles essentielles

La composition spécifique (différents composés des huiles essentielles), la structure et les groupements fonctionnels des huiles essentielles jouent un rôle clef dans leur degré de réactivité. Les composés phénoliques, les terpènes, les alcools aliphatiques, les acides et les isoflavonoïdes sont les composés majeurs des huiles essentielles ayant un pouvoir antimicrobien [151]–[153]. Les huiles essentielles d'origan, de thym, de basilic, de trèfle, d'arbre à thé, de romarin, de laurier et de coriandre ont un large spectre d'activité antimicrobienne contre différentes souches comme *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas fragi* [151], [154], [155]. Les huiles essentielles de thym et d'origan sont les plus utilisées car elles ont été démontrées comme étant les plus actives notamment grâce à la présence de carvacrol et thymol qui apportent ce fort pouvoir antimicrobien sur un large spectre de microorganismes. Le Tableau I-8 adapté de Calo et al. permet de voir l'étendu des huiles essentielles étudiées dans la littérature [154].

L'incorporation d'huiles essentielles dans des films comestibles a été testée par différentes équipes pour augmenter la durée de vie de certaines denrées alimentaires. On retrouve notamment des essais sur la viande avec des huiles essentielles de thym et d'origan incorporées à des films et enrobages à base de protéines de soja ou d'isolat de protéines de lactosérum [156], [157]. Le même type d'essai est également conduit sur des crevettes afin d'apporter un pouvoir antimicrobien et antioxydant par l'ajout des huiles essentielles de feuilles d'oranger ou de thym incorporées à des films assez divers dont des films de gélatine, de gomme de graine de basilic ou de chitosane [158]–[160]. Les huiles essentielles d'origan et de citronnelle ont également montrer une amélioration de la préservation des fruits tels les abricots et les ananas lorsqu'elles sont incorporées à des enrobages de gomme de graines de basilic ou d'alginate [161], [162]. De nombreuses autres applications sont recherchées pour ces enrobages contenant des huiles essentielles ou bien leurs composants actifs, on peut citer l'exemple de découpes de fromages [163] et fruits et légumes tranchés [164].

La limite la plus importante à l'utilisation des huiles essentielles est le dosage qui ne peut excéder le niveau acceptable des produits alimentaires d'un point de vue organoleptique. Afin de réduire cette limitation, la solution peut être l'identification et la purification des composants actifs des huiles essentielles afin de s'affranchir de l'impact organoleptique ou bien de diminuer la concentration initiale antimicrobienne et de contrôler son relargage au cours du temps tout en maintenant une concentration efficace dans le produit.



Tableau I-8 : Liste des sources d'huiles essentielles et de leurs constituants étudiés dans la littérature [154]

Main constituents of select essential oils derived from plants.				
Plant source	Latin name	Main components	%	Reference
Bergamot (peel)	<i>Citrus bergamia</i>	Limonene	59.2	Nabiba, Abdelfatteh, Faten, Hervé, & Moncef, 2010 [165]
		Linalyl acetate	16.8	
		Linalool	9.5	
Black pepper (berry)	<i>Piper nigrum</i>	Piperine	33.5	Singh et al., 2005 [166]
		Piperolein		
		Piper amide		
Carrot (juice)	<i>Daucus carrot L.</i>	Carotol	20.2	Ma et al., 2015 [167]
		Sabinene	12.8	
		Beta-caryophyllene	8.0	
		Alpha-pinene	6.1	
Cinnamon (bark)	<i>Cinnamomum verum</i>	Trans-cinnemaldehyde	68.4	Baratta et al., 1998 [168]
		Limonene	13.2	
		Eugenol	4.4	
Clove (buds)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	7.5	Naveed et al., 2013 [169]
		Eucalyptol	3.2	
Coriander (seeds)	<i>Coriandrum sativum</i>	$\Delta^3$ -Carene	60.5	Teixeira et al., 2013 [170]
		$\gamma$ -terpinene	18.2	
		Camphor	6.5	
Cumin (seeds)	<i>Nigella sativa L.</i>	Thymoquinone	37.6	Singh et al., 2014 [171]
		p-cymene	31.4	
		$\alpha$ -thujene	5.6	
Eucalyptus oil	<i>Eucalyptus spp</i>	1, 8-cineole	4.5–70.4	Elaiissi et al., 2012 [172]
		Cryptone	0.0–20.9	
		$\alpha$ -pinene	1.0–17.6	
Fennel (seed)	<i>Foeniculum vulgare L.</i>	Trans-Anethol	56.4	Roby, Sarhan, Selim, & Khalel, 2013 [173]
		Fenchone	8.3	
		Methyl chavicol	5.2	
Key lime	<i>Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle</i>	Limonene	53.8	Costa et al., 2014 [174]
		$\gamma$ -terinene	16.5	
		B-pinene	12.6	
Lemongrass	<i>Cymbopogon citratus (DC) Stapf.</i>	Geranial	45.7	Baratta et al., 1998 [168]
		Myrcene	3.9	
		6-Methylhept-5-en-2-one	2.7	
Marjoram	<i>Marjorana hortensis Moench</i>	Terpinen-4-ol	20.8	Baratta et al., 1998 [168]
		$\gamma$ -terpinene	14.1	
		$\alpha$ -Terpinene	9.2	
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	1, 8-cineole	46.6	Baratta et al., 1998 [168]
		$\alpha$ -pinene	11.8	
		Limonene	9.3	

#### I.2.8.1.6 Les bactéries lactiques et bactériocines

La plupart des bactéries lactiques ont obtenu le statut GRAS (« Generally Recognized As Safe ») par la FDA (« Food and Drug Administration »). Ces bactéries peuvent donc être utilisées comme conservateurs alimentaires [125], [175], [176]. Cependant, les organismes vivants comme les bactéries lactiques qui sont pour la plupart thermosensibles, ont pour limite à leur utilisation, les conditions du procédé de fabrication du film. En effet, pour Pereira et al. tout comme d'autres auteurs travaillant sur les bactéries lactiques, il leur a fallu fabriquer le film par voie humide, et incorporer les souches probiotiques après avoir au préalable préparé une solution d'isolat de protéines de lactosérum, de plastifiant et d'eau qui a subi un traitement thermique (80°C) afin d'assurer la survie des bactéries lactiques [125].

Les bactériocines sont les peptides antibactériens produits par les bactéries lactiques. Parmi les bactériocines, on retrouve la pediocine PA-1, la lacticine 3147, la natamycine (E-235) qui ont été étudiées pour être approuvées et utilisées mais, la bactériocine la plus connue est la nisine (E-234). Cette bactériocine est un polypeptide produit par la bactérie lactique *Lactococcus lactis* et contient 34 acides aminés. La nisine est reconnue comme composé GRAS et est couramment utilisée comme conservateur, par exemple dans la conservation des fromages, des saucisses, des sauces, des purées déshydratées.... Elle possède une activité antimicrobienne sur une large gamme de bactéries Gram + et notamment sur de nombreux pathogènes alimentaires comme *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes*. L'efficacité des films incorporant de la nisine dépend de la formulation finale et du procédé d'élaboration du film. La nisine a été incorporée dans des films d'amidon préparés par casting en voie humide pour le contrôle de *Listeria innocua* par l'équipe de Sanjurjo et al. [177]. Ils ont ainsi démontré que les films d'amidon contenant de la nisine sont actifs et réduisent la croissance de *L. innocua* et permettent une bonne barrière aux contaminations pouvant altérer les produits alimentaires [177]. Dans ce même travail, les auteurs ont remarqué que le relargage progressif de la nisine à partir du film permettait d'améliorer son activité protectrice (en diminuant le phénomène de résistance à la nisine) contrairement à une addition directe. La Figure I-15 (A) montre l'action de l'ajout direct de nisine sur la souche. Après une heure de contact, la population microbienne a tendance à augmenter quel que soit la concentration de nisine testée, ce qui peut être expliqué par une inactivation de la nisine. Une expérience similaire à la précédente en mettant en contact *L. innocua* et des films relarguant différentes concentrations en nisine est présentée dans la Figure I-15 (B). On peut ainsi remarquer qu'aux formulations les plus concentrées en nisine (1322 et 2204

IU/cm<sup>2</sup>) la croissance microbienne ne reprend qu'après 6h de contact. Ce retard peut être expliqué par un relargage plus progressif de la nisine par le film ce qui permet de limiter une inactivation trop rapide. On pourrait même aller plus loin dans l'interprétation de leurs résultats en voyant que seule la concentration la plus élevée en nisine (2204 IU/cm<sup>2</sup>) permet cette inhibition de *L. innocua* pendant plus de 6h. Quoiqu'il en soit, ce travail est un bon exemple de l'interaction entre la matrice du biopolymère et les composés actifs qui sont incorporés à celui-ci.

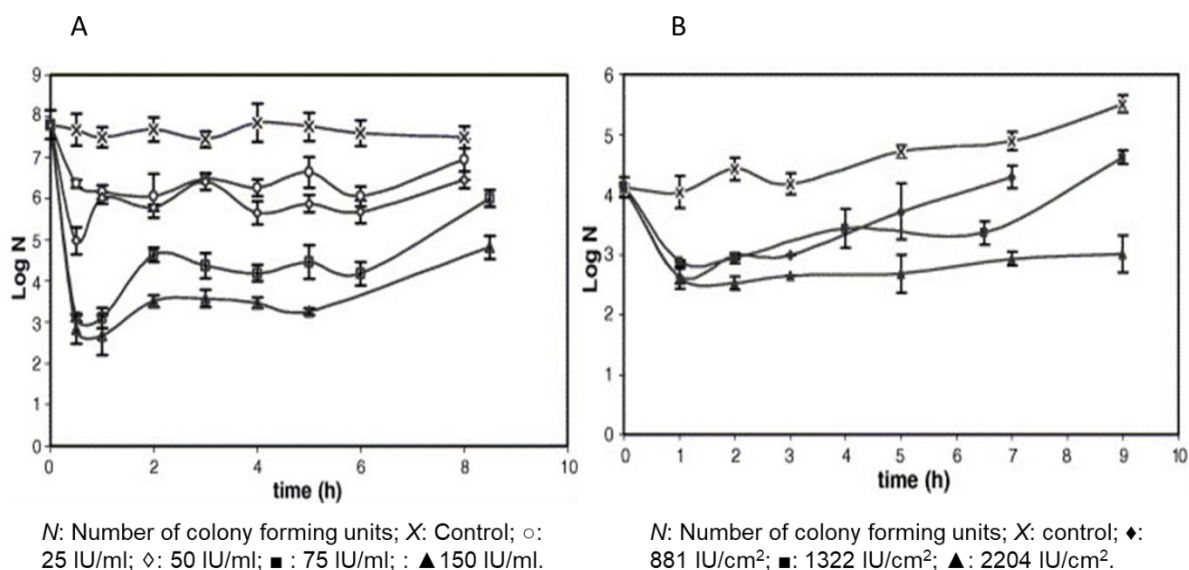


Figure I-15 : A : Réponse de *L. innocua* à l'ajout direct de nisine et B : Relargage de nisine à pH 5.5 dans un système liquide à partir de films contenant différentes concentrations de l'antimicrobien [177]

Dans les travaux de Colak et al., la nisine et la natamycine ont été incorporées à des granulés de caséinate extrudés à 65°C puis soufflés (80°C) ou pressés (80°C) pour former des films [178]. Les granulés et films ont été testés sur différents microorganismes, *Listeria innocua*, *Kocuria rhizophila* et *Aspergillus niger*. Malgré une inactivation des antimicrobiens au vu de la réduction de l'activité antimicrobienne constatée, les granulés et films ont gardé une activité antimicrobienne résiduelle significative. Ce travail montre que l'optimisation des formulations et procédés de fabrication permet le développement de films actifs avec des antimicrobiens qui sont des composés thermosensibles.

Des films d'isolats de protéines de soja ont également été proposés comme support pour la nisine et le lysozyme et ont montré un potentiel inhibiteur sur *Lactobacillus plantarum* [179] et sur *Listeria monocytogenes* [180].

#### I.2.8.1.7 Les acides organiques

Les acides organiques dont l'acide lactique (E-270), tartarique (E-334), acétique (E-260), malique (E-296), citrique (E-330), benzoïque (E-210), sorbique (E-200) et propionique



(E-280), tout comme leurs sels sont depuis longtemps utilisés dans la préservation des aliments. Ce sont des conservateurs alimentaires dont l'utilisation est réglementée par le règlement UE N°1129/2011 modifiant l'annexe II du règlement CE N° 1333/2008 concernant les additifs alimentaires [148], [181]. Le Tableau I-9 présente les propriétés de certains acides organiques et leurs sels.

Les acides organiques et leurs sels ont été testés dans différentes matrices telles que des films de protéines de lactosérum par Pérez et al. et Ozdemir et al. [182]–[184], des films d'amidon de pomme de terre par Saraiva et al. ou encore Shen et al. [185], [186], des films d'amidon de tapioca et gomme xanthane par Arismendi et al. et Fama et al. [187], [188], des films de gluten de blé par Türe et al. [189] et dans des films de chitosane par Pranoto et al. [190]. Torres et Karel ont également montré que des enrobages de zéine ont permis de conserver une concentration élevée d'acide sorbique en surface d'un fromage analogue (humidité intermédiaire) [121].

Les acides organiques ont été étudiés pour leurs capacités antimicrobiennes sur de nombreuses souches. Dans ce projet ils ont été testés contre *Escherichia coli* d'où un état de l'art de l'action de ces derniers sur *E. coli* (exprimée en Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en grammes par litre). Cette étude montre en effet une action inhibitrice importante des acides organiques et leurs sels sur différentes souches d'*E. coli*.

Tableau I-9 : Présentation des acides organiques et de leurs sels : structure chimique, propriétés physiques et aspect réglementaire

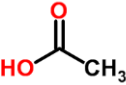
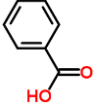
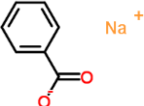
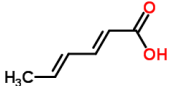
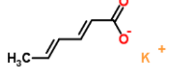
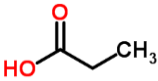
	E-Number	Quantité autorisée selon les produits (mg/L ou mg/kg selon la matrice alimentaire) RÈGLEMENT (UE) N° 1129/2011	Formules	pKa	Température ébullition (°C)	Masse molaire (g/mol)	Masse volumique (g/cm <sup>3</sup> )	Solubilité dans l'eau (g/L)	Molécule
<b>Acide acétique</b>	E-260	quantum satis	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> COOH	4,76 (25°C)	117,9	60,052	1,04	1000 (25°C)	
<b>Acide benzoïque</b>	E-210	150-quantum satis	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COOH	4,19 (25°C)	122,4	122,121	1,31	1,3 (20°C)	
<b>Benzoate de sodium</b>	E-211	150-quantum satis	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COONa	4,20 (25°C)	> 300	144,103	1,44	630	
<b>Acide sorbique</b>	E-200	20-quantum satis	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> COOH	4,76 (25°C)	134,5	112,127	1,2	1,6 (20°C)	
<b>Sorbate de potassium</b>	E-202	20-quantum satis	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> KO <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> COOK	4,69 (25°C)	228	150,217	1,363	582 (20°C)	
<b>Acide propionique</b>	E-280	1000-quantum satis	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	4,88 (25°C)	141,1	74,078	0,995	1000 (25°C)	
<b>Propionate de calcium</b>	E-282	1000-quantum satis	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> CaO <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOCa)*2	4,88 (25°C)	> 300	186,219	0,4	60 (20°C)	

Tableau I-10 : Etudes de l'activité anti-*Escherichia coli* des acides organiques et de leurs sels. Expression de la Concentration Minimale Inhibitrice (MIC) déterminée en g/L dans chaque cas)

<b>Organic acid</b>	<b>Strain</b>	<b>MIC (g/L)</b>	<b>Conditions</b>	<b>Reference</b>
<b>Acetic acid</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0.417	0.5 McFarland turbidity. 37°C/12H	Gao, 2012[191]
	<i>Escherichia coli</i> MTCC 118	0.25 (pH 6.06)	Nutrient agar. pH 6.8. 35°C / 18H	Banerjee, 2003[192]
	<i>Escherichia coli</i> NCTC 10418	0.006	Nutrient broth, 37°C / 18H	Adeshina, 2012[193]
<b>Benzoic acid</b>	<i>Escherichia coli</i> TG1	0.9625 (24h)	NCCLS, 2002, Muller Hinton broth&RPMI 1640 broth, 5x10 <sup>5</sup> cfu/mL, 35°C/48H	Long-Xian Lv, 2007[194]
	<i>Escherichia coli</i> TG1	1.0656 (48h)	NCCLS, 2002, Muller Hinton broth&RPMI 1640 broth, 5x10 <sup>5</sup> cfu/mL, 35°C/48H	Long-Xian Lv, 2007[194]
<b>Potassium sorbate</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895	2.5 (pH 6)	Perez, 2011 and NCCLS 2009, McFarland 0,5 standard in saline solution 5x10 <sup>7</sup> , 37°C/18H	Perez, 2014 [182]
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43895	1.25 (pH 5.2)	Perez. 2011 and NCCLS 2009. McFarland 0.5 standard in saline solution 5x10 <sup>7</sup> , 37°C/18H	Perez, 2014[182]
	<i>Escherichia coli</i> PMFKg-B12	5	10 cfu/mL, Muller Hinton broth, 27°C/ 24H	Stanojevic, 2009 [195]
<b>Sodium benzoate</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	0.00015	Nutrient broth, 37°C / 18H	Adeshina, 2012[193]
	<i>Escherichia coli</i> PMFKg-B12	5	10 cfu/mL, Muller Hinton broth, 27°C/ 24H	Stanojevic, 2009 [195]
<b>Sorbic acid</b>	<i>Escherichia coli</i> MTCC 118	0.6 (pH 5.43)	Nutrient agar, pH 6.8, 35°C / 18H	Banerjee, 2003[192]
	<i>Escherichia coli</i> TG1	0.55 (24h)	NCCLS, 2002, Muller Hinton broth&RPMI 1640 broth, 5x10 <sup>5</sup> cfu/mL, 35°C/48H	Long-Xian Lv, 2007[194]
	<i>Escherichia coli</i> TG1	0.9625 (48h)	NCCLS, 2002, Muller Hinton broth&RPMI 1640 broth, 5x10 <sup>5</sup> cfu/mL, 35°C/48H	Long-Xian Lv, 2007[194]

### I.2.8.2 Relargage de composés actifs

L'enrobage d'une denrée permet de protéger celle-ci des transferts d'humidité, de gaz, de la perte d'arômes et également peut la protéger contre des chocs physiques. En plus de cette fonction barrière, un film ou un enrobage protecteur peut être le support de molécules actives (antioxydants, antimicrobiens) qui peuvent rester dans le film ou progresser vers la matrice alimentaire pour aider à sa conservation, comme le souligne le schéma suivant Figure I-16 adapté de Cuq et al. [129]. Tout l'enjeu est donc de déterminer la fonction recherchée de l'enrobage ou film actif.

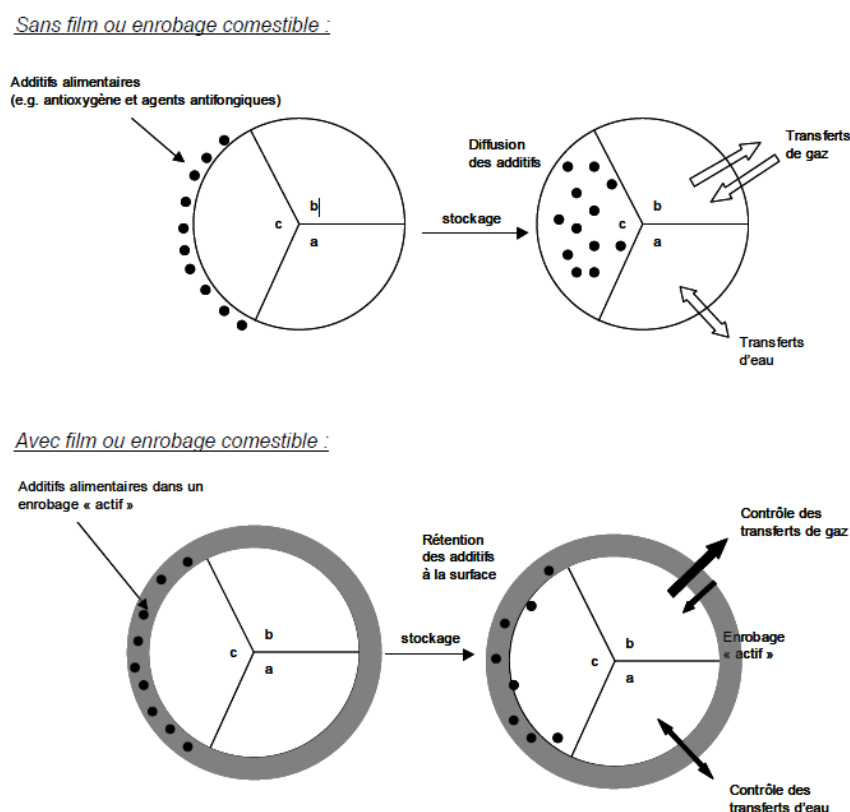


Figure I-16 : Schéma représentant la préservation d'un aliment avec ou sans enrobage/film comestible actif ; (a) détérioration liée à des transferts d'eau, (b) détérioration liée à des transferts de gaz, (c) détériorations liées à un développement microbien [129]

Il est souvent question de « contrôle » lorsque l'on parle de l'action des films et enrobages sur une denrée alimentaire (contrôle des échanges gazeux, d'humidité, de migration de composants). Cela n'est pas toujours le terme approprié car en réalité le film apporte certaines propriétés de protection mais cette fonction n'est pas toujours contrôlée en fonction des facteurs environnementaux et surtout du temps par exemple.

Le relargage des substances actives incorporées aux films et enrobages est un facteur très important à déterminer [145].

Bien évidemment, le type de relargage dépendra de l'application visée. Selon l'application, un relargage immédiat, lent ou bien contrôlé est recherché. Les films doivent contrôler le relargage des substances actives dans l'environnement à proximité (atmosphère, aliment) afin de maximiser l'efficacité de ces substances incorporées. Il est donc primordial de prendre en compte les interactions de ses substances actives avec l'environnement, avec le film ou avec les aliments.

Différents facteurs vont influencer le relargage de composés comme [196]–[198] :

- **La taille et les interactions** de la molécule avec la matrice de biopolymère : cela influence sa mobilité dans la matrice, ainsi une petite molécule migre plus rapidement qu'une grosse.
- **La compatibilité** entre la molécule active et la matrice support : cela dépend donc des caractéristiques des deux types de molécules, des interactions qui sont créés lors de l'élaboration du film. Si les deux ne sont pas compatibles, le relargage se fera très rapidement et si les deux sont compatibles, le risque est de ne pas avoir de migration. Idéalement, il faut que le composé antimicrobien soit physiquement incorporé à la matrice support et que le relargage se fasse de manière contrôlée par modification de la matrice polymère. La compatibilité est déterminée par la polarité, le pKa, la température et la solubilité.
- **Le réseau** de la matrice support : la porosité et son changement aux conditions environnantes vont être des caractéristiques déterminantes du relargage des molécules.

Les films à base de protéines évoqués précédemment ont une nature hydrophile qui peut être utilisée à son avantage pour le relargage de composés actifs car les propriétés de transfert de matière sont affectées par la présence d'eau. Le polypropylène qui n'est pas très sensible à l'humidité (en opposition aux protéines) a montré peu, voir aucune, capacité à relarguer des composés actifs [199], [200].

Différents systèmes de relargage contrôlé ont été testés afin d'obtenir un relargage spécifique de molécules actives telles des antimicrobiens, des antioxydants, des arômes, des encres ou bien des molécules pharmaceutiques. Par exemple, des peptides antimicrobiens naturels ont été encapsulés dans des microcapsules sensibles à la température par l'équipe de Al-Nabulsi, ce qui permet de protéger les peptides jusqu'à ce que la température de conservation des emballages de viande dépasse la température critique de réfrigération, à ce moment-là, la microcapsule est détruite et les peptides antimicrobiens sont libérés [201].

Moditsi et al. ont étudié l'influence du pH et du NaCl sur des films d'isolats de protéines de lactosérum et de caséinates de sodium plastifiés au sorbitol [202]. Ils ont étudié les taux de diffusion de leurs films contenant différentes concentrations de sorbate de potassium et de natamycine. Ils ont ainsi remarqué qu'une addition de chlorure de sodium et une diminution du pH permettent de réduire la diffusion du sorbate de potassium (Figure I-17 (1)) ; par contre, seul le pH a une influence sur le coefficient de diffusion de la natamycine (Figure I-17 (2)). Le relargage dépend donc fortement des molécules choisies et de leurs caractéristiques telles que la taille, la polarité... ainsi que des interactions matrice/molécule à relarguer/milieu.

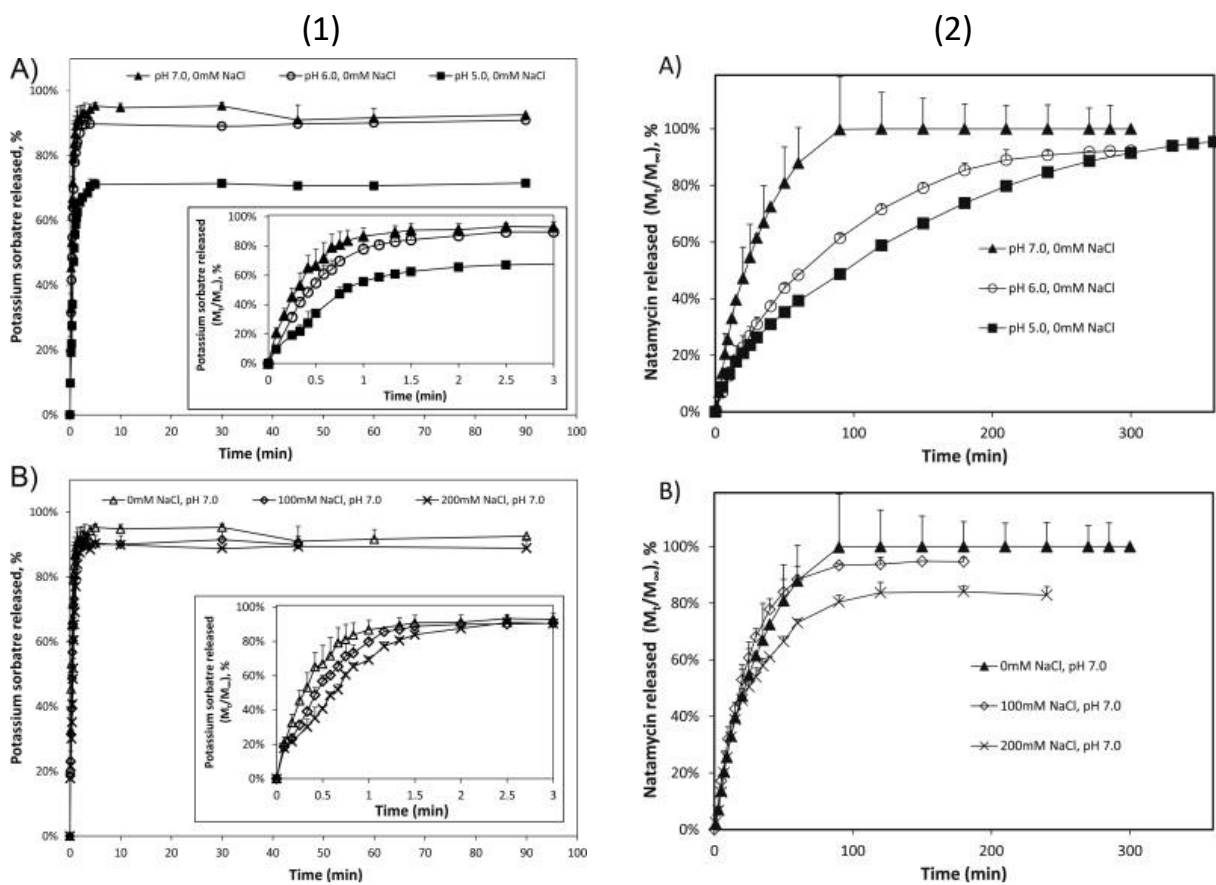


Figure I-17 : Cinétique de diffusion du sorbate de potassium (1) et de la natamycine (2) dans des films de protéines de lactosérum A) à différentes valeurs de pH de la solution de casting et B) à différentes concentrations de NaCl ajoutées [202]

Sanjuro et al. ont quant à eux évalué le potentiel de support et de relargage de film à base d'amidon de tapioca contenant de la nisine [177]. Ainsi, ils ont obtenu un meilleur contrôle sur *L. innocua* en contact avec un film contenant de la nisine que lorsque la nisine est présentée seule. L'exemple de la nisine est présenté ici afin de démontrer le potentiel de relargage des films antimicrobiens en général.

Ozdemir et al. ont déterminé que la diffusion de sorbate de potassium dans des films de protéines de lactosérum ne suivait pas la loi de Fick [184]. Le solvant, qui joue un rôle important, gonfle le matériau hydrophile et augmente le relargage du sorbate (molécule hydrosoluble) et a été considéré dans leur modélisation. Le coefficient de diffusion du sorbate dans les films de protéines de lactosérum est 10 fois plus élevé que dans des films de gluten [203] et de polyéthylène basse densité [204] mais, 10 fois inférieur à celui dans les aliments à humidité intermédiaire [121], [205].

De nombreuses solutions peuvent être envisagées pour contrôler le relargage des agents actifs grâce au choix de la matrice support par rapport aux molécules actives mais également par rapport à l'environnement avec lequel elle va être en contact (température, pH,  $a_w$ ).

### *1.2.8.3 Aspect réglementaire concernant les matériaux destinés à rentrer en contact avec des denrées alimentaires*

Les films et enrobages comestibles font partir de la portion comestible des produits et doivent donc adhérer à la réglementation concernant les produits alimentaires [37]. Tous les ingrédients et additifs de la formulation des films doivent être de qualité alimentaire et non toxiques [29], [37], [206]. Généralement il s'agit d'ingrédients GRAS (Generally Recognized As Safe) mais, certaines restrictions s'appliquent parfois concernant leur domaine d'application. La Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes, indique que tous les ingrédients, additifs et auxiliaires technologiques autorisés sont potentiellement utilisables dans la formulation des emballages comestibles. La formulation des films et enrobages est cependant pensée en fonction des objectifs finaux visés et des contraintes technologiques pour l'élaboration de ces derniers.

D'un point de vue réglementaire, les films et enrobages comestibles peuvent être considérés comme des produits alimentaires, comme des ingrédients alimentaires, comme des substances aptes au contact alimentaire ou comme des matériaux d'emballage alimentaire [31], [111]. Pour le moment, la législation reste assez vague quant à la dénomination de ce type de film et les industriels sont libres par exemple de noter la composition des films sur leurs étiquettes (cela dépend tout de même du fournisseur du film qui doit être différent de l'utilisateur du film).

La plupart des régulations actuelles concernant les matériaux pour contact alimentaire et notamment les matériaux actifs sont décrites dans la Figure I-18, d'après Restuccia et al., [207].

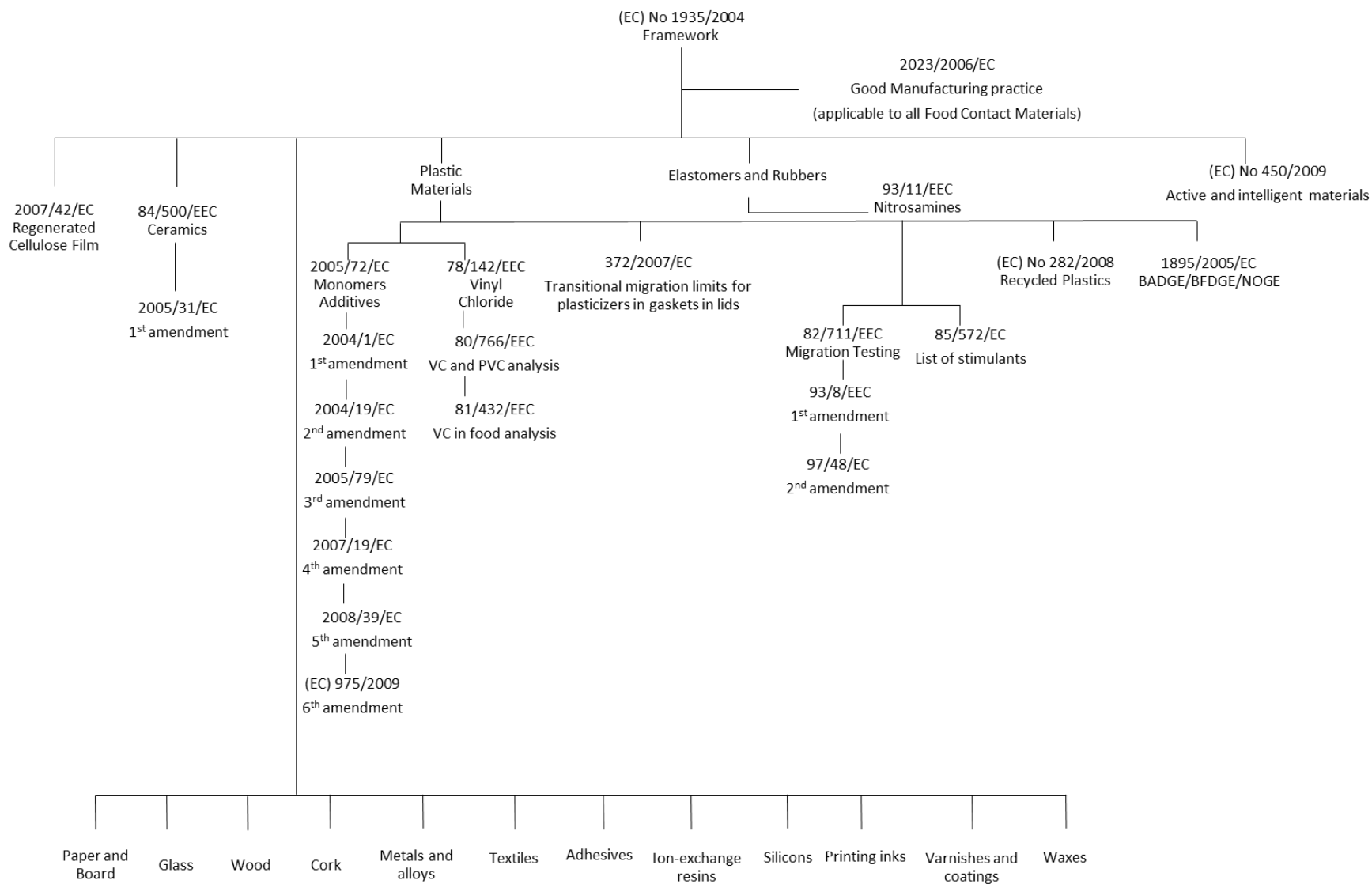


Figure I-18 : Législation Européenne concernant les matériaux pour contact alimentaire [207]



### I.3 La caséine, une protéine bien connue ?

Après lecture des réglementations en vigueur concernant les étiquettes développées pour la qualité et la traçabilité des fromages AOP, la caséine est choisie comme protéine matrice du biopolymère de ce projet.

Les protéines sont des macromolécules constituées d'une séquence spécifique d'acides aminés (d'où la dénomination d'hétéropolymères car les unités ne sont pas semblables) et d'une organisation moléculaire caractéristique. Ce qui distingue les protéines des autres biopolymères est leur dénaturation, leur charge électrostatique et leur nature amphiphile. La structure des protéines peut être facilement modifiée afin de les rendre plus aptes à la formation d'un film par une dénaturation par la chaleur, la pression, l'irradiation, les traitements mécaniques, des acides, des alcalins, des ions métalliques, des sels, une hydrolyse chimique, un traitement enzymatique et une réticulation chimique et physique [208]. Tous ces traitements auront également leur impact sur les propriétés finales du film. Les protéines sont d'autant plus attractives que contrairement aux polysaccharides, elles sont composées de différents acides aminés qui comportent différentes fonctions chimiques ouvrant un grand champ de modifications et donc d'applications possibles.

Les films à base de protéines ont montré de nombreux avantages tels que [36], [116] :

- De bonnes propriétés optiques (brillance et transparence),
- Des excellentes propriétés barrières aux lipides,
- Une barrière à l'oxygène et aux vapeurs organiques à des humidités relatives faibles ou intermédiaires
- Une perméabilité sélective aux gaz.

Par contre, les films à base de protéines sont particulièrement sensibles à l'eau de par leur caractère hydrophile et cela peut altérer significativement les propriétés mécaniques et barrières des films.

Le cas de la caséine avec ses caractéristiques chimiques et structurales ainsi que ces propriétés est décrit ci-après afin d'établir l'état de l'art concernant les biomatériaux à base de caséines.

### I.3.1 La caséine, une protéine du lait

La caséine est la protéine majoritaire du lait car elle représente 80% de l'ensemble des protéines du lait. Le lait bovin contient environ 30-35 g de protéine par litre. Cependant, ce chiffre est assez variable selon la saison, l'état de lactation et l'alimentation de l'animal [209]. Le Tableau I-11 suivant présente également la variabilité de composition des laits de différentes espèces animales. On peut ainsi voir que le taux de caséine est très variable.

Tableau I-11 : Composition du lait moyen (% de masse) de différentes espèces [210]

Composant	Bovin	Humain	Chèvre	Mouton
Protéine	3,4	1,0	2,9	5,5
Caséine	2,8	0,4	2,5	4,6
Graisse	3,7	3,8	4,5	7,4
Lactose	4,6	7,0	4,1	4,8
Cendres	0,7	0,2	0,8	1,0

Il existe différents types de protéines dans le lait que l'on distingue généralement en deux catégories en fonction de leur réaction face à l'ajout d'un acide ou de chymosine (présure) dans le lait :

- Les protéines **solubles**, nommées **protéines sériques ou protéines du lactosérum** qui ont une structure globulaire, rigide, compacte comme la  $\beta$ -lactoglobuline ou l' $\alpha$ -lactalbumine.
- Les **protéines insolubles**, les **caséines** formant des micelles avec une structure dite en « random coil » (structure hélice/ressort aléatoire), supramoléculaire. Les caséines représentent environ 80% des protéines du lait de vache et précipitent à pH 4,6 (pH isoélectrique) à 30°C.

Le Tableau I-12 présente la composition protéique moyenne du lait de vache selon Walstra et Jenness, 1984 [211] :

*Tableau I-12 : Composition protéique moyenne du lait de vache (selon Walstra et Jenness, 1984 [211])*

<b>Protéines</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
<b>Caséine <math>\alpha_{s1}</math></b>	10,0
<b>Caséine <math>\alpha_{s2}</math></b>	2,6
<b>Caséine <math>\beta</math></b>	9,3
<b>Caséine <math>\kappa</math></b>	3,7
<b>Caséine <math>\gamma</math></b>	0,8
<b>Protéose-peptones</b>	0,8
<b><math>\beta</math>-lactoglobuline</b>	3,2
<b><math>\alpha</math>-lactalbumine</b>	1,2
<b>Immunoglobuline</b>	0,8
<b>Albumine du sérum</b>	0,4
<b>Lactoferrine</b>	0,1
<b>Transferrine</b>	0,1
<b>Membrane globules gras</b>	0,4
<b>TOTAL</b>	33,0

#### *1.3.1.1 Les protéines solubles*

Généralement, on parle de protéines de lactosérum concernant les protéines qui n'ont pas précipité et se retrouvent dans le sérum après ajout d'acide ou de présure. Ces protéines solubles représentent 20% des protéines contenues dans le lait. La plupart de ces protéines sont globulaires avec un haut degré d'hydrophobicité. Elles sont également thermosensibles et deviennent insolubles lorsque le lait est chauffé (> 60-95 °C selon les protéines) [212]. Les principales protéines sont l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline et les autres sont notamment l'albumine du sérum, les immunoglobulines, les protéases-peptone, des traces d'enzymes, du lysozyme et de la lactoferrine [212].

#### *1.3.1.2 Les caséines*

Les caséines contenues dans le lait sont structurées en superstructures sphériques appelées micelles dont le diamètre varie de 30 à 600 nm [213]. Les micelles de caséine sont composées de monomères (caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ) et de minéraux qui par leurs propriétés et leurs interactions fournissent la structure organisationnelle de la caséine en fonction de son environnement et des traitements qui lui sont appliqués. En effet, les propriétés des produits laitiers par exemple, dépendent principalement des propriétés des protéines. De plus, de nombreux procédés de transformation sont possibles car les caséines ont une très bonne stabilité à la chaleur en comparaison des protéines du lactosérum qui sont stables jusqu'à 60-90°C [209].

Les micelles dans le lait sont stables jusqu'à 120°C pendant 20 minutes et la stabilité tend à croître avec l'augmentation de la teneur en caséine et la diminution de phosphate colloïdal [214], [215].

Les caséines sont composées de différents types de protéines et de minéraux. On retrouve notamment la caséine  $\alpha_{s1}$ , la caséine  $\alpha_{s2}$ , la caséine  $\beta$ , la caséine  $\kappa$  et des traces de caséine  $\gamma$  [216], [217]. Sur une base sèche, les micelles sont composées à 94% de protéines et 6% de phosphate de calcium colloïdal comprenant du calcium, du phosphate, du magnésium et du nitrate [209]. Ces différentes caséines ont des régions hydrophiles et d'autres hydrophobes différentes d'une caséine à l'autre (Figure I-19) [218], [219].

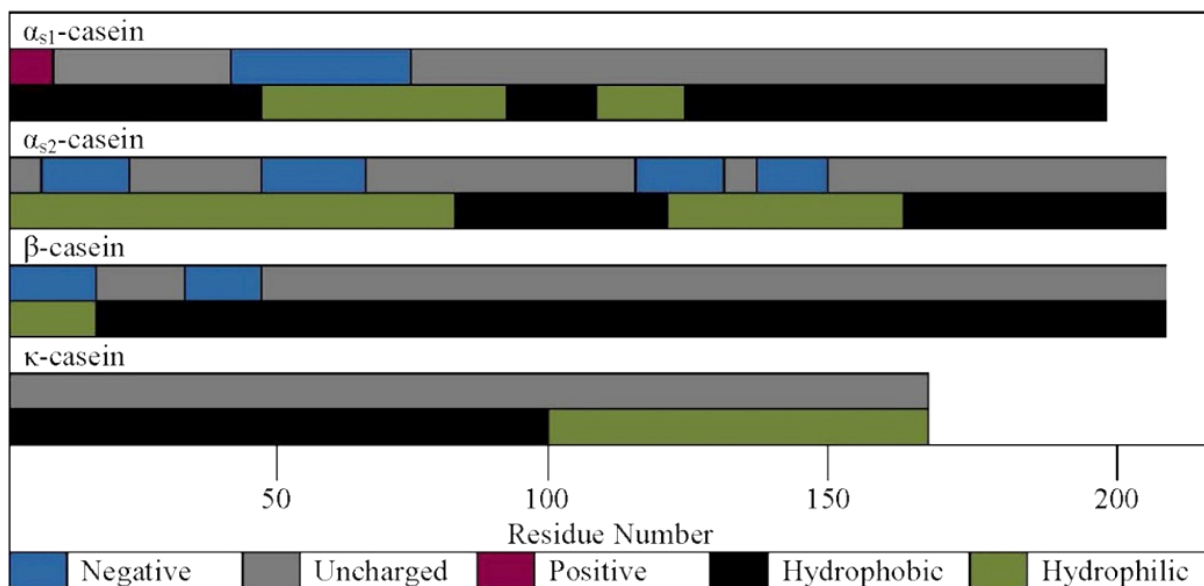


Figure I-19 : Diagramme schématique des zones hydrophiles, hydrophobes, chargées et non chargées des différentes caséines à pH 6,6 (adapté et modifié de Kessler et al., 2013 et Swaisgood, 2003 [218], [219])

De plus, les caséines sont des phosphoprotéines, elles ont donc chacune plus ou moins de régions phosphorylées au niveau des résidus sérine. Les résidus proline uniformément répartis dans la séquence des caséines empêchent la formation de structures secondaires telles les hélices ou feuillets  $\beta$  d'où la conformation dite ouverte ou « random coil » de la caséine [217]. Les caséines  $\kappa$  ont un rôle particulier, ce sont tout d'abord des glycoprotéines et n'ont qu'un seul groupement phosphosérine mais surtout, elles sont stables en présence d'ions calcium et protègent ainsi l'ensemble des caséines contre la précipitation et stabilisent la micelle [216].

Le Tableau I-13 permet de répertorier les différences entre les quatre grandes caséines :

Tableau I-13 : Propriétés des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  (NOTE : Les variations génétiques et des degrés de phosphorylation différents induisent les écarts) [220]–[223]

Type	$\alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}$	$\beta$	$\kappa$
<b>Mol. wt.</b>	22,068 - 23,724	25,230	23,944 - 24,092	19,007 - 19,039
<b>pI</b>	4.2 - 4.76		4.6 - 5.1	4.1 - 5.8
<b>Phosphates /mole</b>	8 - 10	10 - 13	4 - 5	1
<b>Residues</b>	207	199	209	169
<b>Proline residues</b>	10	17	34 - 35	20
<b>g protein/L in skim milk</b>	12 - 15	3 - 4	9 - 11	2 - 4
<b>Cystein residues</b>	0	2	0	2
<b>S-S groups</b>	0	1	0	1
<b>S-H groups</b>	0	0	0	0
<b>Calculated charge at pH 6.6 (mV)</b>	(-21) – (-23.5)	(-12.2) – (-17.1)	(-11.8) – (-13.8)	(-2) – (-3)
<b>Description</b>	_ Can be precipitated at low levels of calcium	_ Two hydrophobic regions which contain the proline residues _ Polar region with phosphate groups _ Can be precipitated at low calcium levels	_ Amphiphilic protein acts like detergent molecule _ Less sensitive to calcium precipitation	_ Rennet cleavage leaves hydrophobic part, para-kappa casein, hydrophilic part (casein glycomacropeptide) _ Resistant to calcium precipitation

Les caséines peuvent être extraites par différentes méthodes qui leur confèrent des structures et des propriétés différentes.

- La caséine dite « **présure** » est obtenue par coagulation du lait par des enzymes protéolytiques comme celle trouvée dans l'estomac de veau (chymosine) avec un pH inchangé par rapport au lait (environ 6,6) et une température optimale pour l'enzyme de 29°C. La solution enzymatique qu'est la présure contient de la chymosine à 75% et de la pepsine à 25%. La chymosine qui joue un rôle majeur, vient couper la caséine  $\kappa$  entre le 105<sup>ième</sup> et le 106<sup>ième</sup> acide aminé comme indiqué dans la Figure I-20. Cette action va engendrer la formation d'un glycomacropeptide libre et la caséine  $\kappa$  devient la paracaséine  $\kappa$ . La paracaséine  $\kappa$  devient sensible au calcium, des liaisons phosphocalciques entre les micelles se créent, la micelle est déstabilisée et le lactosérum est expulsé. Cette coagulation des caséines dite enzymatique est irréversible car la caséine  $\kappa$  est hydrolysée et des liaisons fortes interviennent. La caséine présure est insoluble dans l'eau et les alcalins mais peut être dissoute par ajout d'agents séquestrant le calcium comme des polyphosphates. C'est notamment une technique utilisée pour fabriquer des analogues de fromages [224].

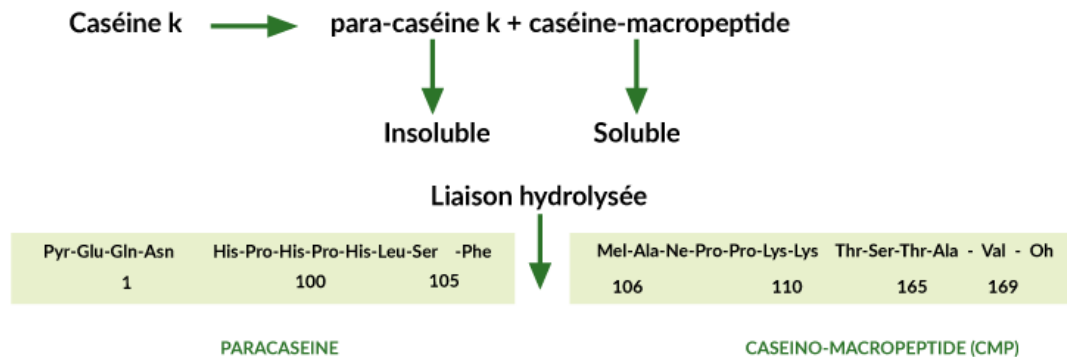


Figure I-20 : Représentation schématique de l'hydrolyse de la caséine  $\kappa$  par la chymosine [225]

- La caséine dite « **acide** » est quant à elle obtenue par coagulation acide. Par l'ajout d'acide minéral ou lactique, la caséine va précipiter lorsque le pH sera en dessous du pH isoélectrique de la caséine qui est de 4,6. Dans ce cas-là, la caséine perd sa structure micellaire native par élimination des minéraux (calcium et phosphate). Généralement, de l'acide chlorhydrique est ajouté pour faire coaguler les caséines. Dans certains autres cas, de l'acide lactique produit *in situ* par une culture mésophile d'acide lactique comme *Streptococcus lactis* et/ou *S. cremoris* permet d'obtenir la coagulation recherchée. Occasionnellement, l'acide sulfurique est utilisé mais celui-ci charge le lactosérum avec du sulfate de magnésium qui est un laxatif et est donc non recherché pour des applications du lactosérum. De nouvelles techniques d'extraction de caséines « acide » ont été développées. Des procédés comme l'échange d'ions, l'électrodialyse et l'électroacidification ont permis d'obtenir des caséines « acide » avec de propriétés physico-chimiques différentes [226]. La caséine « acide » est insoluble dans l'eau mais soluble dans les alcalins.
- Les **caséinates**, eux, proviennent d'une deuxième modification chimique apportée sur des caséines acides. En effet, les caséinates correspondent à la neutralisation des caséines acide par des alcalins tels l'hydroxyde de sodium, de potassium ou de calcium qui donnent naissance aux caséinates du même nom. Les caséinates ont la particularité d'être hydrosolubles.

Dans certains cas, plusieurs systèmes de coagulation sont jumelés comme par exemple des acides et de la présure ou bien des acides et de la chaleur par exemple. Des caséines sont également précipitées par injection de dioxyde de carbone sous haute pression à haute température qui est un procédé développé par l'équipe de Tomasula [227], [228]. La caséine extraite par ce procédé contient un fort taux de calcium (1.5%) car les micelles sont précipitées intactes.

Le Tableau I-14 et les représentations schématiques suivantes (Figure I-21) représentent les différences entre les différents types de caséines commercialisées [229] et l'action de la coagulation sur leur structure (avec une schématisation de type « structure interne uniforme » de la micelle) et leur organisation d'après Horne et al [230], [231].

Tableau I-14 : Les différents types de caséines commercialisées (caséine présure, caséine acide et caséinate) et leurs propriétés [229]

	<b>Caséine présure</b>	<b>Caséine acide</b>		<b>Caséinate</b>		
<b>Types</b>	Caséine présure	Caséine acide minérale	Caséine acide lactique	Caséinate de sodium	Caséinate de potassium	Caséinate de calcium
<b>Réactif</b>	Chymosine (présure/extrait de présure) Présure microbienne	Acide minéral (chlorhydrique ou sulfurique)	Acide lactique (fermentation naturelle)	Hydroxyde de sodium	Hydroxyde de potassium	Hydroxyde de calcium
<b>Réaction</b>	Caséine + H <sub>2</sub> O => Para-k-caséine (hydrophobe) + Caseinomacropéptide (hydrophile)	H <sub>2</sub> N-Caséine Protéines-COO <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> (pH 6,6) => <sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Caséine Protéines- COO <sup>-</sup> (pH 4,6)		<sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-Caséine Protéines-COO <sup>-</sup> (pH 4,6) => H <sub>2</sub> N-Caséine Protéines-COO <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> (pH 6,6)		
<b>Solubilité</b>	<b>Insoluble</b>	<b>Insoluble</b>		<b>Soluble</b>		
<b>Humidité (%)</b>	<b>11,4</b>	<b>11,4</b>		<b>3,8</b>		
<b>Protéine (%)</b>	<b>79,9</b>	<b>85,4</b>		<b>91,3</b>		
<b>Calcium (%)</b>	<b>2,6 - 3</b>	<b>0,1</b>		<b>0,1</b>	<b>0.1</b>	<b>1.3 – 1.6</b>
<b>pH</b>	<b>7,3 – 7,7</b>	<b>4,6 – 5,4</b>		<b>6,5 - 7,0</b>		
<b>Minéraux (Ca, Phosphate...)</b>	<b>Calcium lié à la protéine</b>	<b>Perdus (solubilisés dans la phase aqueuse)</b>		<b>Perdus en phase aqueuse puis certains retrouvés en fonction du réactif</b>		



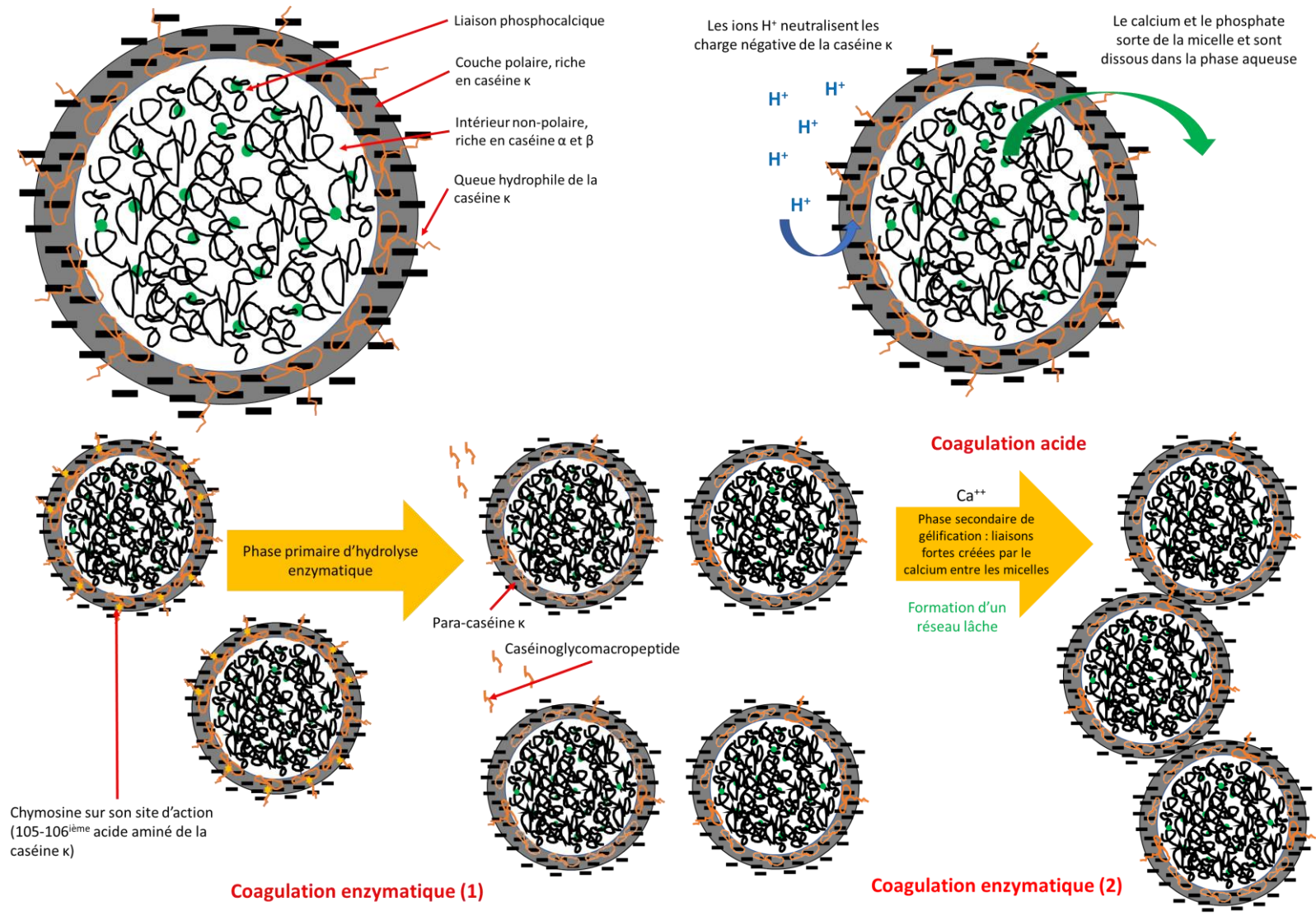
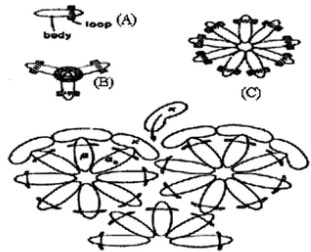


Figure I-21 : Représentation de caséine (sous le modèle en structure interne uniforme) et des mécanismes de coagulation (acide et enzymatique) [230], [231]

Les caséines ont adopté différentes structures et organisations au cours des décennies en fonction de l'avancée des travaux dans le domaine et, leur structure reste à l'heure actuelle assez controversée. On peut regrouper les différentes théories sur la structure des caséines en trois grands groupes de modèles théoriques.

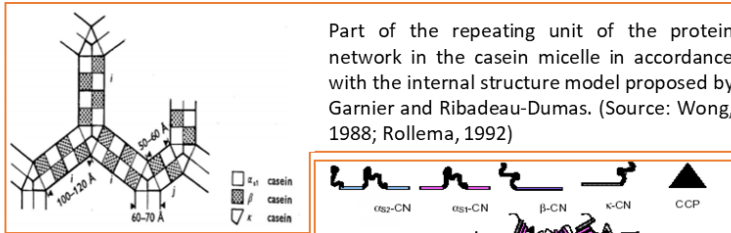
- Le modèle « cœur-enveloppe » de Waugh et al. (1965) qui suppose la présence de complexes de caséines  $\alpha_s$  et  $\beta$  au cœur de la micelle et une caséine  $\kappa$  située en périphérie formant une enveloppe. Une version plus récente a également été proposée par Paquin et ses collaborateurs en 1989 [232], [233]. (Cf Figure I-22, A)
- Le modèle de structure interne uniforme (Garnier et Ribadeau-Dumas, 1970) dans lequel un trimère de caséine  $\kappa$  se lie à 3 chaînes de caséine  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  qui peuvent elles-mêmes s'associer à d'autres caséines  $\kappa$ . Ce modèle de réseau est très poreux et très ouvert car les enzymes peuvent interagir avec l'intérieur de la micelle. De même ici, des modèles plus récents ont été proposés notamment par Holt et Horne en 1998 [230], [234], [235]. (cf Figure I-22, B)
- Le modèle à sous unités dites submicelles proposé par Shimmin et Hill en 1964 et repris par Morr en 1967 et plus récemment par Walstra en 1990. Les submicelles sont comme le modèle micellaire de Waugh mais les submicelles sont reliées entre elles par du phosphate de calcium [236]–[238]. (cf Figure I-22, C)

La Figure I-22 propose un récapitulatif des différents modèles proposés. Les plus récents modèles semblent indiquer la présence de submicelles reliées entre elles par du phosphate de calcium et une présence prépondérante de la caséine  $\kappa$  en périphérie de la micelle.



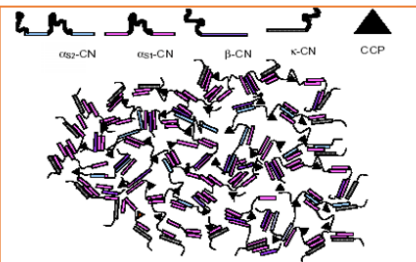
Waugh's proposed model for the casein micelle; (A) Monomer model for  $\alpha_1$ - or  $\beta$ -caseins with charged loop, (B) a tetramer of  $\alpha_1$ -casein monomers, (C) Planar model for a core polymer of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -caseins. (Source: Wong, 1988)

**Modèle  
« cœur-enveloppe »  
A**

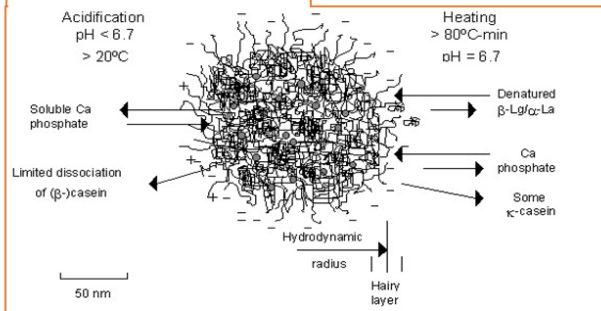


Part of the repeating unit of the protein network in the casein micelle in accordance with the internal structure model proposed by Garnier and Ribadeau-Dumas. (Source: Wong, 1988; Rollema, 1992)

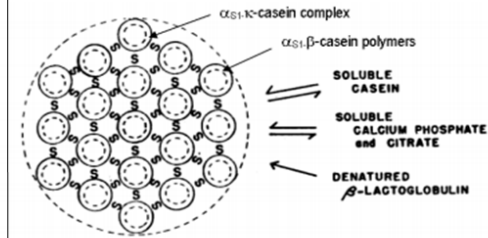
Hairy casein micelle model proposed by Holt, where a tangled web and open structure of polypeptide chains cross-linked by calcium phosphate nanocluster (colloidal calcium phosphate) in the core provides rise to an external region of lower segment density known as the hairy layer. The gray circles represent the calcium phosphate nanoclusters. (Adapted from: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/deicon/casein.html>)



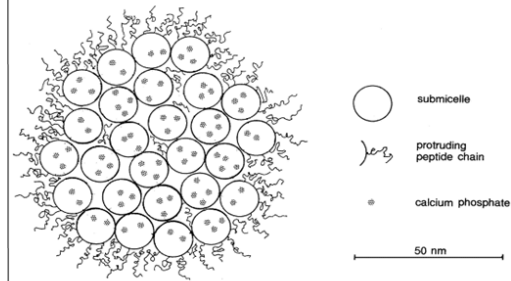
The dual bonding model of casein micelle structure, with  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -casein portrayed as indicated. Bonding appears between the hydrophobic regions, shown as rectangular bars, and by linkage of hydrophilic regions containing phosphoserine clusters to colloidal calcium phosphate clusters. Molecules of  $\kappa$ -casein (K) limit further growth of the structure. (Source: Horne, 1998)



**Modèle de structure interne  
B**



Casein micelle proposed by Morr with associated submicelles of relatively uniform composition of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -casein polymers covered with layers of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -casein complexes. S represents colloidal calcium phosphate linkages. (Adapted from: Songklanakarin, 2005)



The structure of casein micelle in the sub-micelles model showing the protruding C-terminal parts of  $\kappa$ -casein as proposed by Walstra. (Source: Walstra, 1999)

**Modèle à sous-unités  
C**

Figure I-22 : Récapitulatif des différents modèles de structure et d'organisation de la micelle de caséine [230], [231], [233]–[238]

## I.3.2 L'utilisation des caséines

### *I.3.2.1 En tant qu'ingrédient alimentaire*

Les protéines du lait dont notamment les caséines ont d'abord été utilisées pour des applications non alimentaires. En effet, ce n'est que vers les années 1950-1960 que la structure et les propriétés de ces protéines ont été étudiées et ont permis, en sus d'une meilleure qualité hygiénique, le développement d'applications alimentaires des caséines. Les propriétés fonctionnelles des caséines leur confèrent de nombreuses possibilités d'applications en tant qu'auxiliaires technologiques ou substituts d'autres protéines [239]. Dans l'agroalimentaire, les caséines apportent des fonctions assez diverses comme la rétention d'eau (pâtisserie, biscuit, plats cuisinés), une fonction de gélification, et des propriétés filmogènes (dans les viandes et la panification), des propriétés émulsifiantes (produits laitiers, biscuits). Le Tableau I-15 suivant issu de la revue de Southwards permet d'avoir une idée de l'étendue des applications alimentaires des caséines [229].

### *I.3.2.2 En tant que matrice d'un film ou enrobage*

Les films ou enrobages à base de caséine sont utilisés sur différentes matrices alimentaires selon la fonctionnalisation qui a pu leur être apportée lors de leur fabrication. Les films et enrobages à base de caséine peuvent être utilisés pour augmenter la durée de vie des produits de boulangerie, des confiseries au chocolat, pour réduire la perte d'eau des fruits dans des mélanges de céréales mais également des fruits et légumes plus généralement, ou encore des œufs et des poissons congelés ; pour empêcher l'oxydation des lipides dans les poissons ; pour améliorer la stabilité microbienne de nombreuses denrées [240].

En tant que barrière à l'humidité et aux gaz, les films de caséines peuvent étendre la durée de vie des produits alimentaires. Ils peuvent empêcher la perte d'eau des produits frais, réduire les taux de maturation et retarder le brunissement. De nombreuses études ont déjà été menées sur des aliments comme les carottes, les fraises et les pommes [241], [242].

Avena-Bustillos et al. ont étudié l'effet de différentes formulations émulsionnées à base de caséinate de sodium et d'acide stéarique pour la protection des carottes épluchées contre la perte d'eau et le blanchiment [243].

Un plan d'expérience par la méthode des surfaces de réponses leur a permis d'optimiser leur formulation (1,5% de caséinate de calcium et 0,2% d'acide stéarique) pour retarder le phénomène de blanchiment et d'augmenter la résistance à la vapeur d'eau de 80%.

Tableau I-15 : Utilisations et fonctions des caséines en alimentaire [229]

<b>Food category</b>	<b>Casein product</b>	<b>Use level<sup>b</sup></b>	<b>Function</b>
Baked products	Casein, caseinates	1-25%	Nutrition, water binding
Cheese products	Rennet casein, acid casein, caseinates	2-25%	Fat and water binding, texture, matrix formation
Coffee whiteners	Sodium caseinate	1-10%	Fat emulsification
Confectionery	Caseinates (whole and hydrolysed)	1-25%	Texture
Cultured products	Sodium caseinate	2-3%	Fat emulsifier, stabiliser
High fat powders	Sodium caseinate	up to 10%	Fat emulsifier
Ice cream	Sodium caseinate	1-5%	Texture, stabiliser
Infant foods	Whole or hydrolysed casein <sup>a</sup>	1-25%	Nutrition
Instant breakfasts and beverages	Sodium caseinate	2-30%	Nutrition
Meat products	Sodium caseinate	3-20%	Nutrition, fat emulsifier, water binding, texture
Nutritional food bars	Casein, caseinates	10-20%	Nutrition, texture
Pasta and snacks	Casein, caseinates	5-20%	Nutrition, texture
Pharmaceuticals	Casein, caseinates, hydrolysed casein	5-95%	Nutrition
Soups and gravies	Sodium caseinate	5-20%	Nutrition, thickener
Sports drinks	Sodium caseinate	2-10%	Nutrition
Whipped toppings	Sodium caseinate	5-10%	Film former, fat emulsifier, stabiliser, bodying agent

Note<sup>a</sup>: Hydrolysed casein (“hydrolysates”) is derived from whole casein by reacting it in solution with a proteolytic enzyme. Hydrolysates are generally used in nutritional, pharmaceutical or medical applications where the whole protein is not readily digestible.

Note<sup>b</sup>: Typical or estimated values.

Pour chaque application, le film ou enrobage doit être optimisé d’où l’intérêt de comprendre la matière première de départ qu’est la caséine sous ses différentes formes et d’énumérer les différentes approches déjà étudiées pour l’élaboration d’un matériau à base de caséine dans les prochains paragraphes.

### I.3.3 Procédés de fabrication de films

Différentes stratégies permettent de modifier les propriétés du matériau final, les ingrédients peuvent être modifiés avant d'être incorporés au procédé d'élaboration du film (chimiquement, enzymatiquement par exemple), le procédé peut être modifié de différentes manières pour en changer l'impact (chimiquement, conditions du procédé...) et le matériau peut également être modifié en post-traitement (radiation, enrobage, multicouche...).

Avant d'entreprendre l'élaboration d'un biomatériau pour une application spécifique, il est donc important de comprendre les propriétés chimiques du biopolymère, du plastifiant, des additifs et l'impact du procédé de fabrication sur la structure et les propriétés du matériau final [29], [206]. La solubilité dans l'eau, l'éthanol ou à différents pH des ingrédients est essentielle en procédé par voie humide dit « solution casting ». Concernant le thermoformage, ce sont surtout la thermoplasticité des biopolymères, la transition de phase, la transition vitreuse ou la gélatinisation qui doivent être évaluées en aval du procédé [38]. Enfin, la compatibilité chimique des différents plastifiants et additifs doit être déterminée pour évaluer les changements que leur addition impliquera dans la structure du matériau final.

Dans l'optique de débouchés commerciaux pour les films ou enrobages, les systèmes de production envisagés doivent être faisables économiquement et compatibles avec l'industrie de l'emballage actuelle. Pour satisfaire ces contraintes, la composition des matériaux doit être optimisées et les mécanismes de production devront être modifiés en accord avec ces nouvelles formulations [111].

Le schéma suivant de Gontard et al. [244] présente les deux grandes catégories (voie humide ou voie sèche) de transformation des biopolymères qui vont être développées par la suite :

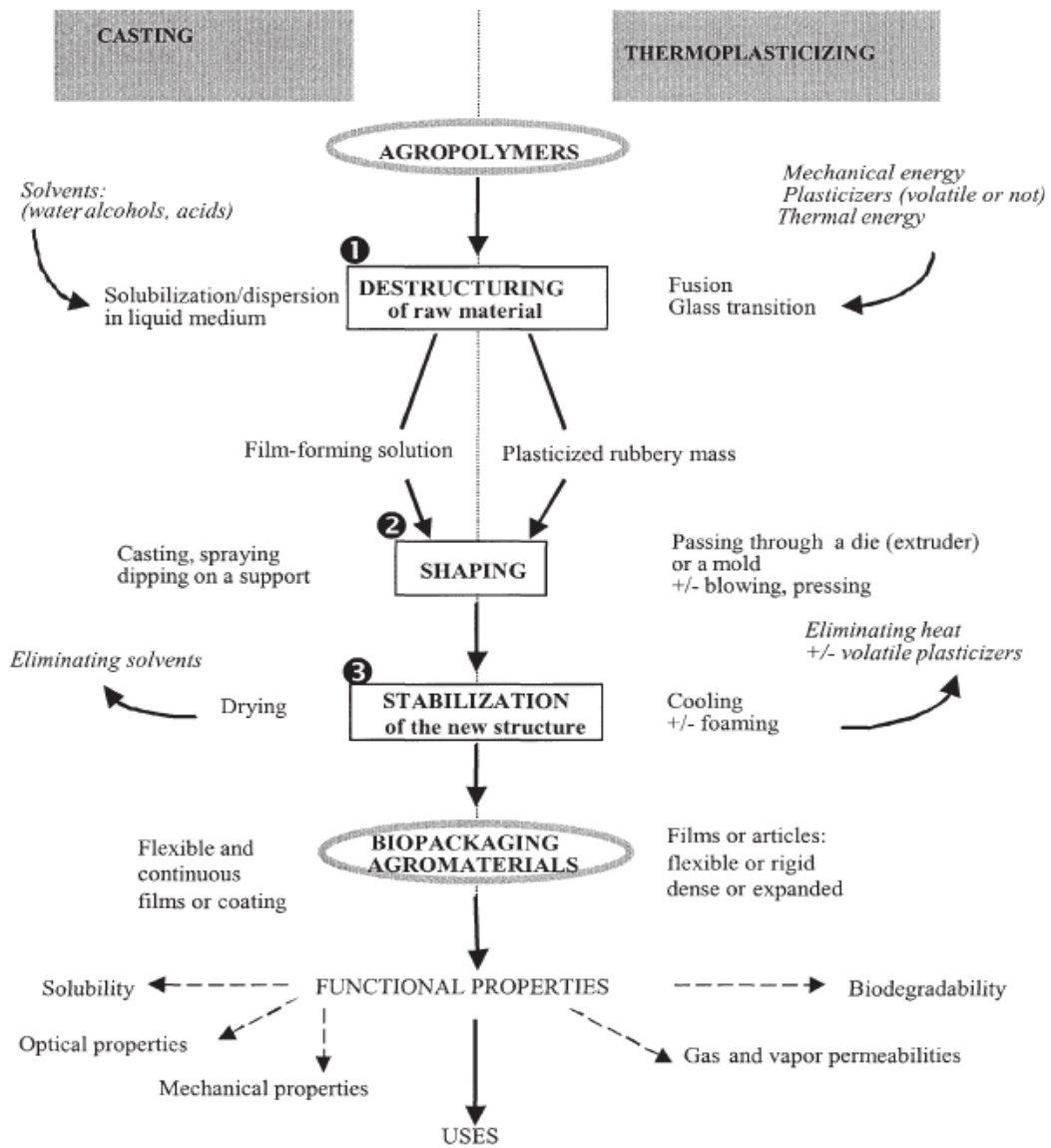


Figure I-23 : Deux approches pour la mise en forme de polymères biosourcés [244]

### *1.3.3.1 Voie humide ou voie solvant : « solution casting »*

Un film correspond à un réseau de polymères avec une structure gélifiée. Les matériaux filmogènes doivent donc former une structure gélifiée réarrangée avec tous les composants de la formulation. Dans le procédé de casting en voie humide, les ingrédients sont mélangés dans une solution aqueuse avec un solvant pour former un réseau gélifié. La solution est souvent dégazée pour qu'il n'y ait pas de bulles d'air résultantes dans le film final. La solution filmogène est ensuite appliquée sur une surface plane à l'aide d'un pulvérisateur, d'un épandeur ou d'un rouleau puis séchée pour éliminer l'excès de solvant et obtenir un film ou bien elle est appliquée directement sur un produit par étalement au pinceau, par pulvérisation ou immersion dans le cas d'un enrobage. Il s'agit donc d'une transition entre la phase polymère dans solvant à la phase solvant dans polymère. Le choix du solvant est très important cependant, dans le cadre des films comestibles ou biodégradables, le choix se limite à l'eau, l'éthanol, certains acides, ou leurs mélanges [245]. Tous les ingrédients doivent être dissous ou du moins dispersés (cas des émulsions) de manière homogène dans le solvant pour l'obtention d'un film homogène. Pour obtenir une structure homogène dans le film et éviter une séparation de phase, différents émulsifiants peuvent être ajoutés [245]. Ce procédé est très utilisé dans la littérature car il est assez aisé à mettre en œuvre pour les composés hydrosolubles comme le sont de nombreux hydrocolloïdes ou moyennant quelques modifications.

Par exemple, les films à base de protéine de lactosérum ou de caséinate de sodium sont produits par déshydratation après chauffage d'un mélange polymère-eau [78], [182].

### *1.3.3.2 Voie sèche*

La seule technique qui permet de transformer en continu un polymère est l'extrusion. La géométrie des produits générés par cette méthode est variée et convient parfaitement pour l'obtention de films fins.

L'extrusion est une méthode de transformation initialement développée sur les polymères issus de la pétrochimie est de plus en plus développée pour des bioplastiques et des composites. Une extrudeuse consiste brièvement à une ou deux vis sans fin placées à l'intérieur d'un fourreau qui peut être régulé en température sur plusieurs zones le long des vis. Durant le temps de résidence du polymère dans l'extrudeuse, celui-ci va subir des forces de cisaillement et de la compression sous hautes températures (dépendant du profil de vis et des températures appliquées). De nombreux paramètres jouent un rôle important en extrusion comme le profil de vis, la vitesse de vis, les températures choisies ainsi que le gradient de cisaillement sur les zones de vis, le débit d'alimentation en matière



première, le type et la quantité de plastifiant et autres additifs, le taux d'humidité et la forme et la taille de la filière. Dans le cadre des protéines, ces paramètres déterminent l'étendue des changements sur la conformation, l'agrégation et la réticulation partielle de celles-ci. Etant donné qu'il s'agit d'un procédé continu, il a l'avantage de permettre une production à haut débit et une bonne uniformité du produit final. Les coûts énergétiques et environnementaux de ce procédé sont également à considérer car contrairement au procédé en batch par voie humide, il n'y a pas besoin de solvant ni de le faire évaporer ce dernier. Pour la transformation des polymères biosourcés, l'ajout de plastifiant (souvent en plus de l'eau qui joue déjà un rôle de plastifiant) est indispensable pour améliorer la mobilité des chaînes de polymères, notamment dans un procédé aussi intense que l'extrusion.

Les propriétés thermoplastiques des biopolymères sont donc très importantes et l'interaction avec les plastifiants l'est tout autant puisque ceux-ci diminuent la température de transition vitreuse [36], [38]. Avec l'ajout de molécules actives ou molécules thermosensibles en générale dans certaines formulations de films, les conditions de procédé doivent être adaptées afin de préserver l'intégrité de ces molécules et leur activité résiduelle [128], [247].

### I.3.4 Histoire des matériaux à base de caséine

La caséine est utilisée depuis le milieu du 19<sup>ième</sup> siècle pour des applications non alimentaires, initialement dans les adhésifs et les peintures à base d'eau. Puis, vers les années 1930, des fibres protéiques artificielles à partir de caséine ont été mises au point ayant des propriétés similaires à la laine. La caséine acide est notamment utilisée dans les adhésifs pour le bois (ex : plywood), pour l'enrobage du papier et du carton, pour les épandeurs en horticulture, comme agent de tannage du cuir, pour les joints de ciment et dans les peintures.

La caséine présure est quant à elle déjà connue comme plastique car elle a été utilisée pour faire des objets tels des boutons de vêtements, des manches de couteaux, des dominos, des pièces de piano. En effet, la caséine présure extraite du lait puis traitée au formol (réticulation) permet d'obtenir une matière plastique (un thermodurcissable) généralement connue sous le nom de Galalithe et découverte par le Français Auguste Trillat en 1893. Sa découverte est ensuite brevetée par l'Allemand Wilhelm Krische et l'Autrichien Adolf Spitteler en 1897 sous le nom de Galalithe [248]. En France, ce produit est commercialisé sous les noms de Galalithe, Lactolithe et Sicalithe ; en Angleterre, on l'appelle Erninoïd et en Amérique : Aladinite, Casolite, Lactite, Améroïd, Gala, Galorn...

Le principe de fabrication de la caséine réticulée au formol est le suivant [249]:

- « La caséine en solution est précipitée par l'addition d'un sel (acétate de plomb, sels de zinc, alun notamment), accompagné d'autres sels métalliques susceptibles d'apporter une coloration (sels de fer, de chrome) ou d'un acide.
- Le produit précipité, essoré sur un tamis, jusqu'à apparence sèche, est soumis à l'action du formol sous forme de vapeur ou solution aqueuse. La durée du traitement est fonction de l'épaisseur de l'objet traité (généralement 1 semaine à 6 mois).
- Présentations possibles :
  - En masse ou feuille moulée. La masse coagulée est incolore, transparente. Elle peut être colorée, chargée ou non de substances minérales.
  - En couche mince pour la protection des surfaces verticales qui deviennent lavables et hydrofuges. »

La plupart des brevets concernant la caséine avant celui de Kirsche et Spitteler n'avaient pas d'applications industrielles à cause des mauvaises propriétés de la matière à base de caséine moulée. La caséine réticulée quant à elle ne permet que la production d'un objet à la forme définitive. La galalithe a une densité de 1,35, elle est inodore, sur le plan chimique, elle résiste aux acides et bases étendues, elle est peu sensible aux solvants mais, elle a tendance à absorber l'eau et est ininflammable [249]. La caséine formolée va connaître un déclin à partir de la première guerre mondiale notamment dû au fait que les biens allemands de la Galalith Gesellschaft en France sont mis sous séquestre et l'Allemagne première productrice de ce matériau ne peut plus se fournir en caséine. Quelques dizaines d'années plus tard, c'est l'émergence des plastiques pétrosourcés qui sont plus performant et moins chers et remplacent complètement la galalithe. En 1930, la production mondiale de matériaux à base de caséine était d'environ 10 000 tonnes. A présent, seuls quelques objets tels des boutons ou des bijoux sont confectionnés à l'aide de caséine formolée. En outre, le formaldéhyde étant un cancérigène connu [250], il a été interdit dans de nombreux pays dont la France depuis 2011 [251].

### I.3.5 Une multitude de films à base de caséine ?

Les films à base de caséine sont transparents et ont des bonnes propriétés barrière aux gaz. Par contre, contrairement à des films à base d'amidon ou synthétiques, les propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau ne sont pas très bonnes. Ainsi, pour améliorer les propriétés des matériaux, différentes solutions ont été étudiées et sont présentées dans les paragraphes suivants. En effet, depuis la découverte de la caséine réticulée, de nombreuses études ont été menées pour comprendre comment les modifications des propriétés microstructurales du matériau (comme l'addition de lipides, de plastifiants et différentes combinaisons de polymères) afin de produire un matériau à base de caséine avec un large éventail de propriétés disponibles. La structure et les différentes propriétés (caractère amphiphile par exemple) font de la caséine une matière première idéale, permettant la production de films transparents et avec une bonne cohésion. L'avantage premier des films à base de caséine reste leur comestibilité et leur biodégradabilité.

Il y a de nombreuses façons d'obtenir des films à base de caséines grâce à différents traitements chimiques, enzymatiques ou physiques appliqués avant, pendant ou post-process comme décrit par le schéma suivant et les paragraphes qui suivent.

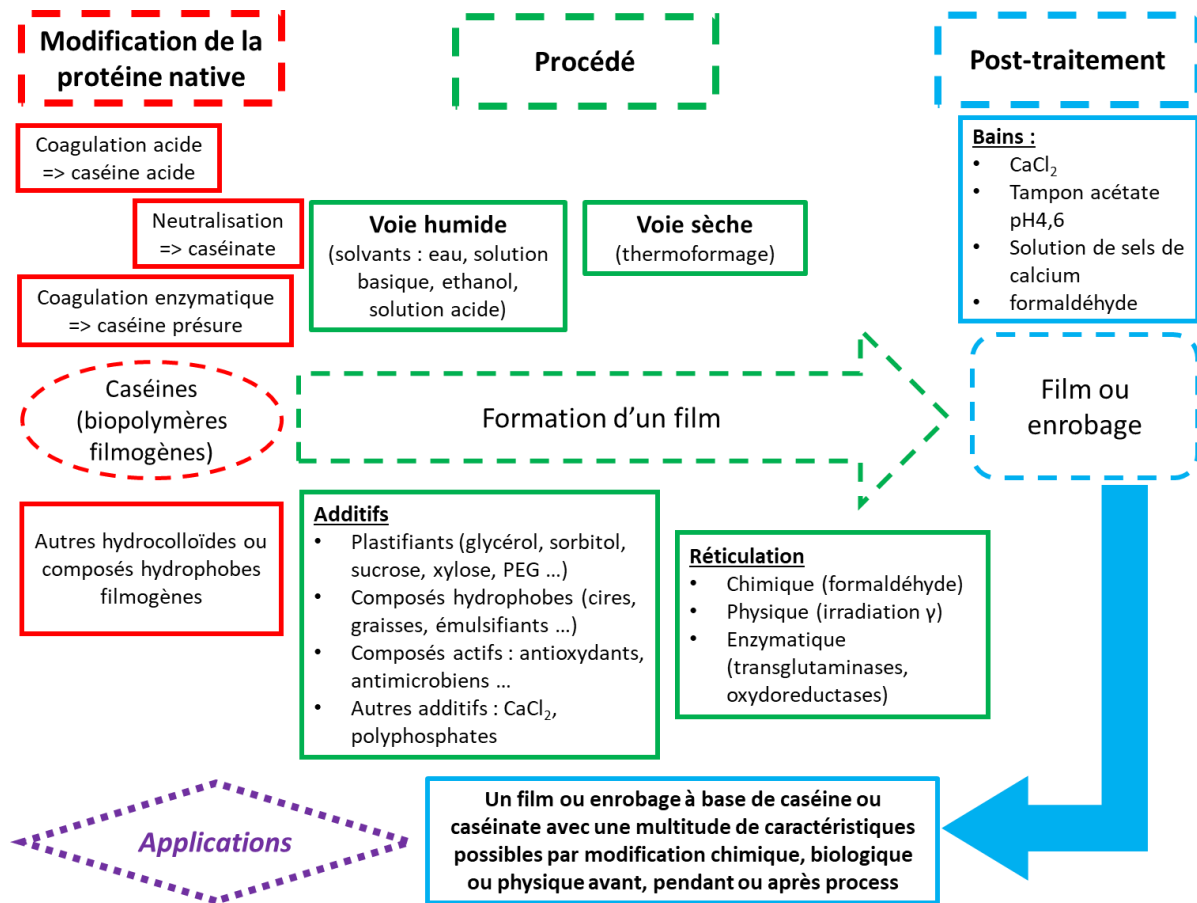


Figure I-24 : Schématisation du potentiel de transformation des caséines

### *I.3.5.1 En modifiant le types de protéines*

Malgré le fait que les caséinates (de sodium, de magnésium, de potassium et de calcium), la caséine acide et la caséine présure proviennent de l'extraction de la même caséine micellaire de départ, elles ont des particularités qui sont retrouvées dans le film final. Comme le montre différentes études comme celle de Ho et al., de Chick et Ustunol et de Banerjee et Chen, la perméabilité à la vapeur d'eau change en fonction du type de caséine utilisée [80], [252], [253]. Il est difficile de comparer toutes ces études entre elles car les conditions expérimentales sont différentes mais il en ressort que la différence de perméabilité apporté par le type de caséine et cette perméabilité évolue également en fonction du reste de la formulation comme l'ajout d'additifs hydrophobes comme l'a montré Avena-Bustillos et Krochta avec l'ajout de cire d'abeille dans des films de caséinate de sodium [241].

La caractéristique la plus remarquable concernant les différents types de caséine est leur degré d'hydrosolubilité. A pH neutre dans de l'eau, les caséinates seront hydrosolubles (même si les caséinates de calcium le seront moins rapidement que les caséinates de sodium par exemple) [254] et par contre, la caséine acide et présure ne le seront pas. Cela intervient fortement dans le type de film (hydrosoluble ou non) qui est visé et de l'application recherchée pour ce film. Des modifications physico-chimiques post-extraction de la caséine peuvent être envisagées afin de réduire ou d'augmenter l'hydrophobicité des différentes caséines. L'ajout de sels de phosphates, de chlorure de calcium ou d'un agent de réticulation sont des techniques couramment utilisées afin de modifier l'hydrosolubilité et la barrière à l'eau de films.

Le type de caséine choisi pour produire un film aura également un impact sur les propriétés mécaniques du film. Banerjee et Chen ont notamment montré qu'un film de caséinate de calcium a une résistance à la traction plus élevée et un allongement plus faible qu'un film de caséinate de sodium, cela étant attribué aux ponts calciques présent dans les caséinates de calcium qui diminue la flexibilité du film [80]. De la même façon, Chick et Ustunol ont rapporté une résistance à la traction plus importante pour la caséine présure que pour la caséine acide [252].

### *1.3.5.2 En mélangeant différents polymères*

Les mélanges de polymères sont de plus en plus courant afin d'obtenir les nouvelles propriétés visées et ainsi combiner le meilleur de chaque polymère si possible. Arvanitoyannis et al. ont mélangé des amidons de blé et de maïs avec des caséinates de sodium [255]. Les polysaccharides sont compatibles avec la protéine pour la formation de films uniformes avec suffisamment de tenue. La protéine dans ce cas permet de diminuer l'humidité et la perméabilité à l'O<sub>2</sub> plus le ratio de protéine augmente par rapport à l'amidon, plus la résistance à la rupture diminue et l'allongement augmente ; quant aux amidons, ils représentent une matière première moins coûteuse.

Chambi et Grosso ont quant à eux testé un mélange de gélatine et de caséine qui leur a permis d'avoir un effet synergique de cette formulation sur l'allongement du film, avec le meilleur allongement constaté pour le ratio caséine : gélatine de 75 : 25 [256].

### *1.3.5.3 En réticulant*

Afin d'améliorer la résistance à l'eau des films de caséine, des liaisons intermoléculaires par réticulation sont envisagées dans le réseau de protéines. La réticulation est déjà présente pour certains types de caséines qui possèdent des cations divalents comme le calcium et permettent la réticulation intermoléculaire et de ce fait renforcent la matrice protéique en limitant la mobilité moléculaire. Plusieurs auteurs ont ainsi pu relier les propriétés barrières à cette présence ou non de forces électrostatiques. Avena-Bustillos et Krochta ou encore Banerjee et Chen ont reporté des valeurs de perméabilité à l'eau plus faibles pour les films de caséinate de calcium que ceux de caséinate de sodium [80], [241]. Avena-Bustillos et Krochta ont également montré qu'un post traitement des films de caséinate de sodium avec du chlorure de calcium à pH 9,6 réduit la perméabilité à l'eau de 42% [241].

D'autres techniques comme la réticulation physique par irradiation ont été testées par Brault, Lacroix et leurs collaborateurs sur des films de caséinate de sodium et de calcium [257], [258]. Les films issus de ces études montrent une meilleure résistance à l'eau (perméabilité à l'eau réduite de 36%) et des propriétés mécaniques améliorées (sauf si surdose d'irradiation). Ces films testés sur des pommes de terre et des pommes ont permis de retarder le brunissement de ces aliments [257]. Vachon et al. ont aussi démontré l'action des traitements thermiques et par irradiation (gamma) pour réticuler les protéines du lait [259]. L'irradiation est plus efficace pour réticuler les caséinates de calcium alors que la chaleur l'est plus sur les protéines de lactosérum, chaque traitement agit donc différemment sur les protéines issues du lait.

D'autres types de réticulation physiques comme par exemple l'irradiation aux rayonnements Ultraviolet (UV) ou des traitements aux ultrasons sur notamment des caséinates de sodium ont permis d'augmenter la résistance des films et de diminuer leur solubilité [260], [261].

L'utilisation d'enzymes est un recours plus naturel pour réticuler les protéines. Juvonen et al. ont ainsi testé 3 enzymes pour la réticulation de caséinate de sodium. La transglutaminase et deux oxydoreductases (*Trametes hirsutalaccase* and *Trichoderma reesei* tyrosinase) ont été testées et deux de ces enzymes, la transglutaminase et *Trichoderma reesei* tyrosinase, ont permis d'augmenter l'insolubilité des films de caséinate de sodium [262].

#### *I.3.5.4 En ajoutant des additifs*

##### *I.3.5.4.1 Les plastifiants*

Les films de caséine et caséinate ont tendance à être plutôt cassant avec un faible allongement. L'amélioration des propriétés du film passe notamment par l'ajout de plastifiant. Plus le ratio protéine : plastifiant(s) diminue, plus le module élastique et la contrainte à la rupture diminuent et plus l'allongement augmente [228], [252]. Si le film contient trop de plastifiant cela n'est pas idéal non plus car le film devient collant et poisseux, voir, observation d'une séparation de phase et les propriétés mécaniques ne peuvent pas être mesurées. L'addition de nombreux polyols en différentes concentrations permet de faire varier les propriétés des films de caséine. Arvanitoyannis et ses collaborateurs ont comparé différents polyols incorporés à des mélanges de caséinate de sodium et d'amidon produit en voie solvant [255], [263]. Avec une augmentation du plastifiant, la transition vitreuse diminue, l'allongement augmente, le module d'élasticité et la tension de rupture diminuent. Les plastifiants étudiés peuvent également être ordonnés selon leur effet plastifiant : glycérol > sorbitol > xylose > sucrose. Ces études ont également montré que pour une matrice donnée, la quantité de plastifiant ne doit pas dépasser un certain seuil critique si l'on veut garder des propriétés barrières aux gaz acceptables et ne pas avoir de séparation de phase. Chick et Ustunol ont également montré que le sorbitol avait moins d'effet plastifiant que le glycérol sur des films de caséinate car la résistance à la tension est plus importante [252].

Cela peut être dû à la nature plus hydrophile du sorbitol qui limite l'affinité des caséinates à lier les molécules d'eau à humidité relative équivalente par rapport à un film plastifié au glycérol ou bien, à la différence de taille des molécules car, le glycérol est une molécule deux fois plus petite que le sorbitol et donc pour une même masse de plastifiant ajoutée, on ajoute deux fois plus de molécules de glycérol que de sorbitol.

#### I.3.5.4.2 Les composés hydrophobes

L'addition de lipides comme des cires, des graisses permet de modifier également les propriétés du film. La perméabilité à l'eau peut notamment être réduite par l'addition de lipides dans la formulation comme l'ont démontré Avena-Bustillos et al. avec l'ajout d'un monoacylglycérol à des caséinates de calcium par création d'une émulsion avant casting par voie solvant [242]. Les composés hydrophobes vont rendre le film translucide (sans eux, les films sont transparents). Le composé hydrophile ajouté joue également sur la texture et la saveur du film.

#### I.3.5.4.3 Les composés antimicrobiens

L'addition de composés antimicrobiens est également très étudiée pour l'amélioration de la qualité et de la durée de vie des denrées alimentaires. Moreira et al. ont élaboré des films composites à partir de caséinate avec du chitosane (par voie solvant) avec des propriétés antimicrobiennes [264]. Ce mélange utilisé comme enrobage sur des carottes, du fromage et du salami a montré une action bactéricide sur la flore mésophile et psychrotrophe et sur les champignons, supérieure à celle des films témoins avec soit que du chitosane, soit que des caséinates.

L'incorporation de bactériocines et même de bactéries lactiques a également été étudiée dans des matrices à base de caséinate. Cao-Hoang et al. ont ajouté de la nisine et Gialamas et al. ont ajouté *Lactobacillus sakei* dans des films de caséinates de sodium pour contrôler le développement de *Listeria* dans des exemples applicatifs comme du fromage et du bœuf frais [265], [266]. Léonard et al. ont quant à eux démontré que des bactéries lactiques (*Lactobacillus paracasei* LAB1 and *Lactococcus lactis* LAB3) peuvent être incorporées à des matrices liquides et des gels à base d'un mélange d'alginate et de caséinate et possèdent une activité anti-*Listeria*[175]. Colak et al ont aussi démontré la possibilité de fabriquer des films antimicrobiens à base de caséinate de sodium par extrusion-gonflage [178]. La nisine et la natamycine testés par ces auteurs ont gardé une activité intéressante dans le film anti-*Listeria innocua* et anti-*Kocuria rhizophila*.



Guilbert et son équipe ont significativement réduit la charge microbienne à la surface de cubes de fruit (abricot et papaye) inoculés avec *Aspergillus niger* ou *Saccharomyces rouxii* grâce à un film de caséinate contenant de l'acide sorbique [267].

#### I.3.5.4.4 Les composés antioxydants

L'ajout de composés antioxydants est également recherché dans le cadre d'application alimentaire pour permettre une meilleure résistance des denrées à l'oxydation. Dans le cadre de ce projet de thèse, la priorité a été mise sur les agents antimicrobiens mais de nombreuses études sont également disponibles concernant les agents antioxydants. Fabra et al. et Jimenez et al. ont, par exemple, réussi à incorporer deux antioxydants (l'acide férulique et l' $\alpha$ -tocopherol) dans des films de caséinate de sodium par voie solvant [268], [269].

#### I.3.5.5 En jouant sur le procédé de fabrication

La plupart des films de caséine que l'on retrouve dans la littérature sont produits par casting en voie solvant. La préparation de film par casting de solutions sur des surfaces planes puis le séchage par évaporation du solvant est une technique appropriée en laboratoire ou pour des productions en batch de petite taille mais, des techniques plus efficaces sont nécessaires au développement industriel des films à base de biopolymères.

Frinault et al. ont développé un procédé dit « wet spinning process » pour préparer des films à base de caséine acide [270]. Ce procédé inclue l'extrusion de solution de caséine acide (17% de contenu en protéine) dans un bain coagulant contenant de l'hydroxyde de sodium puis s'ensuivent une étape de trempage, de rinçage et de séchage. Ce procédé peut être transformé en procédé continu mais n'est autre qu'un passage de caséine acide à caséinate (donc une hydrosolubilité certaine) et des solvants chimiques sont utilisés. Un procédé similaire a d'ailleurs été breveté aux USA en 1997 par Metzger qui annonce un film biodégradable qui peut être utilisé comme boyau comestible de saucisses entre autres [271].

### *I.3.5.6 En utilisant des post-traitements*

Les films à base de caséinates sont souvent testés dans des bains pour diminuer leur hydrosolubilité. Krochta a notamment trempé les films dans un tampon d'acétate de sodium à pH 4,6, ce qui lui a permis de conserver ses films de caséinate de sodium non dissous pendant plus de 24h [272]. Le trempage dans des solutions de sel de calcium permet également de diminuer l'hydrosolubilité des films de caséinate.

Un traitement avec des agents durcissants comme du formaldéhyde permet de produire des films insolubles comme l'a prouvé la Galalithe historiquement ou encore Frinault et al. mais, cela rend le film non comestible [270].

La réticulation évoquée précédemment et développée sur des films de caséinates par irradiation peut être appliquée en post traitement des films pour diminuer leur solubilité. Brault et al. ont montré que des films de caséinates de calcium et de sodium irradiés à 4 et 12 kGy ne se dissolvent pas dans l'eau [257]. L'insolubilité des films augmente avec l'augmentation des doses d'irradiation jusqu'à 72 kGy où 70% du film de caséinate reste insoluble après 30 minutes dans de l'eau bouillante puis 24h dans l'eau à température ambiante [258].

## I.4 Références bibliographiques

- [1] Arrêté du 8 septembre 1983 Marquage obligatoire de certains fromages. 1983.
- [2] Arrêté du 28 novembre 2007 modifiant l'arrêté du 8 septembre 1983 relatif au marquage obligatoire de certains fromages. 2007.
- [3] Décret n°82-257 du 18 mars 1982 portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en matière de produits ou de services et rendant obligatoire le marquage de certains fromages (Version consolidée au 07 juillet 2017). 1982.
- [4] Règlement (CE) N° 510/2006 du conseil du 20 mars 2006 relatif à la protection des indications géographiques et des appellations d'origine des produits agricoles et des denrées alimentaires. 2006.
- [5] Règlement (CE) N° 1027/2009 de la commission du 29 octobre 2009 approuvant des modifications mineures du cahier de charges d'une dénomination enregistrée dans le registre des appellations d'origine protégées et des indications géographiques protégées [Morbier (AOP)]. 2009.
- [6] Règlement (CE) N° 828/2003 de la commission du 14 mai 2003 modifiant des éléments du cahier des charges de seize dénominations figurant à l'annexe du règlement (CE) no 1107/96 relatif à l'enregistrement des indications géographiques et des appellations d'origine au titre de la procédure prévue à l'article 17 du règlement (CEE) no 2081/92 du Conseil relatif à la protection des indications géographiques et des appellations d'origine des produits agricoles et des denrées alimentaires (Danablu, Monti Iblei, Lesbos, Beaufort, Salers, Reblochon ou Reblochon de Savoie, Laguiole, Mont d'Or ou Vacherin du Haut-Doubs, Comté, Roquefort, Époisses de Bourgogne, Brocciu corse ou Brocciu, Sainte-Maure de Touraine, Ossau-Iraty, dinde de Bresse, huile essentielle de lavande de Haute-Provence). 2003.
- [7] Règlement d'exécution N° 584/2011 de la commission du 17 juin 2011 approuvant des modifications non mineures du cahier des charges d'une dénomination enregistrée dans le registre des appellations d'origine protégées et des indications géographiques protégées [Grana Padano (AOP)]. 2011.
- [8] Règlement d'exécution (UE) N° 129/2012 de la commission du 13 février 2012 approuvant des modifications mineures du cahier des charges d'une dénomination enregistrée dans le registre des appellations d'origine protégées et des indications géographiques protégées [Queso Manchego (AOP)]. 2012.

- [9] Règlement d'exécution (UE) N° 562/2013 de la commission du 14 juin 2013 approuvant une modification mineure du cahier de charges d'une dénomination enregistrée dans le registre des appellations d'origine protégées et des indications géographiques protégées [Queijo Serra da Estrela (AOP)]. 2013.
- [10] Bouton, Guyot, and Grappin, "Preliminary characterization of microflora of Comté cheese," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 85, no. 1, pp. 123–131, Jul. 1998.
- [11] Y. Bouton, P. Guyot, and A. Dasen, "Influence des interactions entre le lait et le levain lactique sur l'affinage et la qualité du fromage comté," *Int. Dairy J.*, vol. 6, no. 10, pp. 997–1013, Oct. 1996.
- [12] Nathalie Jarroux, "Techniques de l'ingénieur: Les biopolymères: différentes familles, propriétés et applications." 10-Oct-2008.
- [13] A. F. Sousa, M. Matos, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, and J. F. J. Coelho, "New copolyesters derived from terephthalic and 2,5-furandicarboxylic acids: A step forward in the development of biobased polyesters," *Polymer*, vol. 54, no. 2, pp. 513–519, Jan. 2013.
- [14] E. Chiellini, A. Corti, S. D'Antone, and R. Baciù, "Oxo-biodegradable carbon backbone polymers – Oxidative degradation of polyethylene under accelerated test conditions," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 91, no. 11, pp. 2739–2747, Nov. 2006.
- [15] A. Ammala *et al.*, "An overview of degradable and biodegradable polyolefins," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 8, pp. 1015–1049, Aug. 2011.
- [16] Castelan Guy, "Polymères biodégradables," *Techniques de l'ingénieur*. 05-Oct-2010.
- [17] "european-bioplastics," 06-Jun-2017. [Online]. Available: <http://www.european-bioplastics.org>.
- [18] PlasticsEurope (PEMRG) / Consultic / myCeppi, "Plastics - The Facts 2016 An analysis of European plastics productid waste data." 2016.
- [19] T. A. Hottle, M. M. Bilec, and A. E. Landis, "Sustainability assessments of bio-based polymers," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 98, no. 9, pp. 1898–1907, Sep. 2013.
- [20] M. Weiss *et al.*, "A Review of the Environmental Impacts of Biobased Materials," *J. Ind. Ecol.*, vol. 16, pp. S169–S181, Apr. 2012.
- [21] J. M. Krochta and C. De Mulder-Johnston, "Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities," *Food Technol. USA*, 1997.
- [22] "EUR-Lex - 31990L0128 - FR," *Journal officiel n° L 075 du 21/03/1990 p. 0019 - 0040*.
- [23] ADEME, "Matériaux polymères biodégradables et applications." 26-Jun-2006.

- [24] F. Debeaufort and A. Voilley, "Lipid-Based Edible Films and Coatings," in *Edible Films and Coatings for Food Applications*, K. C. Huber and M. E. Embuscado, Eds. Springer New York, 2009, pp. 135–168.
- [25] Y. Wu, C. L. Weller, F. Hamouz, S. L. Cuppett, and M. Schnepf, "Development and application of multicomponent edible coatings and films: A review," vol. 44, B.-A. in F. and N. Research, Ed. Academic Press, 2002, pp. 347–394.
- [26] M. R. Nanda, M. Misra, and A. K. Mohanty, "Performance Evaluation of Biofibers and Their Hybrids as Reinforcements in Bioplastic Composites," *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 298, no. 7, pp. 779–788, Jul. 2013.
- [27] E. A. Baldwin, R. Hagenmaier, J. Bai, and J. M. Krochta, *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. CRC Press, 1994.
- [28] E. A. Baldwin, M. O. Nisperos-Carriedo, and R. A. Baker, "Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 35, no. 6, pp. 509–524, Nov. 1995.
- [29] J. Han, "Protein- Based Edible Films And Coatings Carrying Antimicrobial Agents," in *Protein-Based Films and Coatings*, 0 vols., CRC Press, 2002.
- [30] L. R. Howard and A. R. Gonzalez, "Food Safety and Produce Operations: What Is the Future?," *HortScience*, vol. 36, no. 1, pp. 33–39, Feb. 2001.
- [31] Debeaufort, J. A. Quezada-Gallo, and A. Voilley, "Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. USA*, 1998.
- [32] J. R. Vinson and R. L. Sierakowski, *The behavior of structures composed of composite materials*, 2nd ed. Dordrecht ; Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [33] B. S. Mitchell, *An introduction to materials engineering and science for chemical and materials engineers*. Hoboken, NJ: John Wiley, 2004.
- [34] M. A. Del Nobile, A. Conte, G. G. Buonocore, A. L. Incoronato, A. Massaro, and O. Panza, "Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers," *J. Food Eng.*, vol. 93, no. 1, pp. 1–6, Jul. 2009.
- [35] M. G. A. Vieira, M. A. da Silva, L. O. dos Santos, and M. M. Beppu, "Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review," *Eur. Polym. J.*, vol. 47, no. 3, pp. 254–263, Mar. 2011.
- [36] John M. Krochta, "Proteins as Raw Materials for Films and Coatings," in *Protein-Based Films and Coatings*, CRC Press, 2002.

- [37] J. D. Henshall, "Foods and packaging materials — Chemical interactions: edited by Paul Ackermann, Margaretha Jägerstad and Thomas Ohlsson, The Royal Society of Chemistry, 1995. ISBN 0 85404 720 4," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 12, p. 424, Dec. 1995.
- [38] S. Guilbert, B. Cuq, and N. Gontard, "Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials," *Food Addit. Contam.*, vol. 14, no. 6–7, pp. 741–751, Oct. 1997.
- [39] R. Sothornvit and J. M. Krochta, "Plasticizer effect on oxygen permeability of beta-lactoglobulin films," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 12, pp. 6298–6302, Dec. 2000.
- [40] R. Sothornvit and J. M. Krochta, "Plasticizer effect on mechanical properties of  $\beta$ -lactoglobulin films," *J. Food Eng.*, vol. 50, no. 3, pp. 149–155, Nov. 2001.
- [41] V. Morillon, F. Debeaufort, G. Blond, M. Capelle, and A. Voilley, "Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 42, no. 1, pp. 67–89, Jan. 2002.
- [42] T. H. Shellhammer and J. M. Krochta, "Whey Protein Emulsion Film Performance as Affected by Lipid Type and Amount," *J. Food Sci.*, vol. 62, no. 2, pp. 390–394, Mar. 1997.
- [43] J. J. Kester and O. Fennema, "An Edible Film of Lipids and Cellulose Ethers: Barrier Properties to Moisture Vapor Transmission and Structural Evaluation," *J. Food Sci.*, vol. 54, no. 6, pp. 1383–1389, Nov. 1989.
- [44] D. Boyacı, F. Korel, and A. Yemenicioğlu, "Development of activate-at-home-type edible antimicrobial films: An example pH-triggering mechanism formed for smoked salmon slices using lysozyme in whey protein films," *Food Hydrocoll.*, vol. 60, pp. 170–178, Oct. 2016.
- [45] D. Kowalczyk, "Biopolymer/candelilla wax emulsion films as carriers of ascorbic acid – A comparative study," *Food Hydrocoll.*, vol. 52, pp. 543–553, Jan. 2016.
- [46] D. Kowalczyk and M. Biendl, "Physicochemical and antioxidant properties of biopolymer/candelilla wax emulsion films containing hop extract – A comparative study," *Food Hydrocoll.*, vol. 60, pp. 384–392, Oct. 2016.
- [47] S. Singh, P. Khemariya, A. Rai, A. C. Rai, T. K. Koley, and B. Singh, "Carnauba wax-based edible coating enhances shelf-life and retain quality of eggplant (*Solanum melongena*) fruits," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 74, pp. 420–426, Dec. 2016.

- [48] C. Fagundes and L. Palou, “Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce alternaria black spot and maintain postharvest quality of cold-stored cherry tomatoes,” *Sci. Hortic.*, vol. 193, pp. 249–257, Sep. 2015.
- [49] M. A. De León-Zapata, A. Sáenz-Galindo, R. Rojas-Molina, R. Rodríguez-Herrera, D. Jasso-Cantú, and C. N. Aguilar, “Edible candelilla wax coating with fermented extract of tarbush improves the shelf life and quality of apples,” *Food Packag. Shelf Life*, vol. 3, pp. 70–75, Mar. 2015.
- [50] M. Chiumarelli and M. D. Hubinger, “Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid,” *Food Hydrocoll.*, vol. 38, pp. 20–27, Jul. 2014.
- [51] W.-S. Jo, H.-Y. Song, N.-B. Song, J.-H. Lee, S. C. Min, and K. B. Song, “Quality and microbial safety of ‘Fuji’ apples coated with carnauba-shellac wax containing lemongrass oil,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 55, no. 2, pp. 490–497, Mar. 2014.
- [52] D. C. Rodrigues, C. A. Caceres, H. L. Ribeiro, R. F. A. de Abreu, A. P. Cunha, and H. M. C. Azeredo, “Influence of cassava starch and carnauba wax on physical properties of cashew tree gum-based films,” *Food Hydrocoll.*, vol. 38, pp. 147–151, Jul. 2014.
- [53] D. Muscat, R. Adhikari, S. McKnight, Q. Guo, and B. Adhikari, “The physicochemical characteristics and hydrophobicity of high amylose starch–glycerol films in the presence of three natural waxes,” *J. Food Eng.*, vol. 119, no. 2, pp. 205–219, Nov. 2013.
- [54] I. Arcan and A. Yemenicioğlu, “Development of flexible zein–wax composite and zein–fatty acid blend films for controlled release of lysozyme,” *Food Res. Int.*, vol. 51, no. 1, pp. 208–216, Apr. 2013.
- [55] O. W. Guirguis, M. F. H. Abd Elkader, and A. A. Nasrat, “Enhancing antimicrobial activity for chitosan by adding Jojoba liquid wax,” *Mater. Lett.*, vol. 93, pp. 353–355, Feb. 2013.
- [56] M. Chiumarelli and M. D. Hubinger, “Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch – Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples,” *Food Hydrocoll.*, vol. 28, no. 1, pp. 59–67, Jul. 2012.
- [57] F. F. Shih, K. W. Daigle, and E. T. Champagne, “Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films,” *Food Chem.*, vol. 127, no. 1, pp. 118–121, Jul. 2011.

- [58] D. Alkan *et al.*, “Development of Flexible Antimicrobial Packaging Materials against *Campylobacter jejuni* by Incorporation of Gallic Acid into Zein-Based Films,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 20, pp. 11003–11010, Oct. 2011.
- [59] A. Tyburcy and D. Kozyra, “Effects of composite surface coating and pre-drying on the properties of kabanosy dry sausage,” *Meat Sci.*, vol. 86, no. 2, pp. 405–410, Oct. 2010.
- [60] M. L. Navarro-Tarazaga, M. A. Del Río, J. M. Krochta, and M. B. Pérez-Gago, “Fatty acid effect on hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible film properties and postharvest quality of coated ‘Ortanique’ mandarins,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 22, pp. 10689–10696, Nov. 2008.
- [61] N. Maftoonazad, H. S. Ramaswamy, M. Moalemiyan, and A. C. Kushalappa, “Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 68, no. 2, pp. 341–349, Mar. 2007.
- [62] J. H. Han, G. H. Seo, I. M. Park, G. N. Kim, and D. S. Lee, “Physical and Mechanical Properties of Pea Starch Edible Films Containing Beeswax Emulsions,” *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 6, pp. E290–E296, Aug. 2006.
- [63] M. B. Perez-Gago, M. Serra, M. Alonso, M. Mateos, and M. A. del Rio, “Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 36, no. 1, pp. 77–85, Apr. 2005.
- [64] P. Talens and J. M. Krochta, “Plasticizing Effects of Beeswax and Carnauba Wax on Tensile and Water Vapor Permeability Properties of Whey Protein Films,” *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 3, pp. E239–E243, Apr. 2005.
- [65] E. Bosquez-Molina, I. Guerrero-Legarreta, and E. J. Vernon-Carter, “Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum–candelilla wax based edible emulsion coatings,” *Food Res. Int.*, vol. 36, no. 9–10, pp. 885–893, 2003.
- [66] J. H. Jagannath, C. Nanjappa, D. K. Das Gupta, and A. S. Bawa, “Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 88, no. 1, pp. 64–71, Apr. 2003.
- [67] J. Chick and R. j. Hernandez, “Physical, Thermal, and Barrier Characterization of Casein-Wax-Based Edible Films,” *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 3, pp. 1073–1079, Apr. 2002.



- [68] S.-J. Kim and Z. Ustunol, "Solubility and Moisture Sorption Isotherms of Whey-Protein-Based Edible Films as Influenced by Lipid and Plasticizer Incorporation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 9, pp. 4388–4391, Sep. 2001.
- [69] R. J. Avena-Bustillos, L. A. Cisneros-Zevallos, J. M. Krochta, and M. E. Saltveit, "Application of casein-lipid edible film emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 4, no. 4, pp. 319–329, Sep. 1994.
- [70] N. Gontard, C. Ducheze, J. Cuq, and S. Guilbert, "Edible Composite Films of Wheat Gluten and Lipids - Water-Vapor Permeability and Other Physical-Properties," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 29, no. 1, pp. 39–50, Feb. 1994.
- [71] I. Greener Donhowe and O. Fennema, "Edible Films and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions, and Testing Methods," in *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, CRC Press, 1994.
- [72] C. L. Weller, A. Gennadios, and R. A. Saraiva, "Edible Bilayer Films from Zein and Grain Sorghum Wax or Carnauba Wax," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 31, no. 3, pp. 279–285, Apr. 1998.
- [73] E. Velickova, E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, V. D. Alves, and M. Moldão-Martins, "Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 2, pp. 80–92, Jul. 2013.
- [74] T. Janjarasskul, D. J. Rauch, K. L. McCarthy, and J. M. Krochta, "Barrier and tensile properties of whey protein–candelilla wax film/sheet," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 56, no. 2, pp. 377–382, May 2014.
- [75] R. Sothornvit, C. w. Olsen, T. h. McHugh, and J. m. Krochta, "Formation Conditions, Water-vapor Permeability, and Solubility of Compression-molded Whey Protein Films," *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 6, pp. 1985–1999, Aug. 2003.
- [76] J. Gomez-Estaca, R. Gavara, R. Catala, and P. Hernandez-Munoz, "The Potential of Proteins for Producing Food Packaging Materials: A Review," *Packag. Technol. Sci.*, vol. 29, no. 4–5, pp. 203–224, May 2016.
- [77] S. Guilbert and N. Gontard, "16 - Agro-polymers for edible and biodegradable films: Review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics," in *Innovations in Food Packaging*, London: Academic Press, 2005, pp. 263–276.
- [78] B. Y. Colak, F. Gouanve, P. Degraeve, E. Espuche, and F. Prochazka, "Study of the influences of film processing conditions and glycerol amount on the water sorption

- and gas barrier properties of novel sodium caseinate films,” *J. Membr. Sci.*, vol. 478, pp. 1–11, Mar. 2015.
- [79] S. Guilbert, N. Gontard, and L. G. M. Gorris, “Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 29, no. 1–2, pp. 10–17, Jan. 1996.
- [80] R. Banerjee and H. Chen, “Functional Properties of Edible Films Using Whey Protein Concentrate,” *J. Dairy Sci.*, vol. 78, no. 8, pp. 1673–1683, Aug. 1995.
- [81] A. Gennadios, *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press, 2002.
- [82] M. Li *et al.*, “Extrusion processing and characterization of edible starch films with different amylose contents,” *J. Food Eng.*, vol. 106, no. 1, pp. 95–101, Sep. 2011.
- [83] S. Damodaran, *Food Proteins and Their Applications*. CRC Press, 1997.
- [84] J. I. Maté and J. M. Krochta, “Oxygen uptake model for uncoated and coated peanuts,” *J. Food Eng.*, vol. 35, no. 3, pp. 299–312, Feb. 1998.
- [85] Y. Wang and G. W. Padua, “Tensile Properties of Extruded Zein Sheets and Extrusion Blown Films,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 288, no. 11, pp. 886–893, Nov. 2003.
- [86] A. Rouilly, A. Mériaux, C. Geneau, F. Silvestre, and L. Rigal, “Film extrusion of sunflower protein isolate,” *Polym. Eng. Sci.*, vol. 46, no. 11, pp. 1635–1640, Nov. 2006.
- [87] V. M. Hernandez-Izquierdo, D. S. Reid, T. H. McHugh, J. De J. Berrios, and J. M. Krochta, “Thermal Transitions and Extrusion of Glycerol-Plasticized Whey Protein Mixtures,” *J. Food Sci.*, vol. 73, no. 4, pp. E169–E175, May 2008.
- [88] V. M. Azevedo *et al.*, “Effect of replacement of corn starch by whey protein isolate in biodegradable film blends obtained by extrusion,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 971–980, Feb. 2017.
- [89] I. Belyamani, F. Prochazka, and G. Assezat, “Production and characterization of sodium caseinate edible films made by blown-film extrusion,” *J. Food Eng.*, vol. 121, pp. 39–47, Jan. 2014.
- [90] N. H. Ullsten, M. Gällstedt, E. Johansson, A. Gräslund, and M. S. Hedenqvist, “Enlarged processing window of plasticized wheat gluten using salicylic acid,” *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 3, pp. 771–776, Mar. 2006.
- [91] N. H. Ullsten, S.-W. Cho, G. Spencer, M. Gällstedt, E. Johansson, and M. S. Hedenqvist, “Properties of extruded vital wheat gluten sheets with sodium hydroxide and salicylic acid,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 3, pp. 479–488, Mar. 2009.

- [92] H. Türe, M. Gällstedt, R. Kuktaite, E. Johansson, and M. S. Hedenqvist, “Protein network structure and properties of wheat gluten extrudates using a novel solvent-free approach with urea as a combined denaturant and plasticiser,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 19, pp. 9416–9423, Sep. 2011.
- [93] J. R. Barone, W. F. Schmidt, and C. F. E. Liebner, “Thermally processed keratin films,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 97, no. 4, pp. 1644–1651, Aug. 2005.
- [94] J. Zhang, P. Mungara, and J. Jane, “Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets,” *Polymer*, vol. 42, no. 6, pp. 2569–2578, Mar. 2001.
- [95] J. W. Park, W. S. Whiteside, and S. Y. Cho, “Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films,” *Lwt-Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 4, pp. 692–700, 2008.
- [96] M. Krishna, C. I. Nindo, and S. C. Min, “Development of fish gelatin edible films using extrusion and compression molding,” *J. Food Eng.*, vol. 108, no. 2, pp. 337–344, Jan. 2012.
- [97] Z. A. N. Hanani, J. McNamara, Y. H. Roos, and J. P. Kerry, “Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin-based composite films,” *Food Hydrocoll.*, vol. 31, no. 2, pp. 264–269, Jun. 2013.
- [98] C. Andreuccetti, R. A. Carvalho, T. Galicia-Garcia, F. Martinez-Bustos, R. Gonzalez-Nunez, and C. R. F. Grosso, “Functional properties of gelatin-based films containing *Yucca schidigera* extract produced via casting, extrusion and blown extrusion processes: A preliminary study,” *J. Food Eng.*, vol. 113, no. 1, pp. 33–40, Nov. 2012.
- [99] B. Thumthanaruk, U. Rodsuwan, P. Chancharern, O. Kerdchoechuen, N. Laohakunjit, and G. W. Chism, “Physico-Chemical Properties of Extruded Copolymer Film,” *J. Food Process. Preserv.*, vol. 41, no. 2, p. UNSP e12808, Apr. 2017.
- [100] D. Róz *et al.*, “Water Susceptibility and Mechanical Properties of Thermoplastic Starch–Pectin Blends Reactively Extruded with Edible Citric Acid,” *Mater. Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 138–142, Feb. 2016.
- [101] W. Rodriguez-Castellanos, F. Martinez-Bustos, D. Rodrigue, and M. Trujillo-Barragan, “Extrusion blow molding of a starch-gelatin polymer matrix reinforced with cellulose,” *Eur. Polym. J.*, vol. 73, pp. 335–343, Dec. 2015.
- [102] F. M. Pelissari, F. Yamashita, M. A. Garcia, M. N. Martino, N. E. Zaritzky, and M. V. E. Grossmann, “Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films,” *J. Food Eng.*, vol. 108, no. 2, pp. 262–267, Jan. 2012.

- [103] Y. Zhang, X. Yuan, M. R. Thompson, and Q. Liu, "Characterization of extruded film based on thermoplastic potato flour," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 125, no. 4, pp. 3250–3258, Aug. 2012.
- [104] S. K. Flores and D. Costa, "Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 1, pp. 196–202, Jan. 2010.
- [105] Q. Yan, H. Hou, P. Guo, and H. Dong, "Effects of extrusion and glycerol content on properties of oxidized and acetylated corn starch-based films," *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 1, pp. 707–712, Jan. 2012.
- [106] H. A. Pushpadass, D. B. Marx, R. L. Wehling, and M. A. Hanna, "Extrusion and Characterization of Starch Films," *Cereal Chem.*, vol. 86, no. 1, pp. 44–51, Feb. 2009.
- [107] M. Das, A. K. Banthia, and S. Bal, "Tensile stress and elongation properties of edible plastics from starch," *Indian J. Chem. Technol.*, vol. 5, no. 4, pp. 209–212, Jul. 1998.
- [108] J. H. Han and G. Aristippos, "15 - Edible films and coatings: a review," in *Innovations in Food Packaging*, London: Academic Press, 2005, pp. 239–262.
- [109] F. Debeaufort, J.-A. Quezada-Gallo, and A. Voilley, "Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 38, no. 4, pp. 299–313, May 1998.
- [110] A. Gennadios, S. Park, Z. Ju, and N. Hettiarachchy, "Formation And Properties Of Soy Protein Films And Coatings," in *Protein-Based Films and Coatings*, 0 vols., CRC Press, 2002.
- [111] K. Petersen *et al.*, "Potential of biobased materials for food packaging," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 2, pp. 52–68, Feb. 1999.
- [112] K. Wang *et al.*, "Mechanical properties and solubility in water of corn starch-collagen composite films: Effect of starch type and concentrations," *Food Chem.*, vol. 216, pp. 209–216, Feb. 2017.
- [113] K. Batpho, W. Boonsupthip, and C. Rachtanapun, "Antimicrobial activity of collagen casing impregnated with nisin against foodborne microorganisms associated with ready-to-eat sausage," *Food Control*, vol. 73, Part B, pp. 1342–1352, Mar. 2017.
- [114] B. Lin, Y. Du, X. Liang, X. Wang, X. Wang, and J. Yang, "Effect of chitosan coating on respiratory behavior and quality of stored litchi under ambient temperature," *J. Food Eng.*, vol. 102, no. 1, pp. 94–99, Jan. 2011.
- [115] H. J. Park, "Development of advanced edible coatings for fruits," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 8, pp. 254–260, Aug. 1999.

- [116] K. S. Miller and J. M. Krochta, "Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 8, no. 7, pp. 228–237, Jul. 1997.
- [117] P. Talens, R. Pérez-Masía, M. J. Fabra, M. Vargas, and A. Chiralt, "Application of edible coatings to partially dehydrated pineapple for use in fruit–cereal products," *J. Food Eng.*, vol. 112, no. 1–2, pp. 86–93, Sep. 2012.
- [118] S. R. B. Kim, Y.-G. Choi, J.-Y. Kim, and S.-T. Lim, "Improvement of water solubility and humidity stability of tapioca starch film by incorporating various gums," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 64, no. 1, pp. 475–482, Nov. 2015.
- [119] S. Albert and G. S. Mittal, "Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product," *Food Res. Int.*, vol. 35, no. 5, pp. 445–458, 2002.
- [120] M. A. Garcia, C. Ferrero, N. Bértola, M. Martino, and N. Zaritzky, "Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 3, no. 4, pp. 391–397, Dec. 2002.
- Torres, J. A., Motoki, M., & Karel, M. (1985). Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces I. Control of surface preservative concentration. *Journal of Food Processing and Preservation*, 9(2), 75–92. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1985.tb00711.x>
- [122] A. C. Seydim and G. Sarikus, "Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils," *Food Res. Int.*, vol. 39, no. 5, pp. 639–644, Jun. 2006.
- [123] C. B. Amara, N. Eghbal, N. Oulahal, P. Degraeve, and A. Gharsallaoui, "Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films," *Food Res. Int.*, vol. 89, Part 1, pp. 272–280, Nov. 2016.
- [124] P. J. P. Espitia, W.-X. Du, R. de J. Avena-Bustillos, N. de F. F. Soares, and T. H. McHugh, "Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review," *Food Hydrocoll.*, vol. 35, pp. 287–296, Mar. 2014.
- [125] J. Odila Pereira, J. Soares, S. Sousa, A. R. Madureira, A. Gomes, and M. Pintado, "Edible films as carrier for lactic acid bacteria," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 543–550, Nov. 2016.
- [126] J. Bonilla and P. J. A. Sobral, "Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts," *Food Biosci.*, vol. 16, pp. 17–25, Dec. 2016.
- [127] P. Appendini and J. H. Hotchkiss, "Review of antimicrobial food packaging," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 3, no. 2, pp. 113–126, Jun. 2002.

- [128] B. Y. Colak *et al.*, “Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 72, pp. 142–151, Oct. 2015.
- [129] B. Cuq, N. Gontard, and S. Guilbert, “Edible films and coatings as active layers,” in *Active Food Packaging*, M. L. Rooney, Ed. Springer US, 1995, pp. 111–142.
- [130] A. Gennadios and C. I. Weller, “Edible films and coatings from wheat and corn proteins.,” *Food Technol.*, 1990.
- [131] S. Guilbert, “Technology and application of edible protective films.,” in *Food Packaging and Preservation: Theory and Practice*, Elsevier Applied Science Publishers, 1986, pp. 371–394.
- [132] O. R. Fennema, Ed., *Food chemistry*, 3. ed. New York: Dekker, 1996.
- [133] J. M. Krochta, “Control of mass transfer in foods with edible-coatings and films,” in *Advances in food engineering*, Boca Raton: CRC Press, 1992, pp. 517–538.
- [134] C. Nerín, “16 - Antioxidant active food packaging and antioxidant edible films,” in *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*, Woodhead Publishing, 2010, pp. 496–515.
- [135] E. Talón *et al.*, “Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 1153–1161, Feb. 2017.
- [136] M. Moradi, H. Tajik, S. M. Razavi Rohani, and A. Mahmoudian, “Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with Zataria multiflora Boiss. essential oil and monolaurin,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 72, pp. 37–43, Oct. 2016.
- [137] N. Benbettaïeb, O. Chambin, T. Karbowiak, and F. Debeaufort, “Release behavior of quercetin from chitosan-fish gelatin edible films influenced by electron beam irradiation,” *Food Control*, vol. 66, pp. 315–319, Aug. 2016.
- [138] D. Piñeros-Hernandez, C. Medina-Jaramillo, A. López-Córdoba, and S. Goyanes, “Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging,” *Food Hydrocoll.*, vol. 63, pp. 488–495, Feb. 2017.
- [139] L. Bartkowski, F. D. Dryden, and J. A. Marchello, “Quality Changes of Beef Steaks Stored in Controlled Gas Atmospheres Containing High or Low Levels of Oxygen,” *J. Food Prot.*, vol. 45, no. 1, pp. 41–45, Jan. 1982.
- [140] I. Sánchez-Ortega, B. E. García-Almendárez, E. M. Santos-López, A. Amaro-Reyes, J. E. Barboza-Corona, and C. Regalado, “Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation,” *Sci. World J.*, vol. 2014, pp. 1–18, 2014.

- [141] J. Bonilla, L. Atarés, M. Vargas, and A. Chiralt, “Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations,” *J. Food Eng.*, vol. 110, no. 2, pp. 208–213, May 2012.
- [142] S. M. T. Gharibzahedi and S. Mohammadnabi, “Effect of novel bioactive edible coatings based on jujube gum and nettle oil-loaded nanoemulsions on the shelf-life of Beluga sturgeon fillets,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 769–777, Feb. 2017.
- [143] P. V. Suresh, K. R. Raj, T. Nidheesh, G. K. Pal, and P. Z. Sakhare, “Application of chitosan for improvement of quality and shelf life of table eggs under tropical room conditions,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 10, pp. 6345–6354, Oct. 2015.
- [144] K. D. Pujols *et al.*, “Comparing effects of  $\alpha$ - vs.  $\beta$ -chitosan coating and emulsion coatings on egg quality during room temperature storage,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 49, no. 5, pp. 1383–1390, May 2014.
- [145] J. H. Han, “4 - Antimicrobial food packaging A2 - Ahvenainen, Raija,” in *Novel Food Packaging Techniques*, Woodhead Publishing, 2003, pp. 50–70.
- [146] D. S. Cha and M. S. Chinnan, “Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 4, pp. 223–237, 2004.
- [147] Règlement (CE) N° 450/2009 concernant les matériaux et objets actifs et intelligents destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. 2009.
- [148] Règlement (CE) N° 1333/2008 sur les additifs alimentaires. 2008.
- [149] Règlement (CE) N° 1332/2008 concernant les enzymes alimentaires et modifiant la directive 83/417/CEE du Conseil, le règlement (CE) no 1493/1999 du Conseil, la directive 2000/13/CE, la directive 2001/112/CE du Conseil et le règlement (CE) no 258/97. 2008.
- [150] P. Suppakul, J. Miltz, K. Sonneveld, and S. w. Bigger, “Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications,” *J. Food Sci.*, vol. 68, no. 2, pp. 408–420, Mar. 2003.
- [151] S. Burt, “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, Aug. 2004.
- [152] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, “Biological effects of essential oils – A review,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 2, pp. 446–475, Feb. 2008.
- [153] B. K. Tiwari, V. P. Valdramidis, C. P. O’Donnell, K. Muthukumarappan, P. Bourke, and P. J. Cullen, “Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 14, pp. 5987–6000, Jul. 2009.

- [154] J. R. Calo, P. G. Crandall, C. A. O'Bryan, and S. C. Ricke, "Essential oils as antimicrobials in food systems – A review," *Food Control*, vol. 54, pp. 111–119, Aug. 2015.
- [155] M. Perricone, E. Arace, M. R. Corbo, M. Sinigaglia, and A. Bevilacqua, "Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components," *Front. Microbiol.*, vol. 6, Feb. 2015.
- [156] I. Fernández-Pan, X. Carrión-Granda, and J. I. Maté, "Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets," *Food Control*, vol. 36, no. 1, pp. 69–75, Feb. 2014.
- [157] Z. K. Emiroğlu, G. P. Yemiş, B. K. Coşkun, and K. Candoğan, "Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties," *Meat Sci.*, vol. 86, no. 2, pp. 283–288, Oct. 2010.
- [158] Y. Alparslan, H. H. Yapıcı, C. Metin, T. Baygar, A. Günlü, and T. Baygar, "Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 72, pp. 457–466, Oct. 2016.
- [159] N. Khazaei, M. Esmaili, Z. E. Djomeh, M. Ghasemlou, and M. Jouki, "Characterization of new biodegradable edible film made from basil seed (*Ocimum basilicum* L.) gum," *Carbohydr. Polym.*, vol. 102, pp. 199–206, Feb. 2014.
- [160] Y. Ruiz-Navajas, M. Viuda-Martos, E. Sendra, J. A. Perez-Alvarez, and J. Fernández-López, "In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils," *Food Control*, vol. 30, no. 2, pp. 386–392, Apr. 2013.
- [161] S. M. B. Hashemi, A. Mousavi Khaneghah, M. Ghaderi Ghahfarrokhi, and I. Eş, "Basil-seed gum containing *Origanum vulgare* subsp. *viride* essential oil as edible coating for fresh cut apricots," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 125, pp. 26–34, Mar. 2017.
- [162] N. Azarakhsh, A. Osman, H. M. Ghazali, C. P. Tan, and N. Mohd Adzahan, "Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 88, pp. 1–7, Feb. 2014.
- [163] M. Artiga-Artigas, A. Acevedo-Fani, and O. Martín-Belloso, "Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber," *Food Control*, vol. 76, pp. 1–12, Jun. 2017.



- [164] L. Salvia-Trujillo, M. A. Rojas-Graü, R. Soliva-Fortuny, and O. Martín-Belloso, "Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut Fuji apples," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 105, pp. 8–16, Jul. 2015.
- [165] Nabiba Bouzouita and Mohamed Moncef Chaabouni, "Chemical Composition of Bergamot (Citrus Bergamia Risso) Essential Oil Obtained by Hydrodistillation," *J. Chem. Chem. Eng.*, vol. 4, no. 4, pp. 60–62, 2010.
- [166] G. Singh, P. Marimuthu, H. s. Murali, and A. s. Bawa, "Antioxidative and Antibacterial Potentials of Essential Oils and Extracts Isolated from Various Spice Materials†," *J. Food Saf.*, vol. 25, no. 2, pp. 130–145, May 2005.
- [167] T. Ma *et al.*, "Influence of technical processing units on chemical composition and antimicrobial activity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice essential oil," *Food Chem.*, vol. 170, pp. 394–400, Mar. 2015.
- [168] M. T. Baratta, H. J. D. Dorman, S. G. Deans, A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, and G. Ruberto, "Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils," *Flavour Fragr. J.*, vol. 13, no. 4, pp. 235–244, Jul. 1998.
- [169] R. Naveed *et al.*, "Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 13, no. 1, Dec. 2013.
- [170] B. Teixeira *et al.*, "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils," *Ind. Crops Prod.*, vol. 43, pp. 587–595, May 2013.
- [171] S. Singh, S. S. Das, G. Singh, C. Schuff, M. P. de Lampasona, and C. A. N. Catalán, "Composition, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil and Oleoresins Obtained from Black Cumin Seeds (*Nigella sativa* L.)," *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–10, 2014.
- [172] A. Elaissi *et al.*, "Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 12, no. 1, Dec. 2012.
- [173] M. H. H. Roby, M. A. Sarhan, K. A.-H. Selim, and K. I. Khalel, "Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 44, pp. 437–445, Jan. 2013.

- [174] R. Costa, C. Bisignano, A. Filocamo, E. Grasso, F. Occhiuto, and F. Spadaro, "Antimicrobial activity and chemical composition of *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle essential oil from Italian organic crops," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 26, no. 6, pp. 400–408, Nov. 2014.
- [175] L. Léonard *et al.*, "Preservation of viability and anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei*, entrapped in gelling matrices of alginate or alginate/caseinate," *Food Control*, vol. 47, pp. 7–19, Jan. 2015.
- [176] A. Concha-Meyer, R. Schöbitz, C. Brito, and R. Fuentes, "Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon," *Food Control*, vol. 22, no. 3–4, pp. 485–489, Mar. 2011.
- [177] K. Sanjurjo and S. Flores, "Study of the performance of nisin supported in edible films," *Food Res. Int.*, vol. 39, no. 6, pp. 749–754, Jul. 2006.
- [178] B. Y. Colak, P. Peynichou, S. Galland, N. Oulahal, F. Prochazka, and P. Degraeve, "Antimicrobial Activity of Nisin and Natamycin Incorporated Sodium Caseinate Extrusion-Blown Films: A Comparative Study with Heat-Pressed/Solution Cast Films," *J. Food Sci.*, vol. 81, no. 5, pp. E1141-1150, May 2016.
- [179] T. Padgett, I. Y. Han, and P. L. Dawson, "Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films," *J. Food Prot.*, vol. 61, no. 10, pp. 1330–1335, Oct. 1998.
- [180] Ko, S. and James, M.E., "Effects of hydrophobicity/hydrophilicity of edible films on control of *Listeria monocytogenes* by nisin and mechanical properties & water vapor permeability of edible films /," *J Food Sci*, 2000.
- [181] *Règlement (UE) N° 1129/2011 de la commission du 11 novembre 2011 modifiant l'annexe II du règlement (CE) no 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en vue d'y inclure une liste de l'Union des additifs alimentaires.* 2011.
- [182] L. M. Pérez, M. del V. Soazo, C. E. Balagué, A. C. Rubiolo, and R. A. Verdini, "Effect of pH on the effectiveness of whey protein/glycerol edible films containing potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat foods," *Food Control*, vol. 37, pp. 298–304, Mar. 2014.
- [183] L. M. Pérez, C. E. Balagué, A. C. Rubiolo, and R. A. Verdini, "Evaluation of the biocide properties of whey-protein edible films with potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*," *Procedia Food Sci.*, vol. 1, pp. 203–209, 2011.

- [184] M. Ozdemir and J. D. Floros, "Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films," *J. Food Eng.*, vol. 47, no. 2, pp. 149–155, Feb. 2001.
- [185] L. E. Ferreira Saraiva *et al.*, "Development and application of edible film of active potato starch to extend mini panettone shelf life," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 73, pp. 311–319, Nov. 2016.
- [186] X. L. Shen, J. M. Wu, Y. Chen, and G. Zhao, "Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan," *Food Hydrocoll.*, vol. 24, no. 4, pp. 285–290, Jun. 2010.
- [187] C. Arismendi, S. Chillo, A. Conte, M. A. Del Nobile, S. Flores, and L. N. Gerschenson, "Optimization of physical properties of xanthan gum/tapioca starch edible matrices containing potassium sorbate and evaluation of its antimicrobial effectiveness," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 1, pp. 290–296, Sep. 2013.
- [188] L. Famá, A. M. Rojas, S. Goyanes, and L. Gerschenson, "Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 38, no. 6, pp. 631–639, Sep. 2005.
- [189] H. Türe, M. Gällstedt, and M. S. Hedenqvist, "Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate," *Food Res. Int.*, vol. 45, no. 1, pp. 109–115, Jan. 2012.
- [190] Y. Pranoto, S. K. Rakshit, and V. M. Salokhe, "Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin," *ResearchGate*, vol. 38, no. 8, pp. 859–865, Dec. 2005.
- [191] Z. Gao, "Evaluation of different kinds of organic acids and their antibacterial activity in Japanese Apricot fruits," *Afr. J. Agric. RESEARCH*, vol. 7, no. 35, Sep. 2012.
- [192] M. Banerjee and P. K. Sarkar, "Microbiological quality of some retail spices in India," *Food Res. Int.*, vol. 36, no. 5, pp. 469–474, 2003.
- [193] G. O. Adeshina and J. A. Onaolapo, "Studies on the efficacy of some preservatives used in packaged orange drinks," *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 1513–1518, 2012.
- [194] L.-X. Lv, Y. Pan, and Y.-Q. Li, "Biosynthesis of ascorbyl benzoate in organic solvents and study of its antioxygenic and antimicrobial properties," *Food Chem.*, vol. 101, no. 4, pp. 1626–1632, 2007.

- [195] D. Stanojevic and L. Comic, "Antimicrobial effects of Sodium Benzoate, Sodium Nitrite and Potassium Sorbate and their Synergistic Action in vitro," *ResearchGate*, vol. 15, no. 4, pp. 308–312, Jan. 2009.
- [196] A. LaCoste, K. M. Schaich, D. Zumbrennen, and K. L. Yam, "Advancing controlled release packaging through smart blending," *Packag. Technol. Sci.*, vol. 18, no. 2, pp. 77–87, Mar. 2005.
- [197] A. Cagri, Z. Ustunol, and E. T. Ryser, "Antimicrobial edible films and coatings," *J. Food Prot.*, vol. 67, no. 4, pp. 833–848, Apr. 2004.
- [198] J. H. Han, "6 - Antimicrobial packaging systems," in *Innovations in Food Packaging*, London: Academic Press, 2005, pp. 80–107.
- [199] A. Lopez-Rubio, E. Almenar, P. Hernandez-Munoz, J. M. Lagaron, R. Catala, and R. Gavara, "Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications," *Food Rev. Int.*, vol. 20, no. 4, pp. 357–387, 2004.
- [200] C. Wessling, T. Nielsen, A. Leufven, and M. Jagerstad, "Retention of alpha-tocopherol in low-density polyethylene (LDPE) and polypropylene (PP) in contact with foodstuffs and food-simulating liquids," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 79, no. 12, pp. 1635–1641, Sep. 1999.
- [201] A. A. Al-Nabulsi, J. H. Han, Z. Liu, E. T. Rodrigues-Vieira, and R. A. Holley, "Temperature-Sensitive Microcapsules Containing Lactoferrin and Their Action Against *Carnobacterium viridans* on Bologna," *J. Food Sci.*, vol. 71, no. 6, pp. M208–M214, Aug. 2006.
- [202] M. Moditsi, A. Lazaridou, T. Moschakis, and C. G. Biliaderis, "Modifying the physical properties of dairy protein films for controlled release of antifungal agents," *Food Hydrocoll.*, vol. 39, pp. 195–203, Aug. 2014.
- [203] A. Redl, N. Gontard, and S. Guilbert, "Determination of Sorbic Acid Diffusivity in Edible Wheat Gluten and Lipid Based Films," *J. Food Sci.*, vol. 61, no. 1, pp. 116–120, Jan. 1996.
- [204] J. H. Han and J. D. Floros, "Potassium Sorbate Diffusivity in American Processed and Mozzarella Cheeses," *J. Food Sci.*, vol. 63, no. 3, pp. 435–437, May 1998.
- [205] A. Giannakopoulos and S. Guilbert, "Sorbic acid diffusivity in relation to the composition of high and intermediate moisture model gels and foods," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 21, no. 4, pp. 477–485, Jun. 2007.
- [206] A. Nussinovitch, "Biopolymer Films and Composite Coatings," in *Modern Biopolymer Science*, Elsevier, 2009, pp. 295–326.

- [207] D. Restuccia *et al.*, “New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications,” *Food Control*, vol. 21, no. 11, pp. 1425–1435, Nov. 2010.
- [208] M. Yildirim and N. s. Hettiarachchy, “Biopolymers Produced by Cross-linking Soybean 11S Globulin with Whey Proteins using Transglutaminase,” *J. Food Sci.*, vol. 62, no. 2, pp. 270–275, Mar. 1997.
- [209] P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer Science & Business Media, 1998.
- [210] R. Jenness, “The composition of milk,” in *Lactation*, Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press, 1985.
- [211] P. Walstra, R. Jenness, and H. T. Badings, *Dairy chemistry and physics / Pieter Walstra, Robert Jenness, with a contribution by H.T. Badings*. New York: Wiley, New York : Wiley, c1984.
- [212] A. Y. Tamime, “Dairy Technology—Principles of Milk Properties and Processes (2006) - Edited by P. Walstra, J.T.M. Wouters and T.J. Geurts,” *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 60, no. 2, pp. 154–154, May 2007.
- [213] T. C. McGann, W. J. Donnelly, R. D. Kearney, and W. Buchheim, “Composition and size distribution of bovine casein micelles,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 630, no. 2, pp. 261–270, Jun. 1980.
- [214] Schmidt, “Collodial aspects of casein [in milk products]. [A review article].,” *Neth. Milk Dairy J.*, 1980.
- [215] P. F. Fox and C. M. Hearn, “Heat stability of milk: influence of  $\kappa$ -casein hydrolysis,” *J. Dairy Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 173–181, Jun. 1978.
- [216] P. Walstra, “Casein sub-micelles: do they exist?,” *Int. Dairy J.*, vol. 9, no. 3–6, pp. 189–192, Mar. 1999.
- [217] H. E. Swaisgood, “Review and Update of Casein Chemistry,” *J. Dairy Sci.*, vol. 76, no. 10, pp. 3054–3061, Oct. 1993.
- [218] A. Kessler, O. Menéndez-Aguirre, J. Hinrichs, C. Stubenrauch, and J. Weiss, “ $\alpha$  s - Casein–PE6400 mixtures: a fluorescence study,” *Faraday Discuss.*, vol. 166, no. 0, pp. 399–416, 2013.
- [219] H. E. Swaisgood, “Chemistry of the Caseins,” in *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, Eds. Springer US, 2003, pp. 139–201.
- [220] Adam Cummings, David Hess, Bryan Patel, and Hongwang Zhang, “Cheese & Yogurt.”.

- [221] H. W. Modler, "Functional Properties of Nonfat Dairy Ingredients - A Review. Modification of Products Containing Casein<sup>1,2</sup>," *J. Dairy Sci.*, vol. 68, no. 9, pp. 2195–2205, Sep. 1985.
- [222] W. N. Eigel *et al.*, "Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision<sup>1</sup>," *J. Dairy Sci.*, vol. 67, no. 8, pp. 1599–1631, Aug. 1984.
- [223] P. F. Fox, Ed., *Advanced dairy chemistry. Vol. 1 Pt. B: Proteins [...]*, 3. ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ, 2003.
- [224] H.-P. Bachmann, "Cheese analogues: a review," *Int. Dairy J.*, vol. 11, no. 4–7, pp. 505–515, Jul. 2001.
- [225] "Laboratoires ABIA." [Online]. Available: <http://www.laboratoires-abia.com/soutenons-la-production-francaise-2-2/>. [Accessed: 07-Nov-2017].
- [226] L. Bazinet, F. Lamarche, D. Ippersiel, C. Gendron, B. Mahdavi, and J. Amiot, "Comparison of Electrochemical and Chemical Acidification of Skim Milk," *J. Food Sci.*, vol. 65, no. 8, pp. 1303–1307, Nov. 2000.
- [227] P. M. Tomasula, J. C. Craig, R. T. Boswell, R. D. Cook, M. J. Kurantz, and M. Maxwell, "Preparation of casein using carbon dioxide," *J. Dairy Sci.*, vol. 78, no. 3, pp. 506–514, Mar. 1995.
- [228] P. M. Tomasula, J. C. Craig, and A. J. McAloon, "Economic Analysis of a Continuous Casein Process Using Carbon Dioxide as Precipitant<sup>1</sup>," *J. Dairy Sci.*, vol. 81, no. 12, pp. 3331–3342, Dec. 1998.
- [229] C.R. Southwards, "Casein products, Consumer and applications science section." New Zealand dairy research institute.
- [230] D. S. Horne, "Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products," *Int. Dairy J.*, vol. 8, no. 3, pp. 171–177, Mar. 1998.
- [231] D. S. Horne, "Casein structure, self-assembly and gelation," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 7, no. 5–6, pp. 456–461, Nov. 2002.
- [232] Waugh, D. F., & Noble, R. W. (1965). Casein micelles. Formation and structure. II. *Journal of the American Chemical Society*, 87, 2246–2257.
- [233] M. Britten, M. Boulet, and P. Paquin, "Estimation of casein micelles' surface energy by means of contact angle measurements," *J. Dairy Res.*, vol. 56, no. 2, pp. 223–234, May 1989.
- [234] J. Garnier and B. R. Dumas, "Structure of the casein micelle. A proposed model," *J. Dairy Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 493–505, Oct. 1970.

- [235] C. Holt, "Casein Micelle Substructure and Calcium Phosphate Interactions Studied by Sephadex Column Chromatography," *J. Dairy Sci.*, vol. 81, no. 11, pp. 2994–3003, Nov. 1998.
- [236] C. V. Morr, M. A. Nielsen, and S. T. Coulter, "Centrifugal Sephadex Procedure for Fractionation of Concentrated Skimmilk, Whey, and Similar Biological Systems1," *J. Dairy Sci.*, vol. 50, no. 3, pp. 305–306, Mar. 1967.
- [237] P. Walstra, "On the Stability of Casein Micelles1," *J. Dairy Sci.*, vol. 73, no. 8, pp. 1965–1979, Aug. 1990.
- [238] P. D. Shimmin and R. D. Hill, "An electron microscope study of the internal structure of casein micelles," *J. Dairy Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 121–123, Feb. 1964.
- [239] P. Cayot and D. Lorient, *Structures et technofonctions des protéines du lait: arilait recherches*. Londres: Tec & Doc - Lavoisier, 1998.
- [240] T. H. McHugh and J. M. Krochta, "Sorbitol- vs Glycerol-Plasticized Whey Protein Edible Films: Integrated Oxygen Permeability and Tensile Property Evaluation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, no. 4, pp. 841–845, Apr. 1994.
- [241] R. J. Avena-Bustillos and J. M. Krochta, "Water Vapor Permeability of Caseinate-Based Edible Films as Affected by pH, Calcium Crosslinking and Lipid Content," *J. Food Sci.*, vol. 58, no. 4, pp. 904–907, Jul. 1993.
- [242] R. De Jesús Avena-Bustillos, J. M. Krochta, and M. E. Saltveit, "Water Vapor Resistance of Red Delicious Apples and Celery Sticks Coated with Edible Caseinate-Acetylated Monoglyceride Films," *J. Food Sci.*, vol. 62, no. 2, pp. 351–354, Mar. 1997.
- [243] R. J. Avena-Bustillos, L. A. Cisneros-Zevallos, J. M. Krochta, and M. E. Saltveit, "Optimization of Edible Coatings on Minimally Processed Carrots Using Response Surface Methodology," *Trans. ASAE*, vol. 36, no. 3, pp. 801–805, 1993.
- [244] B. Cuq, N. Gontard, and S. Guilbert, "Proteins as agricultural polymers for packaging production," *Cereal Chem.*, vol. 75, no. 1, pp. 1–9, Feb. 1998.
- [245] A. Peyron, "L'enrobage et les produits filmogènes : un nouveau mode d'emballage," *Viandes Prod. Carnés*, vol. 12, no. 2, pp. 41–46, 1991.
- [246] V. m. Hernandez-Izquierdo and J. m. Krochta, "Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation—A Review," *J. Food Sci.*, vol. 73, no. 2, pp. R30–R39, Mar. 2008.
- [247] S. Nam and M. G. Scanlon, "Extrusion of Pea Starch Containing Lysozyme and Determination of Antimicrobial Activity," *J. Food Sci.*, vol. 72, no. 9, pp. E477–E484, Nov. 2007.

- [248] W. Krische and A. Spitteler, "Casein Product," CA62490 (A), 01-Feb-1899.
- [249] Jean-Marie Michel, "Contribution à l'histoire industrielle des polymères en France." Société Chimique de France.
- [250] International Agency for Research on Cancer, Ed., *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 88, Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 2 - 9 June 2004*. Lyon: IARC, 2006.
- [251] Avis aux producteurs, importateurs et distributeurs de substances actives et de produits biocides et autres responsables de la mise sur le marché de produits biocides et aux utilisateurs de produits biocides concernant l'interdiction d'utilisation de certains produits biocides.
- [252] J. Chick and Z. Ustunol, "Mechanical and Barrier Properties of Lactic Acid and Rennet Precipitated Casein-Based Edible Films," *J. Food Sci.*, vol. 63, no. 6, pp. 1024–1027, Nov. 1998.
- [253] Ho, B., "Water vapor permeabilities and structural characteristics of casein films and casein-lipid emulsion films.," MS thesis, Univ. of California, Davis., 1992.
- [254] H. Chen, "Functional Properties and Applications of Edible Films Made of Milk Proteins," *J. Dairy Sci.*, vol. 78, no. 11, pp. 2563–2583, Nov. 1995.
- [255] I. Arvanitoyannis, E. Psomiadou, and A. Nakayama, "Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1," *Carbohydr. Polym.*, vol. 31, no. 4, pp. 179–192, Dec. 1996.
- [256] H. Chambi and C. Grosso, "Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase," *Food Res. Int.*, vol. 39, no. 4, pp. 458–466, 2006.
- [257] D. Brault, G. D'Aprano, and M. Lacroix, "Formation of Free-Standing Sterilized Edible Films from Irradiated Caseinates," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 8, pp. 2964–2969, Aug. 1997.
- [258] M. Lacroix, M. Jobin, E. Mezgheni, M. Srour, and S. Boileau, "Polymerization of calcium caseinates solutions induced by gamma irradiation," *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 52, no. 1–6, pp. 223–227, Jun. 1998.
- [259] C. Vachon, H. L. Yu, R. Yefsah, R. Alain, D. St-Gelais, and M. Lacroix, "Mechanical and structural properties of milk protein edible films cross-linked by heating and gamma-irradiation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 8, pp. 3202–3209, Aug. 2000.



- [260] J. W. Rhim, A. Gennadios, D. Fu, C. L. Weller, and M. A. Hanna, "Properties of Ultraviolet Irradiated Protein Films," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 32, no. 3, pp. 129–133, May 1999.
- [261] R. Banerjee, H. Chen, and J. Wu, "Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process," *J. Food Sci.*, vol. 61, no. 4, pp. 824–828, Aug. 1996.
- [262] H. Juvonen, M. Smolander, H. Boer, J. Pere, J. Buchert, and J. Peltonen, "Film formation and surface properties of enzymatically crosslinked casein films," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 119, no. 4, pp. 2205–2213, Feb. 2011.
- [263] I. Arvanitoyannis and C. G. Biliaderis, "Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends," *Food Chem.*, vol. 62, no. 3, pp. 333–342, Jul. 1998.
- [264] M. del R. Moreira, M. Pereda, N. E. Marcovich, and S. I. Roura, "Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami," *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 1, pp. M54–M63, Jan. 2011.
- [265] L. Cao-Hoang, A. Chaine, L. Grégoire, and Y. Waché, "Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese," *Food Microbiol.*, vol. 27, no. 7, pp. 940–944, Oct. 2010.
- [266] H. Gialamas, K. G. Zinoviadou, C. G. Biliaderis, and K. P. Koutsoumanis, "Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods," *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 10, pp. 2402–2408, Dec. 2010.
- [267] S. (cirad/Ceemat Guilbert, "Use of superficial edible layer to protect intermediate moisture foods: application to the protection of tropical fruit dehydrated by osmosis," 1988.
- [268] M. J. Fabra, A. Hambleton, P. Talens, F. Debeaufort, and A. Chiralt, "Effect of ferulic acid and  $\alpha$ -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films," *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 6, pp. 1441–1447, Aug. 2011.
- [269] A. Jiménez, M. J. Fabra, P. Talens, and A. Chiralt, "Physical properties and antioxidant capacity of starch–sodium caseinate films containing lipids," *J. Food Eng.*, vol. 116, no. 3, pp. 695–702, Jun. 2013.
- [270] A. Frinault, D. j. Gallant, B. Bouchet, and J. p. Dumont, "Preparation of Casein Films by a Modified Wet Spinning Process," *J. Food Sci.*, vol. 62, no. 4, pp. 744–747, Jul. 1997.

[271] W. Metzger, "Method of producing casein film," US5681517 (A), 28-Oct-1997.

[272] W. E. L. Spiess and International Congress on Engineering and Food, Eds.,  
*Preservation processes and related techniques*. London: Elsevier, 1990.

## Avant-Propos

Depuis le début de ce manuscrit, l'attrait pour des matériaux biodégradables voire comestibles et si possible fonctionnalisés a été démontré. Des attentes sociétales, environnementales, économiques et industrielles sont sous-jacentes à ce projet. En partant du constat de la nécessité de remplacer les plaques de caséine actuellement déposées sur certains fromages en respect des lois en vigueur, les caséines s'avèrent être une matière première intéressante pour la fabrication de films et matériaux à usage alimentaire. L'amélioration de la traçabilité en fromagerie ou, plus généralement dans le secteur alimentaire, passe par l'ajout de molécules actives en tant qu'agents de protection et de conservation de l'aliment. Afin de répondre à cette demande et aux exigences industrielles (coûts et industrialisation du procédé), le procédé d'extrusion a été envisagé. Effectivement, ce procédé présente de nombreux avantages d'un point de vue industriel puisqu'il s'agit d'un process continu permettant un débit élevé de production en comparaison avec la production par voie humide/solvant qui est un process en batch souvent peu économique et surtout énergivore.

Les caséinates (protéines hydrosolubles) ont été transformées en extrusion [1] et ont été l'objet de deux thèses pour la fabrication de films en extrusion gonflage [2], [3]. Ce procédé est d'ailleurs celui employé actuellement par les industriels de la plasturgie, cela en fait un procédé de choix à développer pour les biopolymères. De plus, certaines ressources naturelles sont thermosensibles et nécessitent une transformation à basse température qui peut être envisagée avec un process d'extrusion bivis.

Le caractère novateur de ce projet consiste à transformer non pas des caséinates mais bien des caséines « acide » ou « présure » par extrusion. Ces caséines sont insolubles dans l'eau et étaient, jusqu'à présent, délaissées par la communauté scientifique dans le cadre de la fabrication de matériaux exceptées lors des études de Chick et al. en 1998 puis en 2002 où les caséines (acide et présure) ont été sélectionnées mais ensuite, neutralisées dans une solution à pH 10 d'hydroxyde de sodium à 1M donnant par conséquent une solution filmogène à base de caséinate de sodium [4], [5]. La synthèse bibliographique a mis en évidence l'impact de l'extraction sur la structure de la caséine et puis le développement réussi de films à partir de trois types de caséines, la problématique est de déterminer l'impact de ces structures sur les caractéristiques d'un matériau extrudé. La compréhension des relations structures-propriétés est à la base du choix de la matière première afin d'obtenir des caractéristiques spécifiques en fonction de l'application visée.

Pour la suite du projet, la caséine présure a été retenue afin de tester l'incorporation d'agents antimicrobiens de grade alimentaire comme le sorbate de potassium (E202), le benzoate de sodium (E211) et le propionate de calcium (E282). Ces sels d'acides organiques ont l'avantage d'être déjà couramment utilisés en alimentaire seul ou en combinaison. Concernant le potentiel antimicrobien des matériaux, des études ont déjà montré que le procédé d'extrusion avec des températures en dessous de 100°C permettait de préserver une activité antimicrobienne des agents actifs incorporés comme dans le cas du lysozyme [6]. Les acides organiques utilisés dans ce travail sont moins sensibles à la température du procédé. Le sorbate de potassium a été incorporé à des films d'amidon de manioc en extrusion par l'équipe de Flores et al. à des températures de procédé de 115 à 120°C [7]. De nombreux auteurs utilisant des acides organiques sont bien au-delà en concentration des limites autorisées par la réglementation en vigueur pour certaines catégories de denrées comme les boissons et poissons séchés par exemple qui ne peuvent contenir plus de 0,15-0,2 g/L d'acides organiques (Directive 95/2/CE du Parlement européen et du Conseil concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants). En effet, l'incorporation d'une concentration supérieure à 25% (m/m de protéine) d'acides benzoïque ou sorbique dans des films de protéines d'anchois a été nécessaire à Rocha et ses collaborateurs pour inhiber *Escherichia coli* O157:H7 [9]. Sanjurjo et Flores ont cependant remarqué que la matrice support de l'agent actif (dans leur cas, de la nisine incorporée dans des films d'amidon) jouait un rôle sur la libération du composé, ce qui laisse présager la possibilité d'une efficacité antimicrobienne à plus faible concentration et un relargage graduel [10]. L'intérêt sous-jacent de cette partie est donc l'optimisation et la réduction des conservateurs incorporés dans une matrice biopolymère.

Le travail présenté par la suite sous forme de publications scientifiques correspond à l'optimisation du matériau et en particulier l'amélioration des propriétés de sensibilité aux molécules d'eau qui freinent l'application de ce type de film. En cherchant à produire un matériau composite basé sur la caséine présure et des composés hydrophobes tels que des cires, l'objectif est de tirer parti des avantages de chacun des composants. La caséine apporte une matrice facilement transformable avec des propriétés mécaniques intéressantes (Chapitre II), ainsi qu'une matrice support d'acides organiques permettant une activité antimicrobienne intéressante (Chapitre III). Les cires, quant à elles, sont hydrophobes et donc moins sensibles aux conditions d'humidité et aux molécules d'eau. Un tel composite pourrait être appliqué à des denrées alimentaires humides (comme les fromages par exemple).

Dans cette dernière étude, à la fois les propriétés physico-chimiques et mécaniques du matériau ont été évaluées mais également la capacité antimicrobienne contre une souche d'*Escherichia coli* et contre la flore issue de croûte de Comté.

Face aux verrous et lacunes mis en évidence lors de la synthèse bibliographique, ce travail propose de compléter les connaissances concernant les matériaux à base de caséines et de comprendre les relations structure/propriétés entre matière première et matériau ; et de présenter une vaste gamme de matériaux qu'il est possible d'extruder, possédants des propriétés différentes de solubilité et de sensibilité à l'eau ainsi que des capacités antimicrobiennes.

## Références avant propos

- [1] F. Prochazka and G. Assezat, “Casein and/or Caseinate Thermoplastic Granule, Composition, and Method for Producing Same,” WO/2012/010421, 27-Jan-2012.
- [2] 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,” 2014.
- [3] Imane Belyamani, “Développement d’un matériau thermoplastique, biodegradable et hydrosoluble a base d’une protéine du lait,” 2011.
- [4] J. Chick and R. j. Hernandez, “Physical, Thermal, and Barrier Characterization of Casein-Wax-Based Edible Films,” *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 3, pp. 1073–1079, Apr. 2002.
- [5] J. Chick and Z. Ustunol, “Mechanical and Barrier Properties of Lactic Acid and Rennet Precipitated Casein-Based Edible Films,” *J. Food Sci.*, vol. 63, no. 6, pp. 1024–1027, Nov. 1998.
- [6] B. Y. Colak *et al.*, “Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 72, pp. 142–151, Oct. 2015.
- [7] S. K. Flores, D. Costa, F. Yamashita, L. N. Gerschenson, and M. V. Grossmann, “Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 1, pp. 196–202, Jan. 2010.
- [8] *Directive 95/2/CE du Parlement européen et du Conseil concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants.* 1995.
- [9] M. da Rocha, M. R. Loiko, E. C. Tondo, and C. Prentice, “Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids,” *Food Hydrocoll.*, vol. 37, pp. 213–220, Jun. 2014.
- [10] K. Sanjurjo and S. Flores, “Study of the performance of nisin supported in edible films,” *Food Res. Int.*, vol. 39, no. 6, pp. 749–754, Jul. 2006.

# Chapitre II. Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration

Elodie Chevalier<sup>1,2</sup>, Gilles Assezat<sup>2</sup>, Frédéric Prochazka<sup>2</sup>, Nadia Oulahal<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, Plateforme Alimentec, rue Henri de Boissieu F-01000 Bourg En Bresse, France

<sup>2</sup> Université de Lyon, F-69003, France ; CNRS, UMR5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, F-42023, Saint- Etienne, France

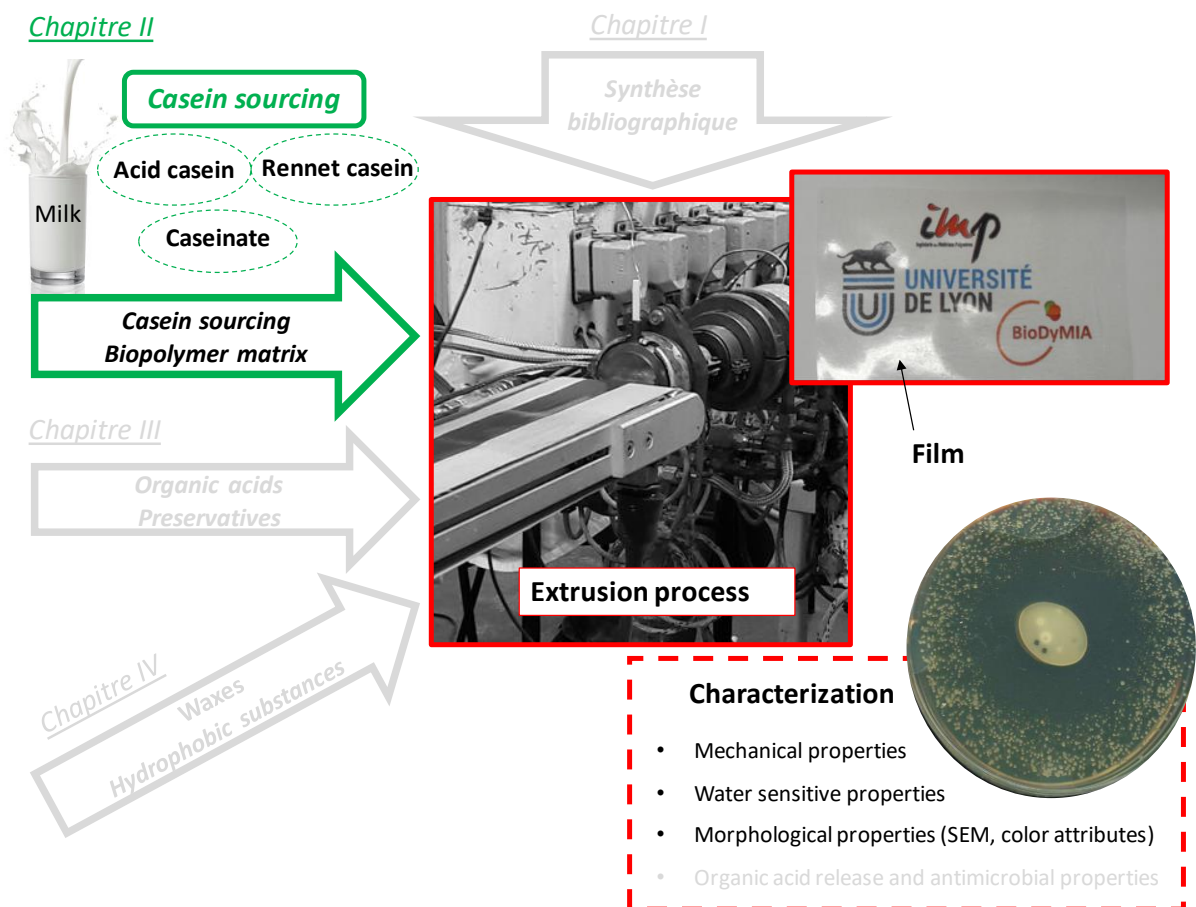


Figure II-1 : Organisation générale des chapitres du manuscrit - Chapitre II

## Table des figures

Figure II-1 : Organisation générale des chapitres du manuscrit - Chapitre II.....	II-121
Figure II-2 : Evolution du prix de la caséine acide et de la caséine présure entre 2000 et 2016 aux USA (source USDA).....	II-124
Figure II-3 : Résumé graphique.....	II-126
Figure II-4 : Scanning electron micrographs (SEM) of cross-sections of extruded casein based sheets plasticized with different amount of glycerol.....	II-137
Figure II-5 : FTIR spectroscopy of native casein powders and extruded casein sheets.....	II-139
Figure II-6 : Adsorption isotherms at 23°C of casein based films plasticized with different glycerol concentration (13,2% or 24,2% (w/w)).....	II-141
Figure II-7 : Water contact angles of casein based films plasticized with 13,2 or 24,2% of glycerol over time. A: Sorption kinetic of water droplet on film surface over 120 seconds (mean value of triplicates). B: Pictures of water droplet evolution over time and film swelling or degradation .....	II-144
Figure II-8 : Mechanical properties of the different extruded casein based sheets conditioned at 50% relative humidity (RH), 65% RH or 80% RH and 30°C (n=5), A: represented as tensile strength as function of elongation at break and B: represented as tensile strength as function of relative humidity, casein source and glycerol concentration.....	II-145

## Table des tableaux

Table II-1 : Values (average $\pm$ standard deviation) of color parameters L*, a*, b* and calculated $\Delta E^{**}$ , density and porosity of rennet casein, acid casein and sodium caseinate based films plasticized with glycerol at 13,2 or 24,2% (w/w). n=9 ** comparison by subtraction of black background as standard.....	II-135
Table II-2 : Values (average $\pm$ standard deviation) of relative density and porosity of rennet casein, acid casein and sodium caseinate based film plasticized with glycerol at 13.2 or 24.2% (w/w). For density and porosity number of repetitions n=3.....	II-136
Table II-3 : Values of water sensibility properties represented by moisture content (n=4), solubility (n=4), swelling index (n=4) and water vapor permeability (n=3). .....	II-140



# Chapitre II : Développement et caractérisation de feuilles et films comestibles extrudés à base de différentes caséines et influence de la concentration en glycérol

## II.1 Introduction

Ce chapitre est rédigé sous forme d'une publication qui est publiée dans la revue « *Food Hydrocolloids* » (en appliquant la mise en forme de celle-ci), qui s'intéresse aux recherches innovantes concernant la caractérisation, les propriétés, les fonctionnalités et les applications touchant aux hydrocolloïdes. L'article publié est présenté en ANNEXE B.

Les protéines font partie avec les polysaccharides de la catégorie des hydrocolloïdes. La caséine est tout particulièrement intéressante car elle est utilisée dans de nombreuses denrées alimentaires pour ses qualités nutritives et son pouvoir liant. Un marché mondial existe donc autour des caséines, ce qui en fait une protéine intéressante pour la fabrication de biopolymères d'intérêt commercial. Des industries non-alimentaires comme la pharmaceutique, la cosmétique ou la fabrication de textile utilisent des caséines et caséinates comme agent de liaison.

Lors de la synthèse bibliographique, les différences entre les caséines (acide et présure) et les caséinates ont été exposées. Le marché des caséines est également différent de celui des caséinates. La caséine est segmentée comme comestible ou de grade industriel alors que les caséinates sont segmentés comme caséinate de sodium (45% du marché total des caséinate en 2014-Persistence market research report), caséinate de calcium et caséinate de potassium. Les acteurs clés sur ce marché sont notamment Nestlé S.A, Danone S.A., Arla Foods, FrieslandCampina, Fonterra, Westland Milk Products, Lactalis et Saputo. Le département de l'agriculture des Etats-Unis (USDA) fourni des rapports très détaillés comme présentés en Figure II-2 qui permet de suivre le cours des caséines à l'échelle des Etats-Unis. Des prévisions sont également faites sur la production de caséine en fonction des événements climatiques notamment dans les pays producteurs de caséine. C'est le cas dans le rapport de l'USDA du 17 août 2017 qui prévoit un ralentissement de la production de lait en Nouvelle Zélande dû aux récentes semaines de pluie et d'inondation.

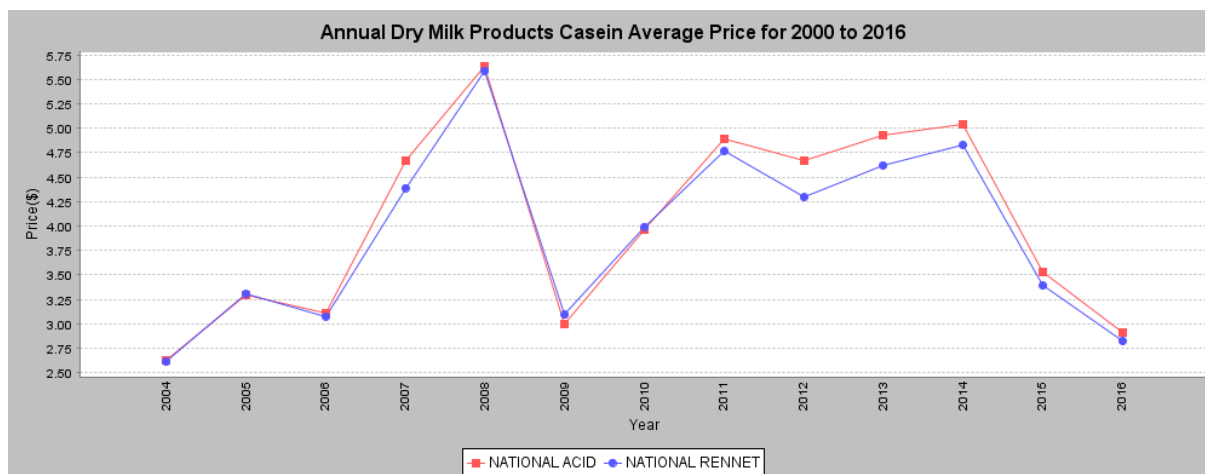


Figure II-2 : Evolution du prix de la caséine acide et de la caséine présure entre 2000 et 2016 aux USA (source USDA)

Les caséinates sont produits par dissolution de la caséine dans une solution alcaline de sodium, calcium ou potassium. Contrairement aux caséines, les caséinates sont solubles dans l'eau, ce qui leur permet d'ailleurs d'être plus fonctionnels dans certaines applications alimentaires. Deux avantages ressortent clairement de ce constat pour expliquer la démarche de ce projet. Les caséinates ont été décrits de manière importante dans la littérature scientifique à la fois avec des techniques de fabrication à l'échelle du laboratoire (voie solvant) et industrielle (voie fondue) contrairement aux caséines. Cela laisse un large champ exploratoire concernant la transformation des caséines. D'autant plus que les matériaux à base de caséinates sont, du fait du choix de la matière première, soluble dans l'eau. Par conséquent, les applications possibles pour ce matériau sont limitées d'où le travail de certaines équipes pour rendre ce matériau à base de caséinate moins hydrosoluble comme l'a démontré Brault et al. avec l'irradiation de films de caséinates de calcium (Brault, D'Aprano, & Lacroix, 1997). Une autre solution consiste donc à transformer avec succès des caséines insolubles (caséine acide et caséine présure) pour obtenir un matériau insoluble pour de nouvelles applications sans nécessité de pré-traitement de la matière première ou de post-traitements des matériaux.

Cet article permet de démontrer pour la première fois la transformation par extrusion de caséines insolubles (sans traitement de solubilisation notamment). Des matériaux à base de trois caséines : caséine acide, caséine présure et caséinate de sodium, ont été produits par voie fondue, en extrusion. Les différentes méthodes d'extraction de la caséine engendrent des modifications de structures qui ont ainsi été étudiées et reliées aux caractéristiques des matériaux. Des propriétés des matériaux telles que la colorimétrie, la densité, la porosité et les propriétés mécaniques ont été caractérisées. La caséine étant une protéine hydrophile, les propriétés liées à la sensibilité à l'eau telles que le taux d'humidité, la solubilité, le taux de gonflement, la perméabilité à la vapeur d'eau, la sorption d'eau et l'angle de contact entre l'eau et la surface des films ont également été analysées afin de fournir une étude comparative des différents matériaux. Les caractéristiques des matériaux extrudés ont été évaluées en fonction de l'origine en caséine, de la concentration en plastifiant incorporé (glycérol à raison de 13,2% ou 24,2% (m/m de caséine)) et de l'humidité relative environnante.

Voici la liste des formulations extrudées et étudiées dans la publication qui suit :

- Caséine présure + 13,2 % Glycérol
- Caséine présure + 24,2 % Glycérol
- Caséine acide + 13,2 % Glycérol
- Caséine acide + 24,2 % Glycérol
- Caséinate de sodium + 13,2 % Glycérol
- Caséinate de sodium + 24,2 % Glycérol

## II.2 Graphical abstract

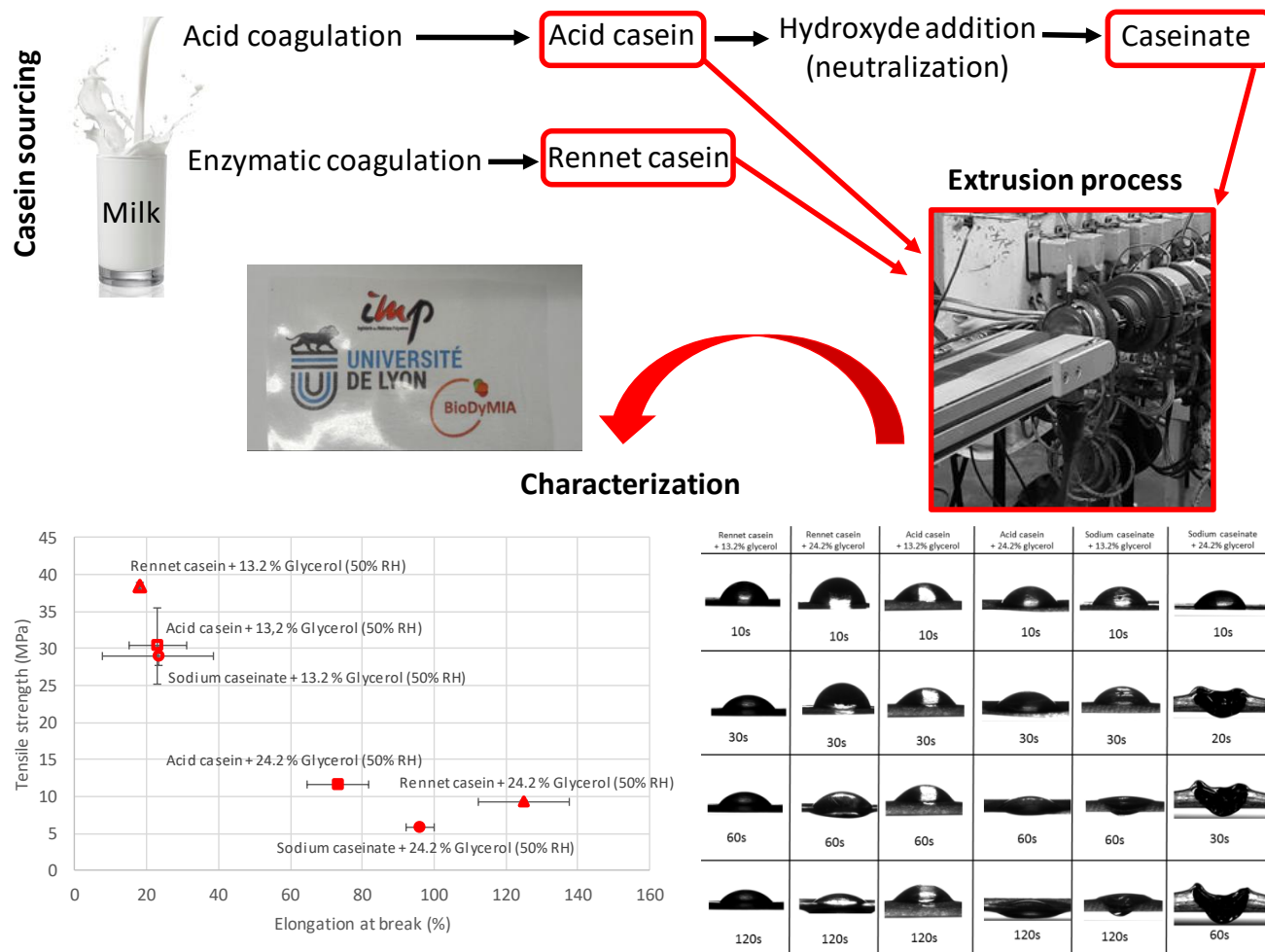


Figure II-3 : Résumé graphique

## II.3 Abstract

Different source of casein depending on their extraction method from milk are available on the market. Sheets from 3 different types of casein (rennet casein, acid casein and sodium caseinate) were developed using a dry process: extrusion. Casein sourcing, plasticizer concentration (13.2% w/w or 24.2% w/w) and relative humidity environment were studied for each sheet through color, density and porosity, water sensitivity and mechanical properties evaluation. A wide range of properties seems to be available through casein based sheets depending on casein source, which affected greatly water solubility (caseinates are 100% water soluble compare to acid and rennet casein). Besides, acid and rennet casein have different behaviour with water and even more with higher glycerol amounts. Indeed, rennet casein sheet is less sensitive to water than acid casein sheet at low glycerol concentration (13.2% w/w) but at the opposite, at high glycerol amount in sheets, rennet casein sheet is more hydrophilic than acid casein sheets.

Extrusion is an easy scale up process and it was used to produce casein based sheets with improved water vapor permeability (WVP). These findings can be used to find the suitable food packaging application for each casein based sheet with a low cost and efficient process.

## II.4 Highlights

- New edible films based on rennet casein, acid casein and sodium caseinate, produced by dry process: extrusion.
- Film characterization through physical properties, water sensitivity properties and mechanical properties.
- Casein sourcing and glycerol concentration were proved to affect film properties.
- Wide range of properties available through casein based film implies many food packaging application opportunities.

## II.5 Keywords

Edible film; casein; glycerol; extrusion; mechanical properties; water properties

## II.6 Introduction

Edible films or sheets based on hydrocolloids as polysaccharides or proteins have gained interest among the scientific community and industries over the last two decades due to their consequent potential for food packaging (Pavlath & Orts, 2009). Consumers request more environmental friendly packaging for their food that's why food industries are looking to substitute traditional synthetic plastic or at least part of it in their applications. Edible films based on biobased and biodegradable material have gained great attention these last years to produce casings, bags, pouches, wraps and covers.

From low to intermediate relative humidity, protein films are good oxygen barrier, which make protein films appropriate choice for oxygen-sensitive food (Krochta, 2002).

Nevertheless, protein films are well known to have high water vapor permeability (WVP) compared to edible waxes or low-density polyethylene (LDPE) films for example.

Edible biobased films have been formulated from several protein sources as gelatine, corn zein, wheat gluten, peanut protein and milk proteins as whey protein and casein (Arrieta & Peltzer, 2013; Belyamani, Prochazka, Assezat, & Debeaufort, 2014; Galus & Kadzińska, 2016a; Gontard, Guilbert, & Cuq, 1993; Guerrero, Retegi, Gabilondo, & de la Caba, 2010; Jangchud & Chinnan, 1999; Lai & Padua, 1997; Sobral, Menegalli, Hubinger, & Roques, 2001). Structure, mechanical (flexibility) and barrier properties are modified by adding plasticizers to film formulations (Vieira, da Silva, dos Santos, & Beppu, 2011). Plasticizers are added to improve processability, increase elongation and decrease film stiffness. However, adding plasticizers increases water vapor permeability and decreases moisture barrier ability of protein films. Glycerol is the most commonly used plasticizer for improving edible film processability and properties by increasing free volume and mobility of the molecules (V. m. Hernandez-Izquierdo & Krochta, 2008).

The majority of traditional synthetic plastics are prepared by so-called "hot compounding" techniques as calendaring, injection, compression moulding and extrusion. Ingredients in these processes are combined under heat and shearing forces that bring about a state of molten plastic (thermoplastic properties of polymers) which, could be shaped as desired with good strength and integrity properties (Vieira et al., 2011). In the contrary, most of edible films are produced by solution casting technique, which consist in dissolving the biopolymer in suitable solvent to make a film-forming solution that is spread over a surface and a film is obtained after solvent evaporation. Drying time and difficult scale up are the main drawbacks of this process. Extrusion process is very interesting and promising process with easy scale up possibility to produce edible films. Several proteins have been

tested at laboratory or pilot scale to produce packaging material by extrusion since few years as wheat gluten, keratin, gelatin, sunflower protein isolate, corn zein, soy protein, whey protein and caseinate (Barone, Schmidt, & Gregoire, 2006; Belyamani et al., 2014; Colak, Gouanve, Degraeve, Espuche, & Prochazka, 2015; V. M. Hernandez-Izquierdo, Reid, McHugh, De J. Berrios, & Krochta, 2008; Krishna, Nindo, & Min, 2012; Rouilly, Mériaux, Geneau, Silvestre, & Rigal, 2006; Ullsten et al., 2009; Wang & Padua, 2003; Zhang, Mungara, & Jane, 2001).

Casein is the main protein extracted from milk (~80%) which comprises 4 different components,  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein, which together in milk form colloidal micelles stabilized by caseins arrangements and calcium phosphate bridges (Swaisgood, 1993). Depending on coagulation method, different type of casein are obtained with specific characteristics, rennet and acid casein are the major type available (Kinsella, 1984). Acid casein refers to precipitated casein obtained by acidification of milk pH to 4.6 (isoelectric point of casein) with mineral acids or lactic acid (produced by lactic acid bacteria). Colloidal calcium phosphates of acid casein are solubilized and lost during coagulation process. Acid casein are insoluble in water and pH is around 4.6. In rennet casein case, coagulation is obtained by action of enzymes, chymosin (rennet), which cleaves a chemical bound in  $\kappa$ -casein. Chymosin cleaves  $\kappa$ -casein tail also referred as glycomacropetide and induce a destabilisation of casein micelles. Rennet casein obtained are insoluble in water, conserved their colloidal calcium phosphates and pH is around 7.5. Acid casein can be solubilized by neutralization with a base as sodium, potassium or calcium hydroxide to get sodium, potassium or calcium caseinates. Caseinate from acid casein don't have colloidal calcium phosphates, have a pH close to 7 and are highly water soluble.

Acid and rennet caseins are less studied than caseinate and extrusion process is a novelty for these proteins. Chick and Ustunol already reported lactic acid and rennet casein use as film forming hydrocolloids however, they modified the pH to facilitated processability during solvent casting by increasing pH which induce neutralization of casein into caseinate (Chick & Ustunol, 1998). Besides, to the best of our knowledge, there is no published studies regarding production and characterisation of insoluble rennet and acid casein edible sheets produced by extrusion process. Therefore, the aim of the present work is to evaluate the possibility to produce casein based sheet plasticized with different glycerol concentrations by extrusion process. Besides, sheet characterisation and study of casein sourcing and glycerol concentration influence in processability and sheet properties were also evaluated in order to get indications on potential food packaging applications of these sheets.

## II.7 Material and methods

### II.7.1 Materials/Chemicals

Rennet casein native powder was purchased from Eurial Ingredients (Nantes, France); acid casein powder and sodium caseinate from EPI Ingredients (Ancenis, France). Glycerol was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

### II.7.2 Casein sheet preparation

Casein sheets were prepared through a dry process with a co-rotating twin screw extruder as previously described by Colak et al. with modifications (Colak, Peynichou, et al., 2015). Casein powder (rennet or acid casein or sodium caseinate) were introduced into the first zone of the extruder. Glycerol (13.2 or 24.2 % (w/w) of protein powders) was added into the second zone. Temperature from hopper to die (5 cm width and 1 mm thickness) ranged from 10°C to 75°C. Sheets thickness is about 500  $\mu\text{m}$  +/- 50  $\mu\text{m}$  depending on formulation. Residence time in twin screw extruder with a powder feed speed of 2 kg/h and screw speed at 170 rpm was determined between 2 and 6 min. Prepared sheets were stored in plastic bags in cold room (4°C) until further experiments. For color characterization, water vapor permeability analysis, water sorption analysis and water contact angle determination, extruded sheets were thinned into films of 100  $\mu\text{m}$  +/- 50  $\mu\text{m}$  under heated platens at 75°C for 3 min in order to facilitated characterizations. All sheets specimens were conditioned for at least 48 h in a climate room at 50% relative humidity (RH) and 23°C before testing.

Materials obtained differ by casein powder type and plasticizer (glycerol) concentration.



## II.7.3 Physicochemical characterization

### II.7.3.1 Colour

Colour of films was determined with a colorimeter (Minolta chromameter CR-200) using the CIELAB colour parameters.  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  values were averaged from 9 readings across for each sample on a on black background:  $a^* = -1.43 \pm 0.04$ ;  $b^* = -0.95 \pm 0.02$ ;  $L^* = 29.80 \pm 0.01$ . The total colour difference ( $\Delta E$ ) was calculated according to the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  and  $\Delta b^*$  are the differentials between a sample colour parameter and the colour parameter of a standard used as film background.

### II.7.3.2 Density and porosity

Relative density of the different sheets, previously dried, was determined by a pycnometer, using ethanol 95-96% as solvent.

Microstructure of cryofractured sheets were examined by Scanning Electron Microscopy (SEM) (Hitachi TM3030, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan).

The cryofractured sheets were mounted on aluminium stubs using double sided carbon adhesive tape. 15 kV of accelerating voltage was used to test all samples. Pictures were analysed by ImageJ software to determined porosity as percentage of area covered by holes.

### II.7.3.3 FT-IR

FT-IR was recorded on Alpha Spectrometer (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany). FT-IR spectrum of sheet samples were recorded with diamond ATR detector between  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  using a total of 24 scans at room temperature.

## II.7.4 Water sensitive properties

### II.7.4.1 Moisture content, Water solubility and Swelling index

For all tests, 1.5 diameter discs of sheet samples were cut and conditioned at 50% RH, 23°C in a climate room for 48 h and weighed ( $m_1$ ). Methods described by Wu et al. and Razavi et al. were used with modifications to calculate water solubility and moisture content (Razavi, Mohammad Amini, & Zahedi, 2015; Wu, Zhong, Li, Shoemaker, & Xia, 2013). Conditioned samples were then dried in a ventilated oven at 75°C during 24 h and weighed ( $m_2$ ). Dried samples were soaked in distilled water containing 0.02% sodium azide (to avoid growth of microorganisms) during 24 h under oscillating agitation and weight of insoluble remaining part of the samples was read after a quick drying on absorbent paper ( $m_3$ ). Wet samples were dried again in a ventilated oven at 75°C during 24 h and weighed ( $m_4$ ). Finally, dried samples were placed in the climate room at 50% RH at 23°C and weighed after 48 h ( $m_5$ ).

With weights determined for four replicates per sample, moisture content, solubility and swelling index were determined according to the following equations:

$$\text{Moisture content (\%)} = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) * 100$$

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{m_2 - m_4}{m_2} * 100$$

$$\text{Swelling index (\%)} = \frac{m_3 - m_5}{m_5} * 100$$

### II.7.4.2 Water vapor permeability (WVP)

The gravimetric modified cup method based on ASTM E96/E96M was used with modifications to determine the WVP of edible films. Films were cut into circles (65 mm in diameter) and a digital micrometer was used to measure their thickness at three random spots, which were then averaged (noted  $\delta$ ).

Film samples were sealed (with sealant) on the top of cups containing saturated solution of NaCl (75% RH) and placed in a climate room at 50% RH and 23°C. Weight measurements were taken at regular time intervals (about 4 h) over 3 days and the weight variations were plotted as a function of time. Measurements were performed in triplicate.

Linear regression was used to determine the water vapor transmission rate (WVTR), which is the slope/ film area. The WVP was calculated by the following relationship.

$$WVP (g.Pa^{-1}.s^{-1}.m^{-1}) = \frac{WVTR . \delta}{S(R1 - R2)}$$

Where, S is the saturated vapour pressure and R1 and R2 are the inside and outside cup relative humidity.

#### *II.7.4.3 Water sorption properties*

Dynamic Vapor Sorption (DVS) instrument Q5000 SA (TA Instruments, New Castle, USA) was used to determine water sorption of the films. Samples of 8 mm diameter and an approximate weight of 5 mg of thin pressed films (thickness around  $150 \pm 50 \mu\text{m}$ ) were prepared. Sample was placed in stainless steel mesh basket inside the DVS instrument, which was set to go through a sorption beginning with 0% RH and increasing in intervals of 10% RH until 90% RH at a temperature of 23°C. Data obtained were corrected by analysing real dried weight at 0% RH with a Coulometer 899, which allows coulometric water determination according to Karl Fisher (Metrohm, Herisau, Switzerland).

#### *II.7.4.4 Water contact angles*

The angle between the film surface, as baseline, and droplet (2  $\mu\text{L}$ ) of water, called contact angle ( $\theta$ ), was evaluated with a drop shape analyser Krüss DSA25 using the sessile drop method (Krüss GmbH, Hamburg, Germany). A drop of 2  $\mu\text{L}$  was deposited on the film surface and contact angle as well as kinetic sorption was followed from 10 to 120 s. Effect of evaporation was analysed on PMMA support over 120 s, that is considered as impermeable to water and aqueous solutions. The determination of angles was replicated 3 times and averaged. Since films are water soluble or at least highly hydrophilic, measurements were done at specific times without waiting equilibrium. Pictures example of films reaction to water droplet were extracted from movies saved during kinetic sorption observation. This is not possible to consider values as absolute contact angles due to water sorption reaction over time (no equilibrium state), however for comparison purpose between the different film compositions among themselves, it is reasonable to follow this approach in order to characterize films and draw conclusions on their properties.

### II.7.5 Mechanical properties

Tensile specimens were cut as  $L=20$  mm,  $b_1=4.5$  mm,  $b_2=8.5$  mm, where  $L$  is the distance between shoulders,  $b_1$  is width of part between shoulders and  $b_2$  is width of grip section. Samples thickness was approximately  $500 \pm 50$   $\mu\text{m}$ . Test specimens were conditioned at 50% RH, 65% RH and 80% RH at 30°C during one week before tensile test. Five specimens were tested per each composition. Testing was conducted on a Shimadzu Autograph AGS-X test machine (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) fitted with a calibrated 500 N load cell and a cross-head speed of 5 mm/min. Ultimate tensile strength and elongation at break were obtained and the mean for each sample was plot on a graph.

### II.7.6 Statistical analyses

Data were analysed with XLSTAT software (Addinsoft, v19.02). Fisher's test, Low Significant Difference (LSD) was used to compare the statistical difference of compositions within the different experiments through one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## II.8 Results and Discussion

### II.8.1 Physicochemical characterization

#### II.8.1.1 Color

Color parameters are fundamental for biopolymer films, especially for packaging use and bring a great contribution to the consumers' willingness to buy a food product. Film color can be affected by different factors as plasticizers addition, thermal treatment and production process for example. Lab colour values of different films based on different casein source and with 13.2 % or 24.2 % of glycerol were obtained using a black background as standard. Background was proved to influence color measurements and Meléndez-Martínez et al. and Stinco et al. proved that black background allows the best color discrimination between samples (Meléndez-Martínez, Vicario, & Heredia, 2005; Stinco et al., 2012). As can be seen in Table II-1, all films showed a and b values close to 0 ( $-1.15 < a^* < -0.87$  and  $-0.99 < b^* < -0.53$ ), which indicates no dark pronounced color of films.

Table II-1 : Values (average  $\pm$  standard deviation) of color parameters  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and calculated  $\Delta E^{**}$ , density and porosity of rennet casein, acid casein and sodium caseinate based films plasticized with glycerol at 13,2 or 24,2% (w/w). n=9 \*\* comparison by subtraction of black background as standard

Sheet composition	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$\Delta E^{**}$
Rennet casein + 13.2 % Glycerol	$-0.89 \pm 0.02^a$	$-0.75 \pm 0.05^c$	$41.62 \pm 0.98^a$	$11.75 \pm 0.95^a$
Rennet casein + 24.2 % Glycerol	$-0.87 \pm 0.04^a$	$-0.68 \pm 0.08^b$	$40.46 \pm 0.82^b$	$10.57 \pm 0.84^b$
Acid casein + 13.2 % Glycerol	$-0.93 \pm 0.16^a$	$-0.99 \pm 0.06^d$	$42.31 \pm 1.68^a$	$12.27 \pm 1.73^a$
Acid casein + 24.2 % Glycerol	$-1.15 \pm 0.23^b$	$-0.63 \pm 0.07^b$	$39.75 \pm 1.34^b$	$9.80 \pm 1.34^b$
Sodium caseinate + 13.2 % Glycerol	$-1.14 \pm 0.07^b$	$-0.53 \pm 0.10^a$	$42.10 \pm 0.20^a$	$12.33 \pm 0.20^a$
Sodium caseinate + 24.2 % Glycerol	$-0.96 \pm 0.07^a$	$-0.77 \pm 0.10^c$	$40.07 \pm 0.73^b$	$10.36 \pm 0.72^b$

The main difference observed between the different films compositions occurred on lightness parameter ( $L^*$ ). Indeed,  $L^*$  parameter indicate that glycerol concentration is a significant factor affecting lightness.

The total color difference ( $\Delta E$ ) provide a good mean of film comparison since all parameters ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ ) are included in the analysis.  $\Delta E$  showed that glycerol is affecting lightness and increasing glycerol concentration in casein films (24.2%) resulted in significant increase ( $p < 0.05$ ) in lightness and transparency for all casein type films since  $\Delta E$  is lower. Plasticizers are generally proved to have this effect on hydrocolloid films and were previously reported (Ahmadi, Kalbasi-Ashtari, Oromiehie, Yarmand, & Jahandideh, 2012; Jouki, Khazaei, Ghasemlou, & HadiNezhad, 2013). This plasticizer effect could be attribute to increased polymer chain mobility and intermolecular spacing with glycerol increase (Farhan & Hani, 2017). It is also remarkable that films with same amount of glycerol but with different casein source have similar color values. Extruded materials based on different casein sources seem to produce films with similar and good transparency properties. Casein source used in this work have less influence on transparency than glycerol concentration. However, differences in color attributes were described for films made with sodium or calcium caseinates for example but, this difference was not obvious at high glycerol concentration (Arrieta et al., 2014; Fabra, Talens, & Chiralt, 2010).

### II.8.1.2 Density and porosity

Relative density was measured and porosity (percentage of area covered by holes) was analysed from SEM pictures of cryofractured samples. Results are summarized in Table II-2.

Table II-2 : Values (average  $\pm$  standard deviation) of relative density and porosity of rennet casein, acid casein and sodium caseinate based film plasticized with glycerol at 13.2 or 24.2% (w/w). For density and porosity number of repetitions  $n=3$ .

Sheet composition	Relative density	Porosity (Percentage of area covered by holes)
Rennet casein + 13.2 % Glycerol	$1.30 \pm 0.01^a$	$0.14 \pm 0.02^b$
Rennet casein + 24.2 % Glycerol	$1.30 \pm 0.01^a$	$0.30 \pm 0.09^c$
Acid casein + 13.2 % Glycerol	$1.25 \pm 0.01^b$	$0.11 \pm 0.07^c$
Acid casein + 24.2 % Glycerol	$1.26 \pm 0.01^b$	$0.05 \pm 0.01^c$
Sodium caseinate + 13.2 % Glycerol	$1.24 \pm 0.01^c$	$0.63 \pm 0.10^a$
Sodium caseinate + 24.2 % Glycerol	$1.24 \pm 0.01^c$	$0.72 \pm 0.11^a$

The sheet density seems to be depending on casein source. Density and porosity don't seem to be affected by glycerol amount. However, density of sodium caseinate sheets (1.24) was lower than acid casein sheets (1.25 – 1.26) and rennet casein sheets (1.30). The lower density for sodium caseinate based sheets could be explained by the porosity observed on cryofractures as can be seen in Figure II-4 and Table II-2. Density difference is probably due to porosity observed in sheets. Pression observed during extrusion process could also explain the density difference since pression was 2-4 times lower during caseinate sheet extrusion than during acid and rennet casein sheet extrusion under the same other conditions (temperature and screw speed). Pressure during extrusion seems to be impacted by raw material origin and has a noticeable effect on final sheet porosity and density.

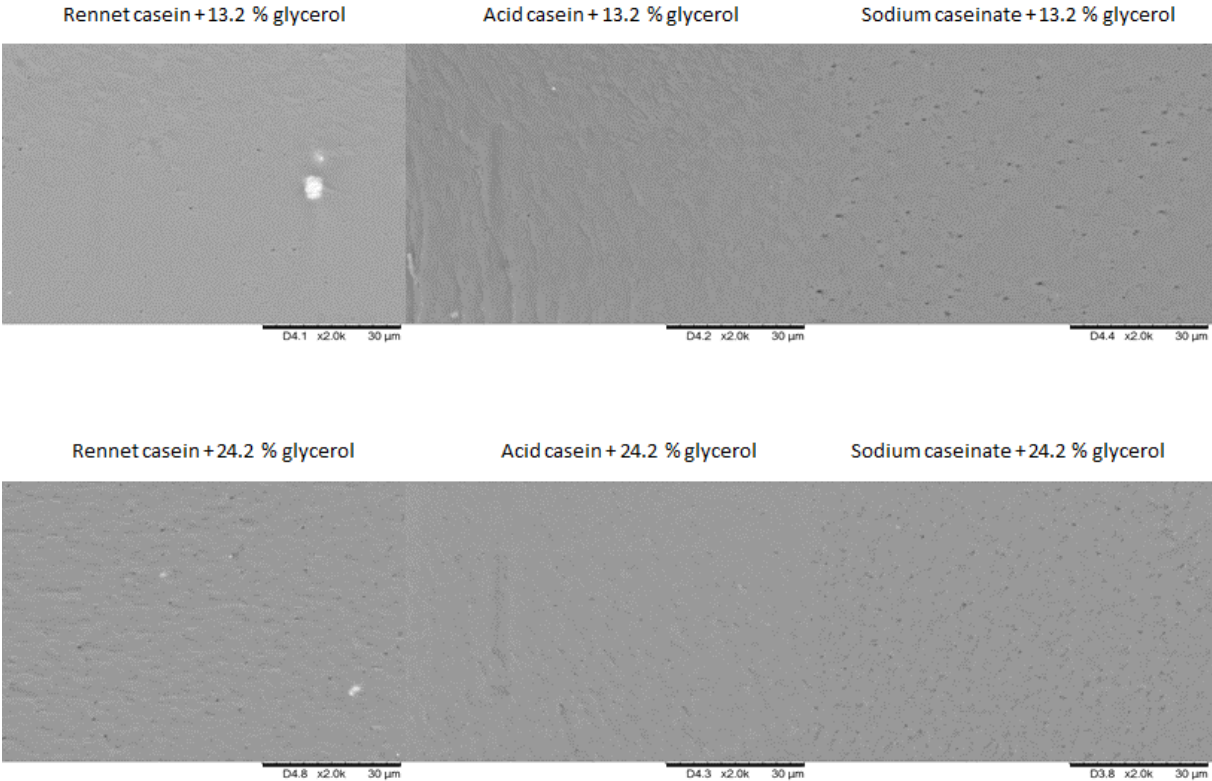


Figure II-4 : Scanning electron micrographs (SEM) of cross-sections of extruded casein based sheets plasticized with different amount of glycerol.

Zarzycki et al. already demonstrated that increasing moisture content of pea-wheat extrudates results in higher porosity (Zarzycki et al., 2015). The porosity observed could be an indication of longitudinal expansion as previously supposed by Zarzycki et al. and Kasprzak and Rzedzicki (Kasprzak & Rzedzicki, 2007; Zarzycki et al., 2015).

Even if casein powders conditioned at 50% RH before extrusion had similar water content values, the different casein sources have different water sensitivity during process. Indeed, water amount added in the extruder was adjusted for each formulation, which implies different amount of linked water during extrusion process and that could probably explain density and porosity value (caseinate>rennet casein>acid casein).

### *II.8.1.3 FT-IR*

The FTIR spectra of casein based sheets plasticized with 13.2% or 24.2% of glycerol are shown in Figure II-5.

Absorption peaks corresponding to stretching vibrations of amide bonds associated to protein network are located between 1200 and 1700  $\text{cm}^{-1}$  (Pereira, Souza, Cerqueira, Teixeira, & Vicente, 2010). Typical absorption bands of glycerol are located in the region 800 – 1150  $\text{cm}^{-1}$  containing 5 peaks corresponding to the vibrations of C-C and C-O linkages (Guerrero et al., 2010).

The FTIR spectra obtained for extruded casein sheets showed incorporation of glycerol compared to spectra of native casein powder with additional peaks in the glycerol typical region 800 – 1150  $\text{cm}^{-1}$ . When different substances are mixed, physical blend versus chemical interactions are reflected by changes in characteristic spectra peaks (Guan, Liu, Zhang, & Yao, 1998). In all casein based sheet spectra, Amide II region, derived mostly from in-plane N-H bending, is shifted from 1510 (native protein powder) to around 1530  $\text{cm}^{-1}$  for extruded plasticized sheets. This result indicated that strong interactions were engaged between casein and hydroxyl groups of glycerol. Besides, increase in glycerol concentration implied greater shifting of the peak from around 1510  $\text{cm}^{-1}$  to 1530  $\text{cm}^{-1}$  (for 13.2% glycerol) and 1535  $\text{cm}^{-1}$  (for 24.2% glycerol). This kind of peak shifting due to linkages of hydroxyl groups was reported by several authors on polymer blend (Wu et al., 2013). Caseins are protein with limited secondary structures (Horne & Banks, 2004). This lack of secondary structure and the good heat stability of caseins (Walstra, 1990) implied a lower process effect on protein morphology as confirmed by FTIR results.



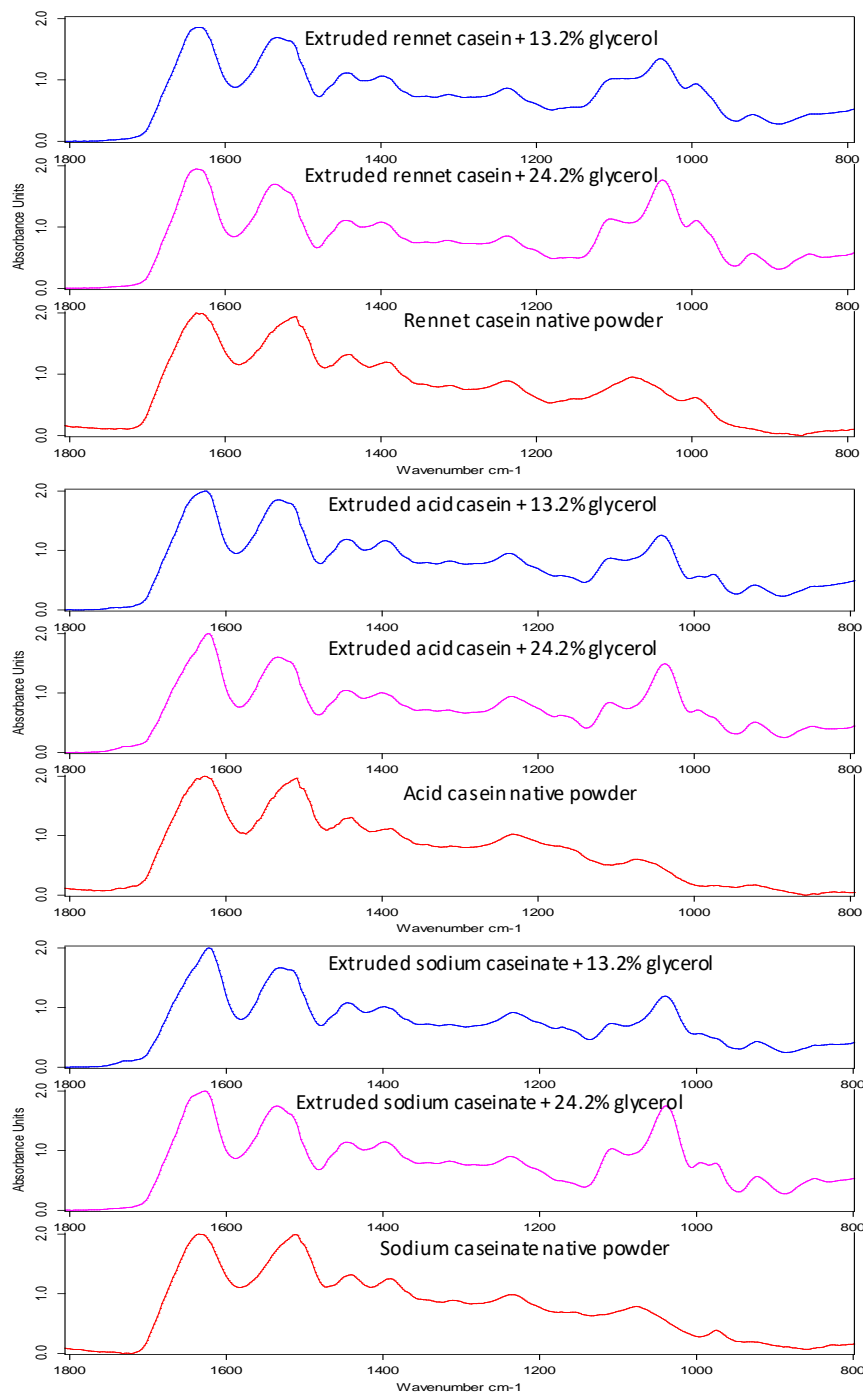


Figure II-5 : FTIR spectroscopy of native casein powders and extruded casein sheets.

## II.8.2 Water sensitive properties

### II.8.2.1 Moisture content, Solubility and Swelling index

Sheets were conditioned, dried and emerged in water to study the effect of casein source and amount of plasticizer added on casein based extruded sheets. Moisture content (MC), solubility (S) and Swelling index (SI) of casein based edible sheets plasticized with glycerol are presented in Table II-3. All casein based sheets containing 24.3% glycerol as plasticizer exhibited significantly higher moisture content value due to the hygroscopic nature of glycerol, which allows water binding through sheet surface wetting and moisture absorption (Kokoszka, Debeaufort, Lenart, & Voilley, 2010b).

Table II-3 : Values of water sensibility properties represented by moisture content (n=4), solubility (n=4), swelling index (n=4) and water vapor permeability (n=3).

Composition	Moisture content (%)	Solubility in water (%)	Swelling index in water (%)	Water vapor permeability ( $10^{12}$ * g.m/Pa.s.m <sup>2</sup> )
Rennet casein + 13.2 % Glycerol	8.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	16.9 ± 0.8 <sup>d</sup>	101.5 ± 22.7 <sup>ab</sup>	5,4 ± 1.0 <sup>b</sup>
Rennet casein + 24.2 % Glycerol	14.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	27.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	128.3 ± 27.9 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
Acid casein + 13.2 % Glycerol	6.5 ± 0.6 <sup>d</sup>	14.0 ± 1.9 <sup>e</sup>	70.5 ± 6.4 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
Acid casein + 24.2 % Glycerol	14.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	24.1 ± 0.3 <sup>c</sup>	97.6 ± 7.4 <sup>ab</sup>	10.9 ± 0.2 <sup>a</sup>
Sodium caseinate + 13.2 % Glycerol	9.3 ± 0.3 <sup>c</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	/	9.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
Sodium caseinate + 24.2 % Glycerol	19.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	/	10.3 ± 2.6 <sup>a</sup>

Concerning solubility, results proved that sodium caseinate sheets are fully soluble after 24 h immersion in water (even more, no sheet integrity was observed after 3 h of immersion). Soluble part of acid and rennet casein sheets were mostly related to the glycerol amount contained, which is soluble in water. As raw material, caseinate are well known to be highly water soluble and acid or rennet casein in the contrary are insoluble in water. Same results were observed after extrusion process for the different casein type sheets. These results showed impact of casein extraction treatment on the properties of edible sheets. Indeed, raw material should be selected according to the desirable food application requirements.

Besides, swelling index is also an important parameter for food application when sheets is going to be in contact with water. Swelling of all sheets were at least of 70% (weight increase) and this is probably due to high amount of active hydroxyl groups in sheets. Swelling index of acid casein sheet was lower than rennet casein sheet and this could be attribute to the loss of colloidal calcium phosphate in acid casein. Indeed, it has been demonstrated that amount of linked water depend on the quantity of colloidal calcium linked to the protein (Mariette, Tellier, Brule, & Marchal, 1993), which is the case for rennet casein, where colloidal calcium phosphate remains linked between caseins.

### II.8.2.2 Water sorption properties

Water sorption isotherms of casein based films containing 13.2% or 24.2% of glycerol are presented in Figure II-6.

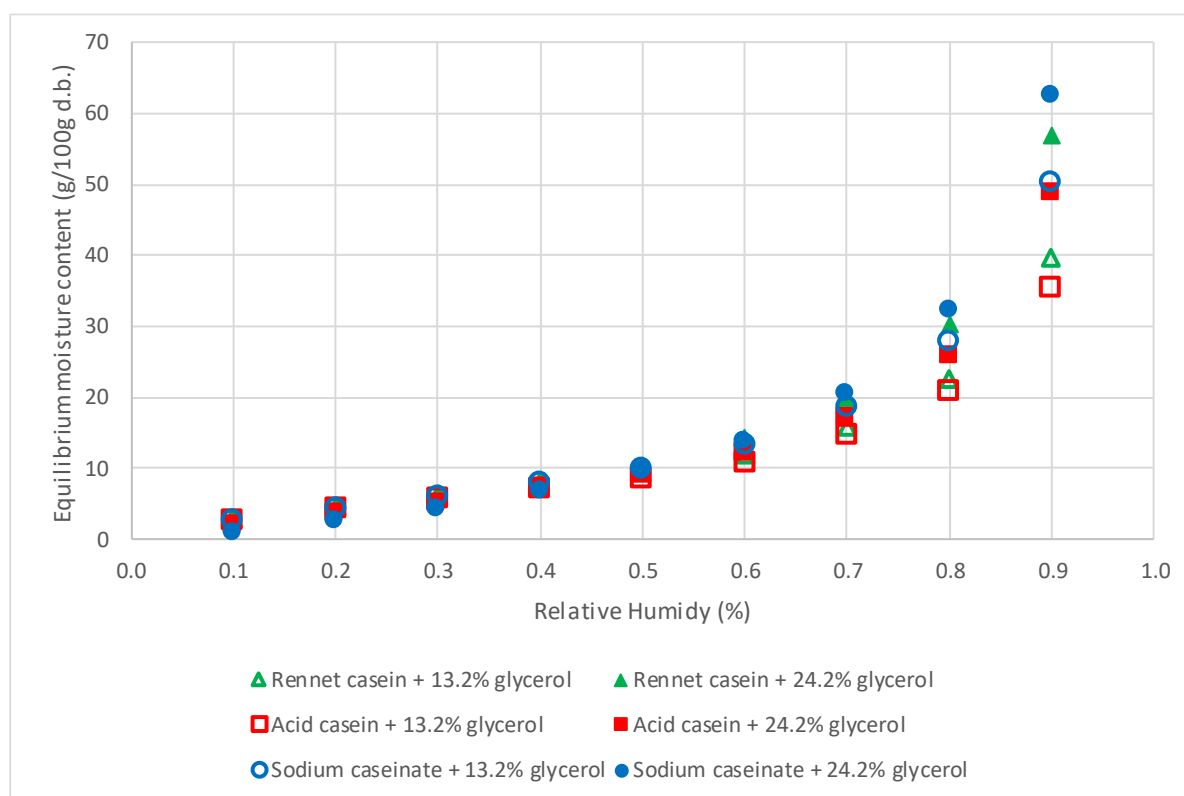


Figure II-6 : Adsorption isotherms at 23°C of casein based films plasticized with different glycerol concentration (13,2% or 24,2% (w/w)).

The sigmoid shape of water sorption isotherms is typical of many hydrophilic polymers and is frequently reported in the literature (Cuq, Gontard, Cuq, & Guilbert, 1997; Kristo, Koutsoumanis, & Biliaderis, 2008). All sorption isotherms could be separated in two parts. At  $a_w < 0.5$ , behaviour in moisture sorption is less depending on casein source and plasticizer amount and showed a gradual initial increase in moisture content, compared to the rapid increment in film water uptake at  $a_w > 0.5$ . Up to  $a_w = 0.5$ , films with less plasticizer

(13.2%) are more sensitive to moisture sorption since less binding sites are engaged with glycerol. Sorption increase at higher  $a_w$  has been reported with addition of plasticizers and low molecular weight constituents since they can adsorb more readily water than biopolymer at high  $a_w$  (Godbillot, Dole, Joly, Rogé, & Mathlouthi, 2006; Kristo et al., 2008). Indeed, at high  $a_w$  value, hydrogen bounding between protein matrix and glycerol could be disrupted by water sorption and interactions casein – water and glycerol – water could be promoted and allows increased moisture uptake and swelling of films.

Film water sorption depend on glycerol amount but also on casein source at high  $a_w$ . Sodium caseinate films are more sensitive to moisture sorption than rennet casein films and acid casein films. As previously described for swelling index, extraction method and solubility properties of casein raw material have a significant effect on water sensitivity of extruded films. Indeed, caseinate are well known to be water soluble while acid and rennet casein are non-soluble. Even if acid and rennet casein have similar solubility properties, they don't have similar water sensitivity due to their structure difference:  $\kappa$ -casein tail missing for rennet casein and colloidal calcium phosphate missing for acid casein for example.

### *II.8.2.3 Water vapor permeability (WVP)*

Water sorption previously described measure the water binding ability and water affinity of films depending on relative humidity conditions, whereas WVP correspond to diffusivity and mass transfer of moisture on a molecular level. Both parameters are of main importance and should be as low as possible in case of food packaging applications in order to avoid moisture transfer between the food and the surrounding atmosphere or between two components with different  $a_w$  (Gontard, Guilbert, & Cuq, 1992; McHUGH, Avena-Bustillos, & Krochta, 1993). As can be seen on Table II-3, casein films are good barrier to water vapor (WVP less than  $11 \cdot 10^{-12}$  g.m/Pa.s.m<sup>2</sup>). Indeed, WVP values are at least 5 to 300 times lower than other protein or polysaccharide films containing glycerol previously reported (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Aydt, Weller, & Testin, 1991; Banerjee & Chen, 1995; Chick & Ustunol, 1998; Gontard et al., 1992; Shen, Wu, Chen, & Zhao, 2010). These low WVP value compared to the literature could be due to the extrusion process, since previously literature mentioned concerns hydrocolloids films prepared by solution casting. Extrusion process could induce a denser structure through compressive and shear stresses effect in the process which could reduce WVP. This result was also observed by Dang et al. who found better WVP values (10 – 100 times lower) for starch containing chitosan prepared

by blown film extrusion (Dang & Yoksan, 2016) than similar material prepared by solution casting (Shen et al., 2010).

Based on WVP values, casein source and glycerol amount have a significant effect on the water vapor permeability. Indeed, high glycerol amount (24.2%) or use of water soluble sodium caseinate induced a weaker water barrier property. Plasticization by glycerol or other plasticizers has been reported to increase WVP of hydrocolloid film (Ahmadi et al., 2012; Razavi et al., 2015). Difference in WVP could be also explained by the casein film structure previously described (Table II-2) that showed higher porosity for caseinate than rennet and acid casein, which have denser material structure that could be correlated to the water barrier value.

#### *II.8.2.4 Water contact angles*

Film surface properties are analysed by water contact angle determined over time for 120 s for each film. Casein source seems to affect water absorption from films and it could be interesting to observe water absorption kinetic for each casein based film formulation. Moreover, water absorption kinetic is an important characteristic of polymers aimed for food packaging. Water contact angle is changing over time since all materials are hydrophilic and water sensitive, indicating that water droplet swells over time and that interactions are implied between film surface and water drop (Kokoszka, Debeaufort, Lenart, & Voilley, 2010a). The decrease of contact angle observed over time could also be attribute to a local change of material with an hydratation by absorption and swelling layer by layer of casein which will increase plasticization of films by water and increase absorption. Therefore, sorption kinetic was determined for this kind of hydrophilic hydrocolloid films and is presented in Figure II-7. Generally, contact angle measurements are much lower for hydrocolloid film than those obtained for hydrophobic materials as low-density polyethylene film (93.9-100.2°) or Plexiglas (91.5°) (Galus & Kadzińska, 2016b). Casein based materials have hydrophilic character in comparison to synthetic material but possess a more hydrophobic surface property than many protein films in the literature (except for sodium caseinate films). For example, Galus et al. found a contact angle <37.4° for whey protein films and Kokoszka et al. found a contact angle <32.3° for soy protein isolate-based films (Galus & Kadzińska, 2016b; Kokoszka et al., 2010b).

On Figure II-7A, sorption kinetic curves showed results in accordance with previously experiments, where plasticizer amount and casein source have an important role in water sensitivity of films. Indeed, caseinate are highly sensitive to water and even water soluble. In sodium caseinate case, water droplet will pass through the film and pierced it through

after 60 seconds for caseinate and 13.2% gly but only after 20 seconds with 24.2% glycerol (Figure II-7B).

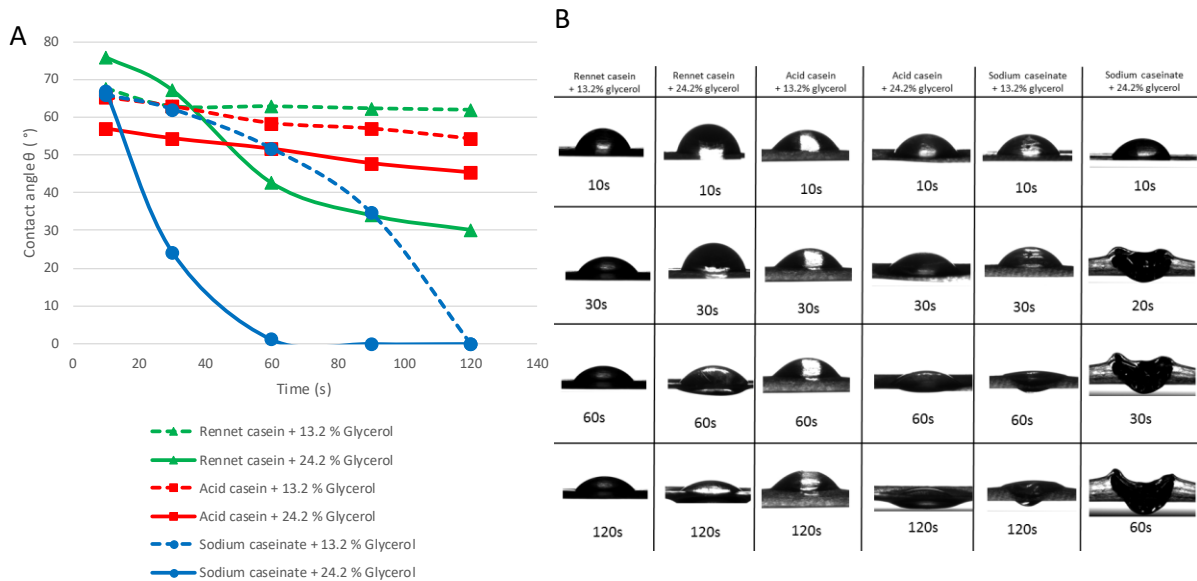


Figure II-7 : Water contact angles of casein based films plasticized with 13,2 or 24,2% of glycerol over time. A: Sorption kinetic of water droplet on film surface over 120 seconds (mean value of triplicates). B: Pictures of water droplet evolution over time and film swelling or degradation

Concerning insoluble casein films, rennet and acid casein have similar surface properties up to 60 seconds (contact angle between  $57^\circ$  and  $76^\circ$ ). After 60 seconds, surface properties and sorption kinetic between both type of caseins and films with different glycerol amount differ significantly. Films containing higher concentration of glycerol (highly hydrophilic substance) have been proved earlier to be more sensitive to water molecules and material will absorb and swell water molecules quickly and decrease in the water contact angle measured was observed (Figure II-7B). Rennet casein film with 24.2% glycerol looks very water sensitive at the surface with the highest decrease over time ( $76^\circ - 30^\circ$ ) and this sensitivity was also observed at high  $a_w$  on sorption kinetic analyses. It could be assumed that glycerol when added at high concentration is more located at the surface for rennet casein film than for acid casein film to explain different behaviour of acid and rennet casein films in sorption but no difference in water immersion tests (solubility and swelling). Acid casein films absorb less water molecule over time because of the absence of colloidal calcium phosphate after extraction of casein with acids. However, rennet casein film with low plasticizer amount have also a more hydrophobic surface which could be explain by the lack of  $\kappa$ -casein tail hydrolysed by chymosine. Indeed,  $\kappa$ -casein tail (glycomacropeptide) is more hydrophilic and bring casein micelle stability in milk by steric repulsion. It could be assumed that more hydrophobic casein zones are present on the

rennet casein film surface to explain its higher value for water surface contact angle (at low glycerol concentration).

### II.8.3 Mechanical properties

Figure II-8A shows Tensile Strength (TS) as function of Elongation at Break (EAB) for the 6 different formulations conditioned before testing at 50, 65 and 80% relative humidity and 30°C. Water sensitivity of casein based sheets could imply modifications of mechanical properties with different relative humidity conditioning. Edible sheets aimed for food packaging applications will encounter different food matrices having different  $a_w$ .

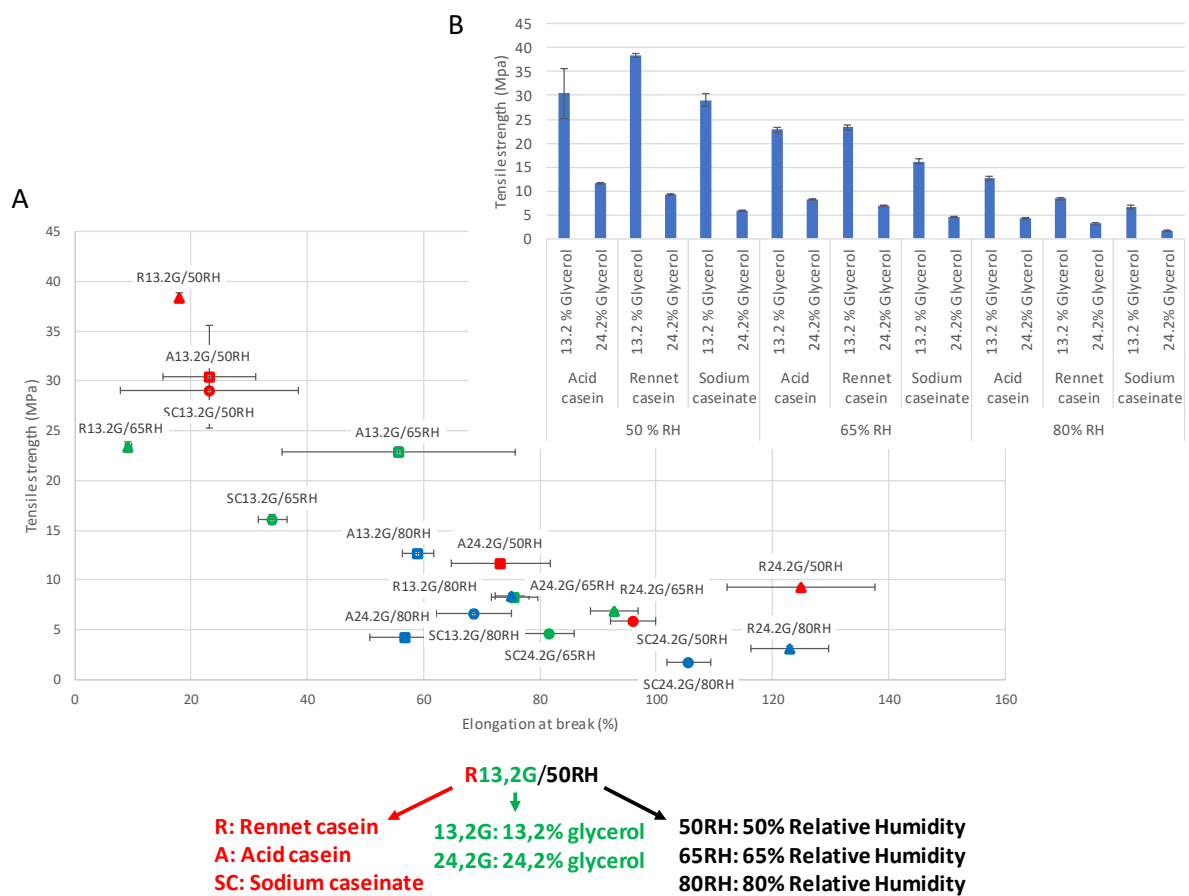


Figure II-8 : Mechanical properties of the different extruded casein based sheets conditioned at 50% relative humidity (RH), 65% RH or 80% RH and 30°C (n=5), A: represented as tensile strength as function of elongation at break and B: represented as tensile strength as function of relative humidity, casein source and glycerol concentration

In Figure II-8A, sheets with low glycerol amount have higher TS and lower EAB than sheets highly plasticized by glycerol or water. Indeed, sheets with 13.2% of glycerol and conditioned at 50 and 65% RH have a TS between 16 – 38 MPa and an EAB between 9 – 55% in comparison with more plasticized sheets, which have TS between 2 – 13 MPa and an EAB between 56 – 125%. Figure II-8B shows that glycerol and water molecules act as

plasticizers and decrease intermolecular interactions and by this way increase free volume and finally decrease mechanical resistance (Sobral et al., 2001).

Besides, the increase in glycerol concentration increases moisture absorption (correlated by water sensitivity testing results previously described), which contribute to the reduction of interactions between caseins. This modification of mechanical properties due to plasticizer effect has been widely reported (Cuq et al., 1997; Gontard et al., 1993; McHugh & Krochta, 1994).

Water is the main parameter before glycerol influencing mechanical properties (see Figure II-8B). Acid casein sheet that have been proved less water sensitive have similar TS and more particularly EAB conditioned at 50, 65 or 80% RH. In the contrary, EAB of more hydrophilic sheets that are sodium caseinate and rennet casein based sheet is greatly increased by higher relative humidity conditioning. Casein based sheets are highly influenced by glycerol amount at 50% RH since TS change from 38 ; 30 and 29 MPa to 9 ; 12 and 6 MPa and EAB change from 18 ; 23 and 23 % to 125 ; 73 and 96 % for rennet casein sheet, acid casein sheet and sodium caseinate sheet respectively. Sheets containing 13.2 % of glycerol have mechanical properties highly sensitive to moisture in comparison to sheets with high content of glycerol. This may be associated with saturation of casein binding sites by glycerol and water (Godbillot et al., 2006).

Through casein source choice as raw material, glycerol concentration and applied conditions, a wide range of mechanical properties can be obtained from 2 to 38 MPa for tensile strength and from 23 to 125% for elongation at break. This result is particularly interesting to aim at several applications. Indeed, appropriate casein source choice with specific protein properties, as solubility (caseinates) and sensibility to acids or calcium chelating agent (rennet casein), is a novel approach to produce edible sheets based on casein.



## II.9 Conclusions

Sheets were successfully prepared by extrusion process and especially for the first time at our knowledge for acid and rennet casein. Essential characteristics as mechanical and water sensibility were evaluated for potential usage of final sheet as food packaging system. Glycerol concentration, relative humidity condition and casein source have been proved to affect these properties.

A considerable range of properties are available with casein based sheets from water soluble and very water sensitive, sodium caseinate sheets to insoluble and with more hydrophobic surface (sorption kinetic by contact angle measurements), acid casein sheets.

Comparison of water vapor permeability and mechanical properties of hydrocolloid sheets within the literature is difficult due to relative humidity storage conditions for WVP and strain speed or thickness of sheets in case of tensile test since WVP and mechanical properties are dependent on these parameters. However, edible casein sheets reveal general good mechanical properties, appearance quality (transparency) and provide improved moisture barrier compared to other hydrocolloid sheets due to the dry production process.

Protein sheets are highly water sensitive and results presented in this work showed how glycerol emphasized this phenomenon confirmed by significant increase of swelling in water, water vapor permeability and water sorption.

Further research should be focused on improving the wide range of properties available with extruded casein through other type of extracted caseins (CO<sub>2</sub> precipitated casein or micellar casein, which for example will keep colloidal calcium phosphate and  $\kappa$ -casein tail), addition of other plasticizers or blends of biopolymers for example.

## II.10 Acknowledgements

Funding: This work was supported by Region Rhône-Alpes (under ARC Environnement project), Conseil Départemental de l'Ain and Bourg en Bresse Agglomération.

## II.11 Conclusions générales et perspectives - Chapitre II

Pour la première fois à notre connaissance, des matériaux à base de caséines acide et présure ont été transformés avec succès par extrusion. En ajoutant les matériaux à base de caséinate de sodium et les différentes conditions (plastifiant et humidité), un large éventail de propriétés ont pu être obtenues et sont décrites dans ce travail.

Les matériaux présentés dans cet article ont démontré des caractéristiques différentes selon le choix de matière première, c'est-à-dire de caséine, la concentration en glycérol (13,2 et 24,2% (m/m de caséine) ont été testés) et l'exposition aux molécules d'eau (sous forme liquide ou vapeur). En effet, les feuilles et les films de caséinate de sodium sont hydrosolubles et donc très sensibles aux molécules d'eau alors qu'au contraire les feuilles et les films de caséine acide sont insolubles dans l'eau et présentent également une surface de contact plus hydrophobe. Les feuilles et les films de caséine présure ont des caractéristiques encore différentes car elles sont insolubles mais restent très sensibles aux molécules d'eau à cause de la présence de calcium colloïdal absent dans la caséine acide. Les observations faites sur les différents matériaux à base de caséine semblent aller dans le sens des derniers modèles de micelles envisagées qui ont été présentés lors de la synthèse bibliographique. En effet, le calcium colloïdal joue un rôle important lorsqu'il est présent comme pour la caséine présure puisqu'il lie les caséines entre elles. La présence de caséine  $\kappa$  avec son extrémité hydrophile dans la caséine acide en périphérie du réseau micellaire décrit par plusieurs modèles de micelles pourrait expliquer la sensibilité en surface des matériaux à base de caséine acide.

Il a également été démontré dans ce travail que l'ajout d'un plastifiant dans ce type de matériau thermoplastique, et notamment le glycérol, va exacerber les phénomènes de sensibilité à l'eau. En effet, la nature hygroscopique du glycérol permet une liaison facilitée des molécules d'eau aux feuilles/films, ce qui engendre une augmentation du taux d'humidité, du taux de gonflement, du taux de sorption d'eau, de la perméabilité à la vapeur d'eau et de l'allongement à la rupture ; et une diminution de l'angle de contact face à une goutte d'eau et de la contrainte maximale.

Cet article met en avant la possibilité de transformer différentes caséines apportant ainsi des caractéristiques variées pouvant être valorisées selon les applications visées. Des méthodes d'extraction comme la précipitation au CO<sub>2</sub> ou bien la microfiltration permettent d'obtenir une caséine qui conserve son calcium colloïdal (comme la caséine présure) et également la partie glycoprotéique de la caséine  $\kappa$  (comme la caséine acide).

Cette caséine dite micellaire ouvre d'autres perspectives pour appréhender les relations structures/caractéristiques des matériaux fabriqués. A cela s'ajoute l'étude de différents plastifiants et mélanges de biopolymères qui pourrait être testés en extrusion pour élargir le champ des possibilités applicatives de ce type de biomatériau.

## II.12 Références

- Ahmadi, R., Kalbasi-Ashtari, A., Oromiehie, A., Yarmand, M.-S., & Jahandideh, F. (2012). Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk). *Journal of Food Engineering*, *109*(4), 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.11.010>
- Arrieta, M. P., & Peltzer, M. A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, *114*(4), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002>
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., López, J., Garrigós, M. del C., Valente, A. J. M., & Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, *121*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.015>
- Avena-Bustillos, R. J., & Krochta, J. M. (1993). Water Vapor Permeability of Caseinate-Based Edible Films as Affected by pH, Calcium Crosslinking and Lipid Content. *Journal of Food Science*, *58*(4), 904–907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09388.x>
- Aydt, T., Weller, C., & Testin, R. (1991). Mechanical and Barrier Properties of Edible Corn and Wheat Protein Films. *Biological Systems Engineering: Papers and Publications*. Retrieved from <http://digitalcommons.unl.edu/biosysengfacpub/195>
- Banerjee, R., & Chen, H. (1995). Functional Properties of Edible Films Using Whey Protein Concentrate. *Journal of Dairy Science*, *78*(8), 1673–1683. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76792-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76792-3)
- Barone, J. R., Schmidt, W. F., & Gregoire, N. T. (2006). Extrusion of feather keratin. *Journal of Applied Polymer Science*, *100*(2), 1432–1442. <https://doi.org/10.1002/app.23501>
- Belyamani, I., Prochazka, F., Assezat, G., & Debeaufort, F. (2014). Mechanical and barrier properties of extruded film made from sodium and calcium caseinates. *Food Packaging and Shelf Life*, *2*(2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.07.003>
- Brault, D., D'Aprano, G., & Lacroix, M. (1997). Formation of Free-Standing Sterilized Edible Films from Irradiated Caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(8), 2964–2969. <https://doi.org/10.1021/jf960955u>
- Chick, J., & Ustunol, Z. (1998). Mechanical and Barrier Properties of Lactic Acid and Rennet Precipitated Casein-Based Edible Films. *Journal of Food Science*, *63*(6), 1024–1027. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15846.x>
- Colak, B. Y., Gouanve, F., Degraeve, P., Espuche, E., & Prochazka, F. (2015). Study of the influences of film processing conditions and glycerol amount on the water sorption and gas barrier properties of novel sodium caseinate films. *Journal of Membrane Science*, *478*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.12.027>
- Colak, B. Y., Peynichou, P., Galland, S., Oulahal, N., Assezat, G., Prochazka, F., & Degraeve, P. (2015). Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability. *Industrial Crops and Products*, *72*, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.047>
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1997). Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(3), 622–626. <https://doi.org/10.1021/jf960352i>
- Dang, K. M., & Yoksan, R. (2016). Morphological characteristics and barrier properties of thermoplastic starch/chitosan blown film. *Carbohydrate Polymers*, *150*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.113>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.010>
- Farhan, A., & Hani, N. M. (2017). Characterization of edible packaging films based on semi-refined kappa-carrageenan plasticized with glycerol and sorbitol. *Food Hydrocolloids*, 64, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.034>
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2016a). Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.013>
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2016b). Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.013>
- Godbillot, L., Dole, P., Joly, C., Rogé, B., & Mathlouthi, M. (2006). Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chemistry*, 96(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.054>
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.-L. (1992). Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.-L. (1993). Water and Glycerol as Plasticizers Affect Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of an Edible Wheat Gluten Film. *Journal of Food Science*, 58(1), 206–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03246.x>
- Guan, Y., Liu, X., Zhang, Y., & Yao, K. (1998). Study of phase behavior on chitosan/viscose rayon blend film. *Journal of Applied Polymer Science*, 67(12), 1965–1972. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19980321\)67:12<1965::AID-APP2>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980321)67:12<1965::AID-APP2>3.0.CO;2-L)
- Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., & de la Caba, K. (2010). Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.039>
- Hernandez-Izquierdo, V. m., & Krochta, J. m. (2008). Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation—A Review. *Journal of Food Science*, 73(2), R30–R39. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x>
- Hernandez-Izquierdo, V. M., Reid, D. S., McHugh, T. H., De J. Berrios, J., & Krochta, J. M. (2008). Thermal Transitions and Extrusion of Glycerol-Plasticized Whey Protein Mixtures. *Journal of Food Science*, 73(4), E169–E175. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00735.x>
- Horne, D. S., & Banks, J. M. (2004). Rennet-induced Coagulation of Milk. In P. L. H. M. Patrick F. Fox Timothy M.Cogan and Timothy P.Guinee (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Vol. 1, pp. 47–70). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80062-9](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80062-9)
- Jangchud, A., & Chinnan, M. S. (1999). Properties of Peanut Protein Film: Sorption Isotherm and Plasticizer Effect. *LWT - Food Science and Technology*, 32(2), 89–94. <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0498>
- Jouki, M., Khazaei, N., Ghasemlou, M., & HadiNezhad, M. (2013). Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.077>
- Kasprzak, M., & Rzedzicki, Z. (2007). Effect of bath temperature and soaking time on the dynamics of water holding capacity of everlasting pea-wheat extrudates. *International Agrophysics*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012039793>

- Kinsella, J. E. (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3), 197–262. <https://doi.org/10.1080/10408398409527401>
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A., & Voilley, A. (2010a). Liquid and vapour water transfer through whey protein/lipid emulsion films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1673–1680. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4001>
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A., & Voilley, A. (2010b). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, 20(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.008>
- Krishna, M., Nindo, C. I., & Min, S. C. (2012). Development of fish gelatin edible films using extrusion and compression molding. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.002>
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.003>
- Krochta, J. (2002). Proteins as Raw Materials for Films and Coatings. In *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420031980.ch1>
- Lai, H.-M., & Padua, G. W. (1997). Properties and Microstructure of Plasticized Zein Films. *Cereal Chemistry*, 74(6), 771–775. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.6.771>
- Mariette, F., Tellier, C., Brule, G., & Marchal, P. (1993). Multinuclear NMR study of the pH dependent water state in skim milk and caseinate solutions. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 175–188. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027497>
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., & Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09387.x>
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Sorbitol- vs Glycerol-Plasticized Whey Protein Edible Films: Integrated Oxygen Permeability and Tensile Property Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 841–845. <https://doi.org/10.1021/jf00040a001>
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2005). Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background. *Food Quality and Preference*, 16(5), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.09.003>
- Pavlath, A. E., & Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 1–23). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1)
- Pereira, R. N., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Effects of Electric Fields on Protein Unfolding and Aggregation: Influence on Edible Films Formation. *Biomacromolecules*, 11(11), 2912–2918. <https://doi.org/10.1021/bm100681a>
- Razavi, S. M. A., Mohammad Amini, A., & Zahedi, Y. (2015). Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. *Food Hydrocolloids*, 43, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.028>
- Rouilly, A., Mériaux, A., Geneau, C., Silvestre, F., & Rigal, L. (2006). Film extrusion of sunflower protein isolate. *Polymer Engineering & Science*, 46(11), 1635–1640. <https://doi.org/10.1002/pen.20634>

- Shen, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.003>
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 423–432. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3)
- Stinco, C., Fernández-Vázquez, R., Meléndez-Martínez, A., Heredia, F., Mejías, E., & Vicario, I. (2012). Influence of Different Backgrounds on the Instrumental Color Specification of Orange Juices. In J. Caivano & M. del Pilar, *Color in Food* (pp. 143–152). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11878-18>
- Swaisgood, H. E. (1993). Review and Update of Casein Chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3054–3061. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77645-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77645-6)
- Ullsten, N. H., Cho, S.-W., Spencer, G., Gällstedt, M., Johansson, E., & Hedenqvist, M. S. (2009). Properties of extruded vital wheat gluten sheets with sodium hydroxide and salicylic acid. *Biomacromolecules*, 10(3), 479–488. <https://doi.org/10.1021/bm800691h>
- Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Walstra, P. (1990). On the Stability of Casein Micelles<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, 73(8), 1965–1979. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3)
- Wang, Y., & Padua, G. W. (2003). Tensile Properties of Extruded Zein Sheets and Extrusion Blown Films. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288(11), 886–893. <https://doi.org/10.1002/mame.200300069>
- Wu, J., Zhong, F., Li, Y., Shoemaker, C. F., & Xia, W. (2013). Preparation and characterization of pullulan–chitosan and pullulan–carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.002>
- Zarzycki, P., Kasprzak, M., Rzedzicki, Z., Sobota, A., Wirkijowska, A., & Sykut-Domańska, E. (2015). Effect of blend moisture and extrusion temperature on physical properties of everlasting pea-wheat extrudates. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6663–6670. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1754-y>
- Zhang, J., Mungara, P., & Jane, J. (2001). Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer*, 42(6), 2569–2578. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00624-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00624-8)

# Chapitre III. Antimicrobial potential of organic acids against Escherichia coli and their incorporation in rennet casein based material

Elodie Chevalier<sup>1,2</sup>, Asma Chaabani<sup>1</sup>, Gilles Assezat<sup>2</sup>, Frédéric Prochazka<sup>2</sup>,

Nadia Oulahal<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, Plateforme Alimentec, rue Henri de Boissieu F-01000 Bourg En Bresse, France

<sup>2</sup> Université de Lyon, F-69003, France ; CNRS, UMR5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, F-42023, Saint- Etienne, France

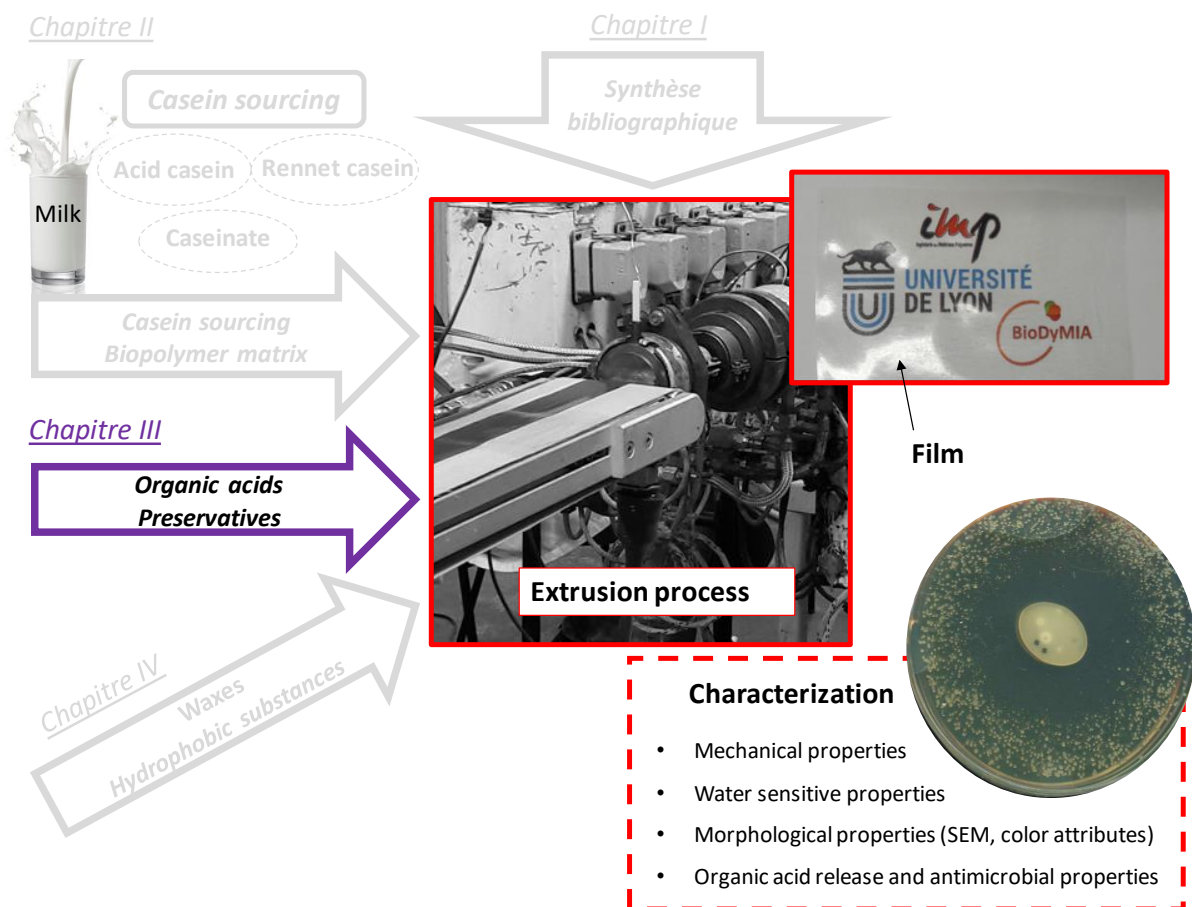


Figure III-1 : Organisation générale des chapitres du manuscrit – Chapitre III



## Table des figures

Figure III-1 : Organisation générale des chapitres du manuscrit – Chapitre III.....	III-154
Figure III-2 : (A) Sheets of rennet casein extruded through a die with a rate of 2 kg.h <sup>-1</sup> of protein powder. (B) Discs of rennet casein based material (transparent or red coloured) cut for agar disc diffusion assays. .....	III-163
Figure III-3 : Strain growth over time (6 days) without and with addition of organic acid salts in broth. Different concentrations tested of (A): Potassium sorbate; (B): Sodium benzoate and (C): Calcium propionate.....	III-170
Figure III-4 : Percentage of biodegradation of the different formulations with and without antimicrobial agents, according to ISO14851 (1999). LDPE: Low density polyethylene; IM: Industrial material with 22.5% ethanol; Extruded materials with: E: 17% Ethanol; C: 5° acetic acid; A: 10° acetic acid; B2: 2% Sodium benzoate; S2: 2% Potassium sorbate; P2: 2% Calcium propionate; B2S2: 2% Benzoate and 2% Sorbate; B2P2: 2% Benzoate and 2% Propionate. ....	III-178
Figure III-5 : Schéma de fabrication de pâtes pressées cuites comme le Comté et de l'étape de dépôt des étiquettes en caséine ( <a href="http://www.produits-laitiers.com">www.produits-laitiers.com</a> ) .....	III-181
Figure III-6 : Suivi chronologique de la maturation des fromages et de l'évolution visuelle des étiquettes en caséine pour l'essai N°1 .....	III-183
Figure III-7 : Suivi chronologique de la maturation des fromages et de l'évolution visuelle des étiquettes en caséine pour l'essai N°2.....	III-184
Figure III-8 : Schématisation du calcul de la charge de microorganismes recouvrant les étiquettes et se développant sur milieu CRBM à l'aide du logiciel ImageJ.....	III-185

## Table des tableaux

Table III-1 : Coded material names and their main characteristics for antimicrobial properties study	III-164
Table III-2 : Box-Behnken design of experiment with 3 factors: Potassium sorbate, sodium benzoate and calcium propionate and 1 response (mean of duplicate experiments): Growth reduction of Escherichia coli	III-166
Table III-3 : Solutions proposed by the model for response optimization corresponding to given criteria.	III-173
Table III-4 : Diameters of inhibition in mm and typical inhibition zone pictures of different formulations of materials against Escherichia coli ATCC10536 after 6 days of incubation at 15 °C (n=8 replicates; different letters indicate significantly different levels within each formulation, P < 0.05). IM: Industrial material with 22.5 % ethanol; Extruded materials with: E: 17 % Ethanol; C: 5° acetic acid; A: 10° acetic acid; B2: 2 % Sodium benzoate; S2: 2 % Potassium sorbate; P2: 2 % Calcium propionate; B2S2: 2 % Benzoate and 2% Sorbate; B2P2: 2 % Benzoate and 2 % Propionate.	III-174
Table III-5 : Formulations testées sous forme d'étiquettes sur de fromages de Comté dans des caves d'affinage de la société Monts&Terroirs	III-180
Table III-6 : Détermination de la charge de microorganismes recouvrant les étiquettes et se développant sur milieu CRBM comme décrit dans le schéma en Figure III-8 (n=3). L'analyse statistique est réalisée séparément pour chaque essai.	III-186

# Chapitre III : Potentiel antimicrobien d'acides organiques contre *Escherichia coli* et leur incorporation dans un matériau à base de caséine présure

## III.1 Introduction

Ce troisième chapitre présenté sous la forme d'un article scientifique (en appliquant la mise en forme du journal en question) est en cours de révision dans la revue « *International Dairy Journal* » qui publie des recherches concernant les avancées technologiques et scientifiques impliquant les produits laitiers.

Une attente socio-économique actuelle pour des produits sains, naturels, peu transformés, prêts à consommer ou faciles à préparer a fait émerger une demande de qualité et de sécurité des denrées de plus en plus exigeante (Mellinas et al., 2016). La recherche persistante de l'allongement de la durée de vie des produits accompagne à présent le développement des nouveaux matériaux d'emballage, ce qui inclus les matériaux actifs, intelligents et les systèmes comestibles. Ces nouveaux matériaux d'emballage actifs et intelligents en protégeant les aliments vont permettre une réduction des déchets alimentaires voir une réduction des emballages lorsqu'ils sont comestibles et ainsi répondre également à une attente environnementale supplémentaire (Realini & Marcos, 2014). De plus, d'un point de vue industriel, les films comestibles à base d'hydrocolloïdes sont plus coûteux dû au coût de la matière première, il est donc important d'apporter une valeur ajoutée supplémentaire à ce type de matériau pour pouvoir les vendre de manière à concurrencer les matériaux synthétiques.

Ce chapitre est consacré à l'étude du potentiel de fonctionnalisation de films extrudés à base de caséine présure. La caséine présure est actuellement utilisée pour le développement d'étiquettes de fromage, d'où son choix dans les futurs chapitres concernant le potentiel antimicrobien des matériaux comestibles fabriqués. En outre, les matériaux à base de caséine présure possèdent deux caractéristiques primordiales dans la suite de cette recherche. Dans le deuxième chapitre, il a été démontré que les films à base de caséine présure sont insolubles mais, sont également très sensibles aux molécules d'eau et notamment, ils gonflent fortement, ce qui est un avantage conséquent pour le relargage induit des acides organiques.

Cette étude est notamment basée sur l'action antimicrobienne d'acides organiques contre la souche d'*Escherichia coli* ATCC 10536 comme modèle. Le sorbate de potassium (E202), le benzoate de sodium (E211) et le propionate de calcium (E282) sont des sels d'acides organiques approuvés comme conservateurs alimentaires. Ces sels, plus solubles que les acides, sont couramment utilisés pour leurs capacités antimicrobiennes et leurs faibles coûts dans les denrées alimentaires. De nombreuses études ont reporté un ajout efficace d'acides organiques dans des films ou enrobages comestibles permettant la protection et l'allongement de la durée de vie de produits alimentaires (S. Flores, Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2007; Karina Flores, Costa, Yamashita, Noemi Gerschenson, & Grossmann, 2010; Kristo, Koutsoumanis, & Biliaderis, 2008; Rocha, Loiko, Tondo, & Prentice, 2014; Sayanjali, Ghanbarzadeh, & Ghiassifar, 2011; Shen, Wu, Chen, & Zhao, 2010; Türe, Gällstedt, & Hedenqvist, 2012). Cependant, de fortes variations de l'efficacité peuvent être observées en fonction de la formulation de la matrice support, des agents actifs, des microorganismes testés et des denrées alimentaires (Fernández-Pan, 2016). Les agents chimiques antimicrobiens tels que les acides organiques ont l'avantage d'être physiologiquement inertes, d'être efficaces à des pH faibles et surtout d'avoir une saveur neutre. Certains auteurs ont observé une incompatibilité des acides polaires (sorbate de potassium par exemple) avec des matrices de films apolaires telles que le polyéthylène basse densité après extrusion, ce qui a réduit l'activité antimicrobienne du composé (Devlieghere, Vermeiren, Bockstal, & Debevere, 2000). Des biopolymères comme les films à base de gluten de blé, plus polaires, ont quant à eux montré une bonne incorporation du sorbate de potassium et une activité antifongique intéressante après transformation par extrusion à 130°C (Türe et al., 2012). Ces essais laissent présager le potentiel actif d'une matrice de caséine transformée par extrusion pour le support d'acides organiques.

Ainsi, l'objectif de cette étude est d'analyser différents sels d'acides organiques et plusieurs concentrations de ces derniers ainsi que leurs associations sur une souche modèle d'*Escherichia coli*. Pour cela, un plan d'expérience a été mis en place et une modélisation en surface de réponse a permis de mettre en évidence des choix de conservateurs et de concentrations optimum qui ont ensuite été testés par incorporation à des films de caséine présure extrudés.

L'industrie fromagère est tout particulièrement demandeuse d'étiquettes en caséine permettant une bonne traçabilité des fromages, ce qui a été envisagé dans ce projet par la fonctionnalisation du matériau par des agents actifs antimicrobiens. Une concentration en molécules actives bien inférieure à ce qui est couramment testée en littérature a été testée afin de protéger la zone de l'étiquette sans affecter le fromage et ses qualités

organoleptiques. De plus, afin de mimer les conditions de stockage des fromages en cave d'affinage, les études ont été réalisées à 15°C. Cette température, particulière aux fromages affinés ou aux produits secs, est pour la première fois utilisée pour établir les capacités antimicrobiennes des acides organiques.

### III.2 Abstract

Antimicrobial activities of organic acid salts are well described in literature, but there is limited information on their effect when used in combination. Organic acids have a long history as being generally recognized as safe food preservatives. They are widely used to inhibit or delay the growth of recognized food pathogens. In this work, different preservatives - potassium sorbate, sodium benzoate and calcium propionate - were studied at 15°C for their antimicrobial properties against *Escherichia coli* ATCC 10536. 15°C is a non-common incubation temperature for *E. coli* but is often used for food storage of cheeses (in ripening cellars) or dry foods. A design of experiment was undertaken to modelize antimicrobial potential of organic acid salts against *E. coli* in this specific condition (15°C) depending on concentration and antimicrobial agents association. Organic acids were then tested in casein based edible film formulations (2% w/w of protein). Active rennet casein based films were produced using a twin screw extruder and antimicrobial activity was studied by agar disc diffusion method against *E. coli* at 15°C for 6 days. Films containing benzoate and sorbate are more efficient than films containing propionate and no synergy results from incorporation of a combination of preservatives. Extruded casein based films showed an interesting antimicrobial activity even at low antimicrobial concentration (25 times under the minimal inhibitory concentration). Preservatives reduction is of main interest for food industries. The results of this study suggest that extruded casein based film could be an interesting alternative for food safety and food preservation.

### III.3 Keywords

Rennet casein; extrusion; edible film; antibacterial activity; organic acid, *Escherichia coli*

### III.4 Introduction

Over last decades, active films and coatings based on natural polymers have gained interest for food packaging applications (Han & Aristippos, 2005; Kuorwel, Cran, Sonneveld, Miltz, & Bigger, 2011). Films made of polysaccharides or proteins are emerging as one of the most promising alternative to traditional food packaging systems based on petroleum resources (Cha & Chinnan, 2004; Hernandez-Izquierdo, Reid, McHugh, De J. Berrios, & Krochta, 2008). Films can be carriers of antimicrobial substances, antioxidants, dyes and vitamins, thus improving sensory properties and preservation of food products. Antimicrobial as active component for example could be released during food storage to prevent microorganisms growth and to extend food shelf life.

Hydrocolloid films are produced by two processes, defined as 'wet' or 'dry' processes. 'Wet' process corresponds to solubilisation of protein or polysaccharides in an aqueous solution and solvent evaporation to obtain a film. Caseinates are soluble proteins in water, which facilitates solubilization and film forming ability during wet casting process (Arrieta et al., 2014; Atarés, Bonilla, & Chiralt, 2010; Avena-Bustillos & Krochta, 1993). Wet casting process is a batch process that requires solvent and energy for solvent evaporation step, which led to laboratory applications but few industrial developments.

On the contrary, extrusion as 'dry' process allows low residence time of ingredient which could be of main interest in case of addition of some antimicrobial agents (Belyamani, Prochazka, & Assezat, 2014; Colak et al., 2015, 2016; S. K. Flores, Costa, Yamashita, Gerschenson, & Grossmann, 2010; Hernandez-Izquierdo & Krochta, 2008). The extrusion process is a more cost-efficient process to transform casein compared to wet casting.

Proteins and particularly milk proteins are good raw material to produce edible films (Khwaldia, Perez, Banon, Desobry, & Hardy, 2004). Caseinates (sodium, calcium, magnesium or ammonium caseinates) corresponding to the neutralized form of acid casein and whey proteins have been widely studied for their ability to form films. However, insoluble milk proteins as acid or rennet casein on the contrary are not well known as film forming material. Rennet or acid casein as raw materials have been used in few studies. Acid and rennet caseins are often immersed in alkaline solutions, pH decreases and neutralization of casein form caseinate, which have better film forming ability (Chick & Hernandez, 2002; Chick & Ustunol, 1998).

Caseinates have been proved to be good film carriers for antimicrobials delivering (Colak et al., 2015, 2016; Kristo et al., 2008). However, rennet casein obtained by enzymatic coagulation (through proteolytic enzymes as rennet), which is insoluble in water has never been described, to the best of our knowledge, as film carrier for preservatives.

Casein films are legally required for quality proof and traceability of some European protected designation of origin cheese. For the moment, traceability is not well assured due to cheeses' rind flora which quickly covers labels during cheese ripening. The aim of the study is to provide an edible and antimicrobial casein based material produced by an easily scale up process which could be commercialized to cheese manufacturers.

Organic acids are well known to be efficient food preservatives and their salts are preferentially used in food industry (S. K. Flores et al., 2010; Neetoo, Ye, & Chen, 2008; Stanojevic & Comic, 2009). Moreover, some organic acids are allowed in cheese production process.

The aim of this study is to analyse different concentrations of organic acid salts and their interactions on *Escherichia coli* bacteria growth. First, the analysis of antimicrobial potential of organic acid was made by broth microdilution method through the development of a response surface model. Then, organic acids were incorporated in extruded casein based material and their antimicrobial activity was assessed. *Escherichia coli* was selected as a model for Gram-negative bacteria to test the antibacterial activity of organic acid in a 15°C solution or incorporated in extruded rennet casein. Material presented in this work is aimed as material replacement for cheese label and for this reason cheese ripening cave conditions (high relative humidity and 15°C temperature) were applied in experiments.



## III.5 Materials and methods

### III.5.1 Materials/Chemicals

Rennet casein native powder was purchased from Eurial Ingredients (Nantes, France). Glycerol, potassium sorbate and calcium propionate were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Acetic acid and sodium benzoate came from Acros organics (Geel Belgium). Ampicillin antibiotic was purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany). Ethanol 96° was supplied by Carlo Erba reagents (Val de Reuil, France).

### III.5.2 Active rennet casein film preparation

Rennet casein films were prepared through a dry process with a co-rotating twin screw extruder (Clextral, BC21, Firminy, FRANCE) as previously described by Colak et al. with changes (Colak et al., 2015). Rennet casein and antimicrobial agents (potassium sorbate, calcium propionate or sodium benzoate) at 2% (w/w of casein) were introduced into the first zone of the extruder. Glycerol (17.6 % (w/w) powders) and a solution of acetic acid 5° (41.1 % (w/w) powders) were added into the second zone. Temperature from hopper to die (5 cm wide and 1 mm thick) ranged from 10°C to 75°C. Films thickness is about 600  $\mu\text{m}$  +/- 100  $\mu\text{m}$  depending on formulation (determined with a digital micrometer). Residence time in twin screw extruder with a powder flow rate of 2 kg/h and screw speed at 170 tr/min was determined between 2 and 6 minutes. The prepared films were stored in plastic bags in cold room (4°C) until further experiments. Figure III-2 represents the thermoplastic extrusion process of rennet casein film and discs cut from this film for antimicrobial analysis. The obtained materials differ only by the antimicrobial agent type added to the process and its concentration.

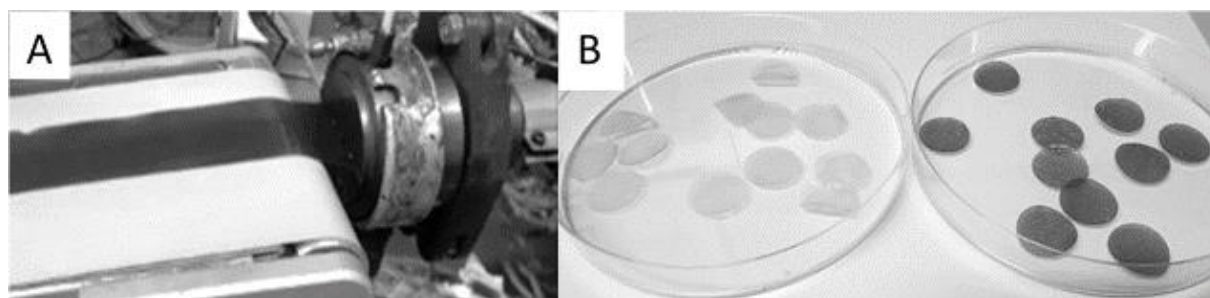


Figure III-2 : (A) Sheets of rennet casein extruded through a die with a rate of 2 kg.h<sup>-1</sup> of protein powder. (B) Discs of rennet casein based material (transparent or red coloured) cut for agar disc diffusion assays.

Extruded materials were compared to a material (casein film) provided by a cheese label manufacturer that will be called “industrial material” in this work and which is produced by a compression process. This process induces high pressure and high temperature (between 100 and 150 °C) for several hours. The formulation of this material is similar to the extruded formulation with the difference of an addition of 20 % (w/w of casein) of ethanol (96°) during the process.

The composition of the different formulations is presented in Table III-1.

*Table III-1 : Coded material names and their main characteristics for antimicrobial properties study*

IM	Industrial material (ethanol 96° at 20% w/w protein)
C	Control: extruded material without antimicrobial agent
B2	Sodium benzoate 2% (w/w protein)
S2	Potassium sorbate 2% (w/w protein)
P2	Calcium propionate 2% (w/w protein)
B2S2	Sodium benzoate 2% (w/w protein) + Potassium sorbate 2% (w/w protein)
B2P2	Sodium benzoate 2% (w/w protein) + Calcium propionate 2% (w/w protein)
E	Ethanol 96° at 17% (w/w protein)
A	Acetic acid 10° instead of acetic acid 5° (in process)

### III.5.3 Antibacterial activity

#### *III.5.3.1 Bacteria inoculum preparation*

*Escherichia coli* ATCC10536 from stock culture maintained at -20 °C in Tryptic Soy Broth (TSB) containing 15 % (w/v) of glycerol was subcultured in TSB (Biokar diagnostics, Beauvais, France) at 37 °C for 8 h, then first precultured for 14 h at 37 °C and finally precultured again for 4 h at 37 °C each time at 10 % (v/v) of previous culture, to obtain a working culture containing approximately 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>.

### III.5.3.2 Modeling of organic acid salts antimicrobial potential by microdilution method

#### III.5.3.2.1 Preparation of antimicrobial agents' solution

Organic acid salt (sodium benzoate: E211, potassium sorbate: E202 and calcium propionate: E282) were prepared at different concentration to test concentration in broth dilution method from 0.2 g.L<sup>-1</sup> to 20 g.L<sup>-1</sup>. Solutions were stored at 4°C protected from light while waiting for experiment. All these ingredients are classified as food additives or GRAS compounds by the European Food Safety Authority (EFSA) and the United States Food and Drug Administration (US FDA).

Ampicillin was tested as a positive antibacterial substance with a final concentration of 0.001 g.L<sup>-1</sup> which is the MIC found for *Escherichia coli* ATCC10536 by Al-Zoreky et al. after 48h at 30°C (Al-Zoreky, 2009).

#### III.5.3.2.2 Broth microdilution method

The antibacterial activity of a mixture of 3 organic acid salts was analysed by the broth dilution method against *Escherichia coli*. The assay was performed as described by Bouarab-Chibane et al. with changes (Bouarab-Chibane et al., 2017). 270 µL of TSB (Tryptone Soy Broth) alone (control) or with organic acid salts (final concentrations: 0-5 mg mL<sup>-1</sup>) were mixed either with 30 µL of bacterial inocula (10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) or 30 µL of sterile TSB (control) in each well of the 100 wells microplate and incubated at 15 °C for 6 days in a Bioscreen C apparatus (Oy Growth Curves AB Ltd., Helsinki, Finland). The optical density of the culture was monitored every 15 min in the 420–580 nm wavelength range (OD<sub>420–580</sub>). Ampicillin as antibiotic was added in the assay as positive control for *E. coli* inhibition. Percent of Growth Reduction (GR) was calculated after 6 days at 15°C between OD (Optical Density) of well with the strain only and OD of well with antimicrobials, as given by the following equation:

$$\text{GR (after 6 days)} = 100 - \frac{\text{OD } E. coli - \text{OD } E. coli \text{ with antimicrobial (s)}}{\text{OD } E. coli}$$

Antimicrobial agents were tested in order to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and a design of experiment was made to determine influence of mixture of different component at 15°C and for 6 days. All experiments were carried out in triplicate. Incubation temperature of 15°C was chosen according to application aimed for films on cheeses (cheese ripening cave temperature) and on dry food.

### III.5.3.2.3 Design of experiment

Response Surface Methodology (RSM) was chosen to evaluate the influence of 3 organic acids on the growth of *Escherichia coli* at 15 °C so as to study the combination of the 146 antimicrobial agents. A three-level-three-factor, Box-Behnken response surface design with 3 factors (Potassium Sorbate, Sodium Benzoate and Calcium Propionate) was applied to assess the effect of combination of the different antimicrobial agents. All experimental runs are listed in Table III-2. The RSM was implemented to the experimental data using a commercial statistical package, Design Expert version 6.0.4 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Analysis of variance (ANOVA) was used to examine the statistical significance of the model terms. The same software was used for response optimization.

Table III-2: Box-Behnken design of experiment with 3 factors: Potassium sorbate, sodium benzoate and calcium propionate and 1 response (mean of duplicate experiments): Growth reduction of *Escherichia coli*

Std	Run	Factor 1 A: Potassium sorbate g.L <sup>-1</sup>	Factor 2 B: Sodium benzoate g.L <sup>-1</sup>	Factor 3 C: Calcium propionate g.L <sup>-1</sup>	Response 1 Growth Reduction %
6	1	0	5	2.5	96 ± 6 <sup>ab</sup>
12	2	2.5	5	5	100 ± 0 <sup>a</sup>
10	3	2.5	2.5	2.5	99 ± 1 <sup>a</sup>
4	4	5	2.5	5	100 ± 0 <sup>a</sup>
17	5	2.5	0	0	95 ± 7 <sup>ab</sup>
15	6	5	0	2.5	98 ± 3 <sup>ab</sup>
1	7	2.5	2.5	2.5	85 ± 24 <sup>ab</sup>
3	8	2.5	5	0	100 ± 0 <sup>a</sup>
7	9	2.5	2.5	2.5	87 ± 21 <sup>ab</sup>
9	10	0	2.5	0	84 ± 18 <sup>ab</sup>
13	11	2.5	2.5	2.5	86 ± 7 <sup>ab</sup>
5	12	2.5	2.5	2.5	95 ± 8 <sup>ab</sup>
8	13	0	2.5	5	100 ± 0 <sup>a</sup>
2	14	5	2.5	0	96 ± 1 <sup>ab</sup>
16	15	0	0	2.5	39 ± 14 <sup>c</sup>
14	16	5	5	2.5	95 ± 9 <sup>ab</sup>
11	17	2.5	0	5	98 ± 6 <sup>ab</sup>
19	18	5	5	0	100 ± 0 <sup>ab</sup>
20	19	5	0	5	100 ± 0 <sup>a</sup>
18	20	0	5	5	99 ± 2 <sup>ab</sup>
22	21	5	5	5	93 ± 11 <sup>ab</sup>
21	22	5	0	0	89 ± 9 <sup>ab</sup>
24	23	0	5	0	93 ± 6 <sup>ab</sup>
23	24	0	0	5	80 ± 29 <sup>b</sup>

### III.5.3.3 Antimicrobial agents incorporation in extruded casein based material analysed by agar disc diffusion method

To evaluate the capacity of retention or release of organic acid salts from extruded rennet casein material and its antimicrobial capacity, agar disc diffusion method was used. Discs of 1.5 cm diameter were cut from extruded material strip.

TSA (Tryptic Soy Agar, Biokar diagnostics, Beauvais, France), plates were inoculated in surface with *Escherichia coli* ATCC10536  $10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>. The material was then disposed on the middle of Petri dishes. Inoculated plates containing the material to test were placed in humid chamber conditions for the time of the experiment. Plates were placed for 2 hours at 4°C (to allow diffusion of antimicrobial agents without strain growth) before incubation at 15°C. Scans of the Petri dishes after 6 days of incubation were analysed using software ImageJ to determine inhibition area for each material following this equation:

$$\text{Inhibition Area (IA) (mm}^2\text{)} = \text{Area of inhibition} - \text{Area of material}$$

This assay was performed 3 times in duplicate for each material.

### III.5.4 Biodegradability

Biodegradability was studied through biochemical oxygen demand test. Assays were carried out in aqueous aerobic environment conditions according to standard ISO 14851:1999. Method used as previously described by Colak et al. with small modifications (Colak et al., 2015). The materials to be tested were cut in small pieces (less than 2 mm<sup>2</sup> of surface) to create a good exchange surface with test medium. Test bottles were incubated at 23°C in the dark with stirring for 60 days. Experiments were carried out in duplicate and cellulose filter as well as polyethylene low density film were prepared as other materials to serve as positive control and negative control for biodegradation. The Theoretical Oxygen Demand (ThOD) is determined for every substances  $C_cH_hCl_{cl}N_nS_sP_pNa_{na}O_o$  with a relative molecular mass (Mr) contained in the formulation (casein and additives) through the following equation:

$$\text{ThOD (substance)} = \frac{16[2c + 0.5(h - cl - 3n) + 3s + 2.5p + 0.5na - o]}{Mr}$$

$$\text{ThOD (formulation)} = \frac{\text{ThOD(substance A)} + \text{ThOD (substance B) ...}}{\text{mass of polymer introduced in bottles}}$$

### III.5.5 Statistical analysis

Data were analysed with XLSTAT software (Addinsoft, v19.02). Fisher's test, Low Significant Difference (LSD) was used to compare the statistical difference of compositions within the different experiments through one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## III.6 Results and discussion

### III.6.1 Modeling of organic acid salts antimicrobial potential by microdilution method

In order to evaluate the antibacterial activity of organic acid salts on *Escherichia coli* ATCC 10536, the microdilution broth method was applied. Ampicillin ( $0.001 \text{ g.L}^{-1}$ ) was used as positive control of inhibition of *E. coli* ATCC 10536 in all experiments. Preservatives concentrations between  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  and  $20 \text{ g.L}^{-1}$  were studied in presence of *E. coli*. Incubation was monitored over 6 days since growth of *E. coli* is delayed at  $15^\circ\text{C}$ . Indeed, tests made at  $15^\circ\text{C}$  on TSA (Tryptone Soy Agar) medium proved that growth of *E. coli* starts between the 5<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> day of incubation (data not shown). Curves corresponding to strain growth without and with sodium benzoate, potassium sorbate and calcium propionate at different concentrations can be found in Figure III-3.

As can be seen on Figure III-3, *E. coli* starts growing after 67 h at  $15^\circ\text{C}$  (2.8 days) in tryptone soy broth. Noor et al. didn't observe any delay in *E. coli* growth when the incubation temperature is decreased from  $37^\circ\text{C}$  to  $25^\circ\text{C}$  (Noor, Islam, Munshi, & Rahman, 2013).

In case of potassium sorbate (Figure III-3A) and sodium benzoate (Figure III-3B), a concentration of  $5 \text{ g.L}^{-1}$  is necessary to inhibit *E. coli* in liquid broth at  $15^\circ\text{C}$  for 6 days. Similarly, Stanojevic et al. found that a  $5 \text{ g.L}^{-1}$  concentration of potassium sorbate or sodium benzoate is the minimal inhibitory concentration to inhibit *Escherichia coli* (density of  $10 \text{ CFU.mL}^{-1}$ ) after 24 h incubation at  $37^\circ\text{C}$  (Stanojevic & Comic, 2009). Concentrations of potassium sorbate lower than inhibition concentration, such as  $1 \text{ g.L}^{-1}$  and  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  concentrations have an effect on final growth of *E. coli* at 6 days, but the bacteria is not completely inhibited after 6 days unlike with above  $5 \text{ g.L}^{-1}$  concentrations.  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  concentration allows a 14 h delay in growth and  $1 \text{ g.L}^{-1}$  concentration allows over a 1-day of delay. Very weak concentration under  $0.5 \text{ g.L}^{-1}$  of potassium sorbate seems to have less impact on bacteria growth. Indeed,  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  of potassium sorbate delays growth by 5 h, however after 6 days at  $15^\circ\text{C}$ , absorbance is similar to bacteria control growth without antimicrobial agent, which implies a bacteriostatic effect that doesn't last more than 5 h.

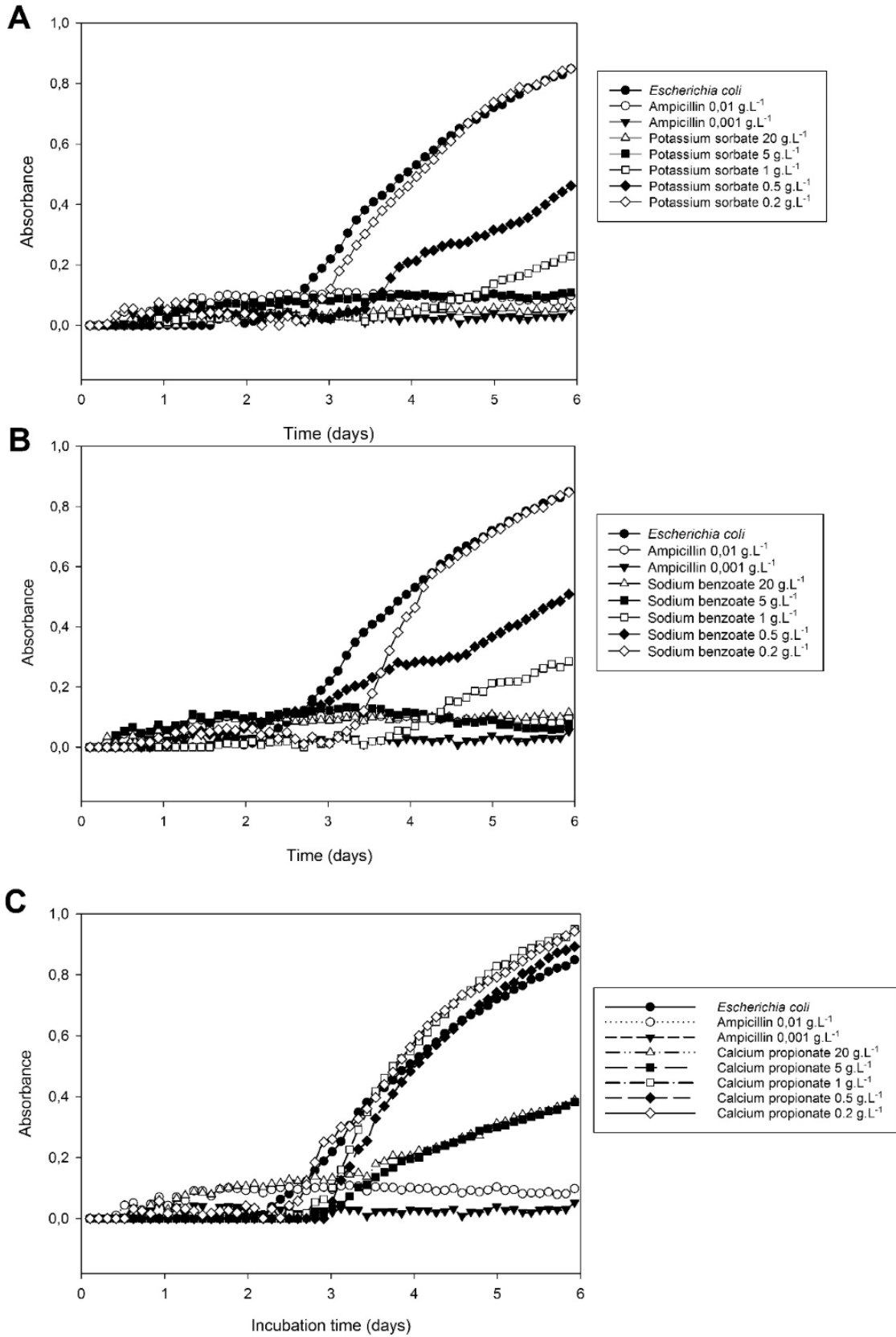


Figure III-3 : Strain growth over time (6 days) without and with addition of organic acid salts in broth. Different concentrations tested of (A): Potassium sorbate; (B): Sodium benzoate and (C): Calcium propionate.



Sodium benzoate results (Figure III-3B) are the same as with potassium sorbate. At 15°C and after 6 days, 5 g.L<sup>-1</sup> concentration allows complete inhibition of the bacteria. 1 g.L<sup>-1</sup> and 0.5 g.L<sup>-1</sup> concentrations of sodium benzoate have an impact on the final inhibition of *E. coli*. 1 g.L<sup>-1</sup> of sodium benzoate brings more than 1-day delay in growth. 0.2 g.L<sup>-1</sup> concentration has no effect on final inhibition of *E. coli* but allows 12-hours delay of growth. Delay in growth at 0.2 g.L<sup>-1</sup> benzoate is 7 -hour longer than delay at 0.2 g.L<sup>-1</sup> potassium sorbate; it can be assumed that *Escherichia coli* is more sensitive to benzoate than propionate under these conditions.

Curves of different calcium propionate concentrations (Figure III-3C) showed no inhibition of *Escherichia coli* after 6 days at 15°C. Indeed, only 20 g.L<sup>-1</sup> and 5 g.L<sup>-1</sup> concentrations of have an impact on strain final growth but this is not a complete inhibition (absorbance: 0.38, compared to strain alone absorbance: 0.85). These two concentrations induced a 20-hour delay in stain growth. Concentrations weaker than 5 g.L<sup>-1</sup> have no effect on final growth at 6 days. This work showed the efficiency of organic acid salts to inhibit *Escherichia coli* ATCC10536 in specific conditions, i.e. 15°C and for a 6-day incubation. Sodium benzoate and potassium sorbate were more efficient than calcium propionate. This observation is in accordance with results previously observed by Suhr et al. and Guynot et al. on fungi and moulds (Guynot, Ramos, Sanchis, & Marín, 2005; Suhr & Nielsen, 2004). Considering these results, organic acid salts concentration could be chosen to inhibit *Escherichia coli* growth or just to delay its growth for a period of time depending on the application aimed and the type of food risk when stored at 15 °C.

### III.6.2 Design of experiment: Antibacterial effect of a blend of weak organic acid salts

A design of experiment was started to test different blends of preservatives against *Escherichia coli* by broth microdilution method. As can be seen in the Box-Behnken design presented in Table III-2, three preservatives were studied as factors: potassium sorbate, sodium benzoate and calcium propionate with concentrations equal or under inhibition concentration previously determined. One response was calculated for each run, that is the percentage of growth reduction observed between bacteria growth curve and the growth curves of bacteria in presence of antimicrobial tested blends after 6 days of incubation at 15 °C. The aim of response surface method is to build a model which adequately describes the effect that the factors have on the response and then use the model for response optimization.

An analysis of variance was conducted to determine significant model terms before modelling different solutions. The chosen model, including study of factors A, B and C and interactions AB, AC, BC and ABC, is significant. There is only 0.01 % chance that a model this large could occur due to noise. Accordingly, this model can be used to navigate the design space. All factors and interactions are considered significant model terms, which means that sorbate, benzoate, propionate, and interactions of 2 of them or all of them have a significant effect on the *E. coli* growth reduction.

A final equation in terms of actual factors is given for this model as follows:

$$\text{Growth Reduction} = 0.115 + 0.198 \text{ Sorbate (mg.mL}^{-1}\text{)} + 0.187 \text{ Benzoate (mg.mL}^{-1}\text{)} + 0.168 \text{ Propionate (mg.mL}^{-1}\text{)} - 0.043 \text{ Sorbate/Benzoate} - 0.038 \text{ Sorbate/Propionate} - 0.036 \text{ Benzoate/Propionate} + 0.008 \text{ Sorbate/Benzoate/Propionate}$$

In this model equation that represents the reduction between bacteria growth with and without antimicrobials at 15°C at 6 days, interactions of two antimicrobials have a negative effect on the response. Blends of organic acids are less efficient to reduce *Escherichia coli*, this indicates a slight antagonistic effect of potassium sorbate and sodium benzoate, of potassium sorbate and calcium propionate and of sodium benzoate and calcium propionate. Possible adverse effect can also occur between two organic acid salts. In a study done in 2002 by Mbandi et al., inhibition of different strains by either sodium lactate or sodium diacetate or both was found to be temperatures dependent (Mbandi & Shelef, 2002). A synergistic effect of both antimicrobial agents was observed at 5 °C but none was observed at 10 °C. Nevertheless, other researchers have found evidence of synergistic inhibition of *E. coli* when two organic acid salts were used at 37°C and for 24 to 48h (Smith & Hong-Shum, 2011; Stanojevic & Comic, 2009). Combined effect of organic acid salts has been proved to be complex and could vary depending on other ingredients, concentration, tested strain and experimental conditions such as temperature or pH. Through the chosen model an optimized response simulation can be applied. Goals of this optimization is to maximize growth reduction but to minimize use of antimicrobials to meet recent industrial requirements to protect food with fewer preservatives.

In Table III-3 are presented researched criteria and the different solutions proposed by a simulation according to the model previously described.

Table III-3 : Solutions proposed by the model for response optimization corresponding to given criteria.

Constraints					Solutions proposed by the model				
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Importance	1	2	3	4	5
Potassium sorbate (g.L <sup>-1</sup> )	minimize	0	5	+	4.1	4.1	4.1	0.1	1.1
Sodium benzoate (g.L <sup>-1</sup> )	minimize	0	5	+	0.0	0.0	0.1	4.1	3.7
Calcium propionate (g.L <sup>-1</sup> )	minimize	0	5	+	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Growth reduction (%)	maximize	0	1	+++++	90	90	90	90	90

In the 5 proposed solutions, sodium benzoate and potassium sorbate are found to bring high growth reduction at concentrations around 4 g.L<sup>-1</sup>. Blending weak organic acids is not interesting for growth reduction. The cumulative antimicrobial concentration needed for 90% of growth reduction is higher than considering one antimicrobial agent. This result is in accordance with previous results showing an antagonist effect of different organic acid salts.

Organic acid salts are good antimicrobial agents that can be used against *E. coli* ATCC 10536 at 15 °C and inhibit growth for at least 6 days. Potassium sorbate and sodium benzoate are the most efficient preservatives against *E. coli* at 15°C and their efficiency should be tested inside a biobased material to check matrix (rennet casein) and process (twin screw extrusion) impact on antimicrobial activity.

### III.6.3 Antimicrobial agents incorporation in extruded casein based material analysed by agar disc diffusion method

Rennet casein was used for the first time as raw material for film production through extrusion process without any pH increase to neutralize caseins. The three organic acid salts were incorporated with rennet casein powder before extrusion process at a lower concentration than the concentration tested in liquid method to correspond to cheese manufacturer requirements.

To keep a large choice of future applications, lower concentrations of preservatives, 2 % (w/w of casein) corresponding to an estimated 0.15-0.2 g.L<sup>-1</sup> concentration (depending on water evaporated during process) are interesting on industrial point of view.

After TSA inoculation with *Escherichia coli* ATCC 10536, 1.5 cm diameter discs of extruded material were disposed on agar and Petri dishes were placed at 15°C in humid chamber to simulate cheese ripening cellar conditions. Inhibition zones were observed after 6 days of incubation at 15°C and are presented in Table III-4.

Table III-4 : Diameters of inhibition in mm and typical inhibition zone pictures of different formulations of materials against *Escherichia coli* ATCC10536 after 6 days of incubation at 15 °C (n=8 replicates; different letters indicate significantly different levels within each formulation, P < 0.05). IM: Industrial material with 22.5 % ethanol; Extruded materials with: E: 17 % Ethanol; C: 5° acetic acid; A: 10° acetic acid; B2: 2 % Sodium benzoate; S2: 2 % Potassium sorbate; P2: 2 % Calcium propionate; B2S2: 2 % Benzoate and 2% Sorbate; B2P2: 2 % Benzoate and 2 % Propionate.

Material	Inhibition diameter (mm) against <i>E. coli</i> after 6 days of incubation at 15°C	Material	Inhibition diameter (mm) against <i>E. coli</i> after 6 days of incubation at 15°C
IM	0.0 ± 0.0 <sup>e</sup>		
E	33.6 ± 6.7 <sup>c</sup>	S2	46.1 ± 3.8 <sup>b</sup>
C	25.8 ± 6.7 <sup>d</sup>	P2	30.4 ± 4.4 <sup>cd</sup>
A	30.6 ± 9.7 <sup>cd</sup>	B2S2	54.2 ± 8.9 <sup>a</sup>
B2	48.0 ± 4.6 <sup>b</sup>	B2P2	55.1 ± 5.2 <sup>a</sup>

Active films based on food grade rennet casein incorporated with different organic acid salts as antimicrobial agents were obtained by extrusion process. Besides, diffusion tests in water at 15°C analysed by HPLC have shown that antimicrobials are fully incorporated in the protein matrix (amount added recovered in film after extrusion process) and are released quickly (in less than 4 hours) and entirely in aqueous solution (data not shown). Some authors have already proved that other antimicrobial agents incorporated in films can be recovered after extrusion process (Colak et al., 2015; Nam, Scanlon, Han, & Izydorczyk, 2007). 2% organic acids (concentration 25 times lower than the minimal inhibitory concentration previously determined in microdilution broth method) incorporated in rennet casein films affect significantly *Escherichia coli* growth. Extrusion process (here at low temperature: 70°C) is a good process for incorporation of weak organic acids since antimicrobials are released quickly in agar medium and antimicrobial activity against *E. coli* is recovered.

Industrial material (IM in Table III-1) (not made by extrusion process but compression process) was provided by a casein film maker company. Industrial film containing 20% (w/w) ethanol 96° has no effect on *Escherichia coli* growth unlike extruded material (samples E) containing ethanol 96° at 17% (w/w). Ethanol could be recovered differently from compression and extrusion process. Indeed, industrial compression process is using higher temperature than boiling point temperature of ethanol: 78.24°C (compared to extrusion made below 75°C). Process can have an influence on bacteria growth also because of a matrix modification. Heating influence on protein hydrophobicity has been studied by Bonomi et al. and these authors proved that up to 95°C hydrophobicity of milk protein surface is growing, however, at higher temperature (for example 120°C for 10 minutes), hydrophobicity decreases greatly (Bonomi & Iametti, 1988, 1991). It can be assumed that industrial material tested which is produced through a “pressure cooker” type process where proteins are heated for 2-5 hours at temperature between 80-110°C, is a process that influences protein surface hydrophobicity and by the same way, could increase material sensitivity to *Escherichia coli*.

All extruded materials (containing acetic acid 5 %) influenced bacteria growth. It means that acetic acid brings antimicrobial properties to the material but less than other preservatives. Several authors have reported reduction in survival of *Escherichia coli* in food such as spinach, lettuce, green lavers and beef with acetic acid treatment from 5-15 % (Harris & Brashears, 2012; Park, Kang, & Ha, 2016; Poimenidou et al., 2016).

Ethanol present in extruded formulation seems to show more effect on *Escherichia coli* than 5 ° or 10 ° acetic acid. Ethanol has been proved to inhibit growth of *E. coli* at 6.57 – 10 % (v/v) when used as a pure solution (Ganske & Bornscheuer, 2006; Mazzola et al., 2009). However, introducing 10 ° acetic acid in the formulation allows an 44.1 % increase of inhibition area compared to 5° acetic acid. Inhibition area is 2-3 times larger for formulations containing 2 % (w/ w protein) of organic acids (B2 and S2) compared to formulation with only 5 ° acetic acid (samples C), except for calcium propionate (P2) which has not more effect on growth than just acetic acid inside the formulation. This result is in accordance with microdilution broth results that proved *E. coli* as more sensitive to sorbate and benzoate than propionate.

A few combinations were tested, sodium benzoate was chosen for both combinations because it has the best rate of inhibition on *Escherichia coli* (Figure 2B), same as potassium sorbate. Besides, sodium benzoate was also selected for better processability because of its powder grade compared to sorbate that was in small pearls and for cost optimization for future applications. By comparing addition effect of blend of two antimicrobials inside the same formulation, it can be observed that benzoate at 2% (w/w) and propionate at 2% (w/w) (B2P2) have a 6.6% smaller inhibition area than the cumulative effect of material with 2% of benzoate and 2% of propionate taken separately. In the case of benzoate (2%) and sorbate (2%) inside the same formulation (B2S2), the inhibition area is greatly reduced between the two antimicrobials. The inhibition area of B2S2 is 17% smaller than inhibition area of B2 + S2. Antagonist effect depends on the organic acid salts and this result is in accordance with microdilution broth design of experiment result where interactions of weak organic acids were bringing negative effect to the growth reduction and by the same way had less impact on bacteria inhibition compared to preservatives used independently.

In this experiment, preservatives contained in casein based matrix showed an antibacterial effect on *Escherichia coli* even at 0.2 g.L<sup>-1</sup>. Indeed, the same concentration used in broth method was not efficient against the strain in the same temperature and time conditions. It is not the first time that a matrix used as carrier for preservatives allows a better microorganism inhibition over time. Sanjurjo et al. already noticed that nisin incorporated in starch edible film was more efficient against *L. innocua* than direct addition probably due to gradual liberation of the antimicrobial agent (Sanjurjo & Flores, 2006).

Efficiency of organic acids incorporated in edible films was reported by several authors at higher concentrations than 2% (w/w of protein) described in this work. Indeed, in anchovy protein films concentration above 25% (w/w of protein) of sorbic or benzoic acid was necessary to inhibit *Escherichia coli* O157:H7 (Rocha et al., 2014). Similarly, a concentration of potassium sorbate above 10% (w/w of starch) or above 20% (w/w of chitosan) was necessary to obtain an inhibition zone against *Escherichia coli* in works of Shen et al. and Pranoto et al. on antimicrobial sweet potato starch film and antimicrobial chitosan film respectively (Pranoto, Rakshit, & Salokhe, 2005; Shen et al., 2010).

The extrusion process can be considered as a good alternative to produce active casein based film since a process temperature of 70°C can be used and maintain efficiency of organic acid salts. Preservatives are more efficient used independently and potassium sorbate and sodium benzoate offer the best inhibition of *Escherichia coli* at 15°C. Furthermore, this work showed that even at low concentrations, 25 times less than concentrations that allow complete inhibition in liquid broth method, preservatives brought antimicrobial properties to the material at 15°C after 6 days of incubation.

### III.6.4 Biodegradability

Material biodegradation was studied in liquid aerobic condition for 60 days. Biological oxygen demand (BOD) data were obtained and then expressed as a percentage of theoretical oxygen demand calculated for each formulation and is presented in Figure III-4.

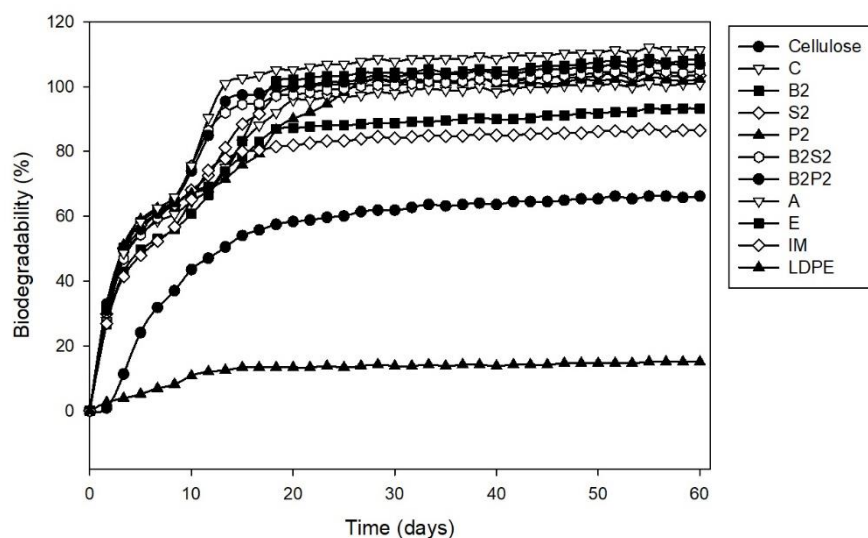


Figure III-4 : Percentage of biodegradation of the different formulations with and without antimicrobial agents, according to ISO14851 (1999). LDPE: Low density polyethylene; IM: Industrial material with 22.5% ethanol; Extruded materials with: E: 17% Ethanol; C: 5° acetic acid; A: 10° acetic acid; B2: 2% Sodium benzoate; S2: 2% Potassium sorbate; P2: 2% Calcium propionate; B2S2: 2% Benzoate and 2% Sorbate; B2P2: 2% Benzoate and 2% Propionate.

On the different curves in Figure III-4, on the first day a short lag step occurs, when microbial inoculum is adapting to material samples, then there is an important degradation step between 1 and 14 days, where the flora contained in reactors is growing using samples as food and finally a plateau is attained because nothing more can be degraded and used as growing nutrients by bacteria. All tested materials are completely biodegradable in liquid aerobic conditions at 23°C. Tested materials remained intact in contact with water (without microorganism presence) but have even quicker biodegradability than cellulose in presence of sludge microflora. At the end of the experiment, after 60 days all samples obtained at least 80% of biodegradability but they already reached 60 % of biodegradability after 10 days. Antimicrobial agents contained in films alone (2 % w/w protein: B2, S2 and P2) or in combination (4 % w/w of protein: B2S2 and B2P2) did not affect the material biodegradability. Industrial material (IM) and extruded ethanol formulation (C) are a slightly less biodegradable (90 % after 60 days), this could be due to ethanol in aqueous solution as an antimicrobial agent.



### III.7 Conclusion

Organic acid salts are good antimicrobial agents that can be used against *Escherichia coli* ATCC 10536 at 15°C. Sodium benzoate and potassium sorbate were the most effective preservatives against *E. coli*. However, blend of several antimicrobials against *E. coli* in conditions of the study (15°C for 6 days) showed antagonist effect.

Active films based on food grade rennet casein incorporated with different organic acid salts as antimicrobial agents were successfully obtained by extrusion process. Rennet casein based films, to our knowledge, were obtained for the first time by extrusion process which is a low cost and continuous process compared to wet casting.

Casein based films were active against *Escherichia coli* ATCC 10536, even after thermo-mechanical treatments applied during extrusion, which is the bacteria chosen as model to study *E. coli* food contamination.

This new antimicrobial material is providing an alternative potential solution for food protection against foodborne pathogens. These films can be adapted to different kind of food systems and can be thought as good replacement for cheese labels if they could also inhibit cheese rind microflora. The main novelty of this work is the production of rennet casein film by extrusion process, which is a good matrix to incorporate active compounds since antimicrobial properties of organic acid salts was not affected inside casein network.

### III.8 Acknowledgements

Funding: This work was supported by Region Rhône-Alpes (under ARC Environnement project), Conseil Départemental de l'Ain and Bourg en Bresse Agglomération.

### III.9 Etude complémentaire

En complément de cette étude théorique et appliquée par plan d'expérience sur une souche modèle ici d'*Escherichia coli*, des essais de matériaux actifs ont été réalisés *in situ* sur des fromages de Comté. Les formulations présentées dans le Table III-5 ont pu être testées sur la croûte des fromages de Comté en partenariat avec la société Monts&Terroirs.

Table III-5 : Formulations testées sous forme d'étiquettes sur de fromages de Comté dans des caves d'affinage de la société Monts&Terroirs

Code	Dénomination	Formulation				N° d'Essai
		Protéine	Glycerol	Acide acétique	Antimicrobien	
IM	Témoin industriel	Présure	22%	X	20% éthanol (96°)	N°1
C1	Témoin extrudé	Présure : Pois (3:1)	20%	10°	X	
EO	1% Huile essentielle de thym à linalol	Présure : Pois (3:1)	20%	10°	1% huile essentielle de thym à linalol	
P1	1% Propionate de calcium	Présure : Pois (3:1)	20%	10°	1% Propionate de calcium	
S1	1% Sorbate de potassium	Présure : Pois (3:1)	20%	10°	1% Sorbate de potassium	
B1	1% Benzoate de sodium	Présure : Pois (3:1)	20%	10°	1% Benzoate de sodium	
IM	Témoin industriel	Présure	22%	X	20% éthanol (96°)	N°2
C	Témoin extrudé	Présure	15%	5°	X	
A	Acide acétique 10°	Présure	15%	10°	X	
P2	2% Propionate de calcium	Présure	15%	5°	2% Propionate de calcium	
S2	2% Sorbate de potassium	Présure	15%	5°	2% Sorbate de potassium	
B2	2% Benzoate de sodium	Présure	15%	5°	2% Benzoate de sodium	
B2S2	2% Benzoate de sodium + 2% Sorbate de potassium	Présure	15%	5°	2% Benzoate de sodium + 2% Sorbate de potassium	
B2P2	2% Benzoate de sodium + 2% Propionate de calcium	Présure	15%	5°	2% Benzoate de sodium + 2% Propionate de calcium	

NB : Les formulations en vert correspondent à celles testées sur *E. coli* et présentées précédemment.

Les matériaux ont été fabriqués avec un colorant rouge pour ne pas les confondre avec l'étiquette de l'appellation Comté officielle. Des disques de 2.5 cm de diamètre ont été découpés puis imprimés et percés afin de suivre un processus similaire aux étiquettes officielles fournis par le syndicat de l'interprofession.

Les différentes étiquettes incorporant différents principes actifs à différentes concentrations ont été apposées sur les fromages comme indiqué sur la Figure III-5 représentant les étapes de production d'un fromage de Comté de type pâte pressée cuite. Lors des deux essais (le 02/11/2015 et le 24/05/2016), des fromages de Comté ont été produits avec des étiquettes à tester en triplicat afin de suivre l'évolution du recouvrement de celles-ci lors de l'affinage des fromages.

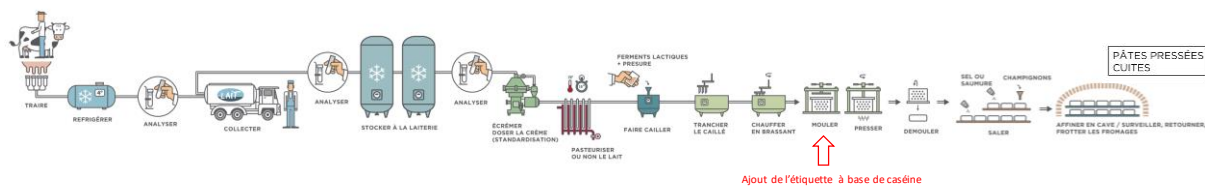


Figure III-5 : Schéma de fabrication de pâtes pressées cuites comme le Comté et de l'étape de dépôt des étiquettes en caséine ([www.produits-laitiers.com](http://www.produits-laitiers.com))

Un suivi de la maturation des fromages et des étiquettes en caves d'affinage a été effectué comme observé sur les Figure III-6 et Figure III-7.

Ce suivi a permis de mettre en évidence plusieurs résultats. Tout d'abord, on peut constater que le recouvrement par la flore de surface du fromage constitue un frein à la lisibilité après un mois d'affinage dans les conditions opérées dans ces essais. Après 3 mois d'affinage, les étiquettes sont complètement colonisées, les informations qu'elles contiennent ne sont plus lisibles quel que soit la formulation testée avec ou sans agents antimicrobiens. Il faut comparer les essais séparément car la qualité des laits étant différente selon les saisons, l'essai N°1 et N°2 ont été conduits sur un fromage d'hiver et un fromage d'été respectivement, avec des caractéristiques différentes. On remarque que dans l'essai N°1, les étiquettes sont toutes entièrement recouvertes après 3 mois d'affinage en cave et commencent également à se dégrader en commençant par la périphérie ou les zones percées. On peut supposer que ces zones sont plus sujettes à la lyse de la matrice protéique et à la dégradation du matériau par des microorganismes. Seule l'étiquette contenant du sorbate à raison de 1% (S1) semble être moins recouverte.

Afin d'aller plus loin dans les observations, un « grattage » au scalpel de la zone de l'étiquette a été effectué afin de récupérer un prélèvement de la flore ayant poussé sur chaque étiquette pour analyse et ainsi compléter les informations obtenues visuellement. On remarque après « grattage » que les formulations à 1% de benzoate de sodium et 1% de sorbate de potassium semblent être les mieux conservées du point de vue de la lisibilité du texte imprimé.

Concernant le deuxième essai, des constatations similaires peuvent être établies. En effet, après 3 mois d'affinage, les étiquettes sont complètement recouvertes et se dégradent. Après grattage, on constate que certaines formulations sont dégradées en profondeur, c'est-à-dire sur toute l'épaisseur de l'étiquette (observation de la face interne de l'étiquette, face fromage) alors que d'autres sont préservées et les informations restent lisibles comme pour les matériaux contenant de l'acide acétique à 10° (A), du sorbate (S2) ou du benzoate à 2% (B2) ou la combinaison de 2% de sorbate et 2% de benzoate (B2S2).

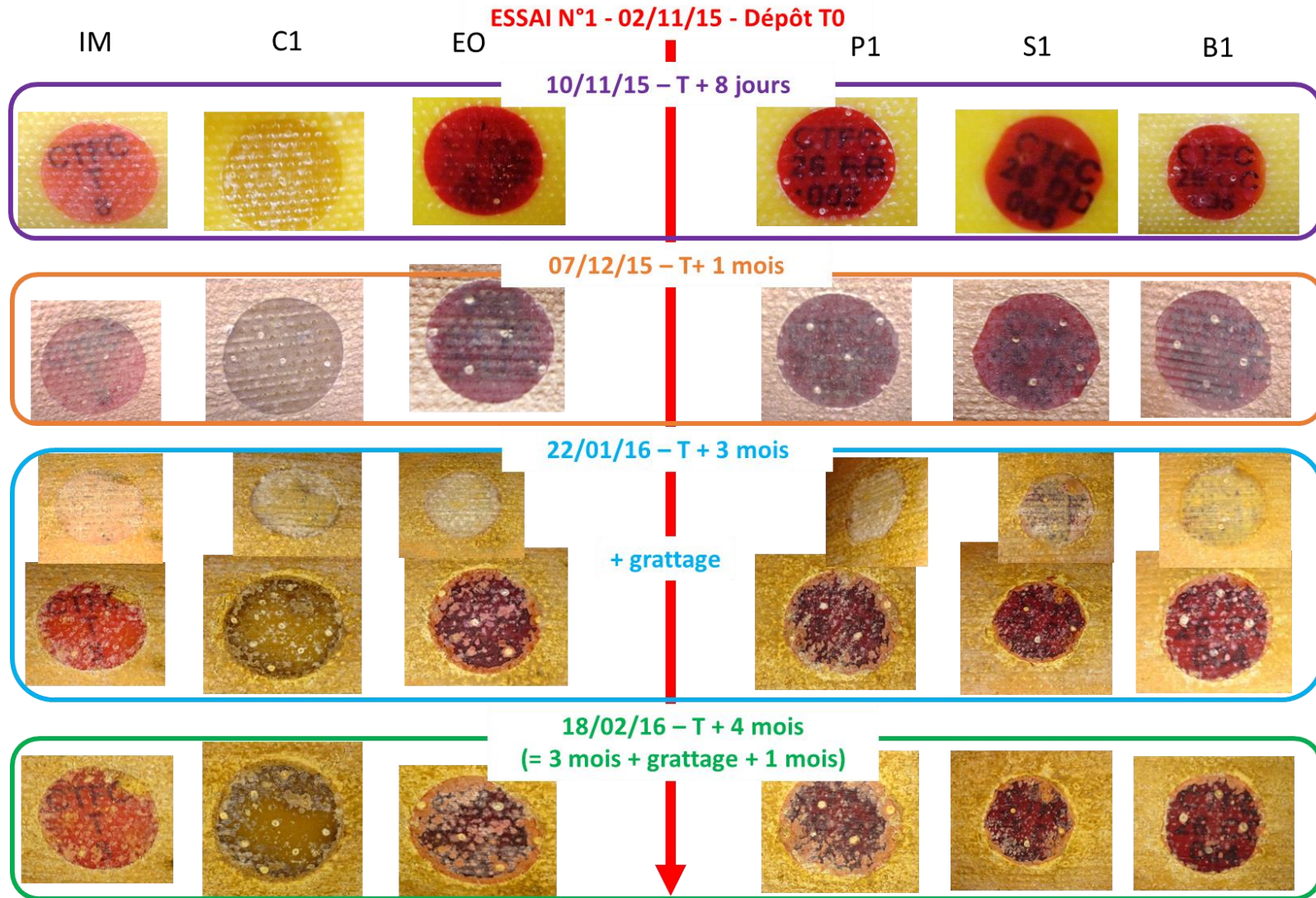


Figure III-6 : Suivi chronologique de la maturation des fromages et de l'évolution visuelle des étiquettes en caséine pour l'essai N°1

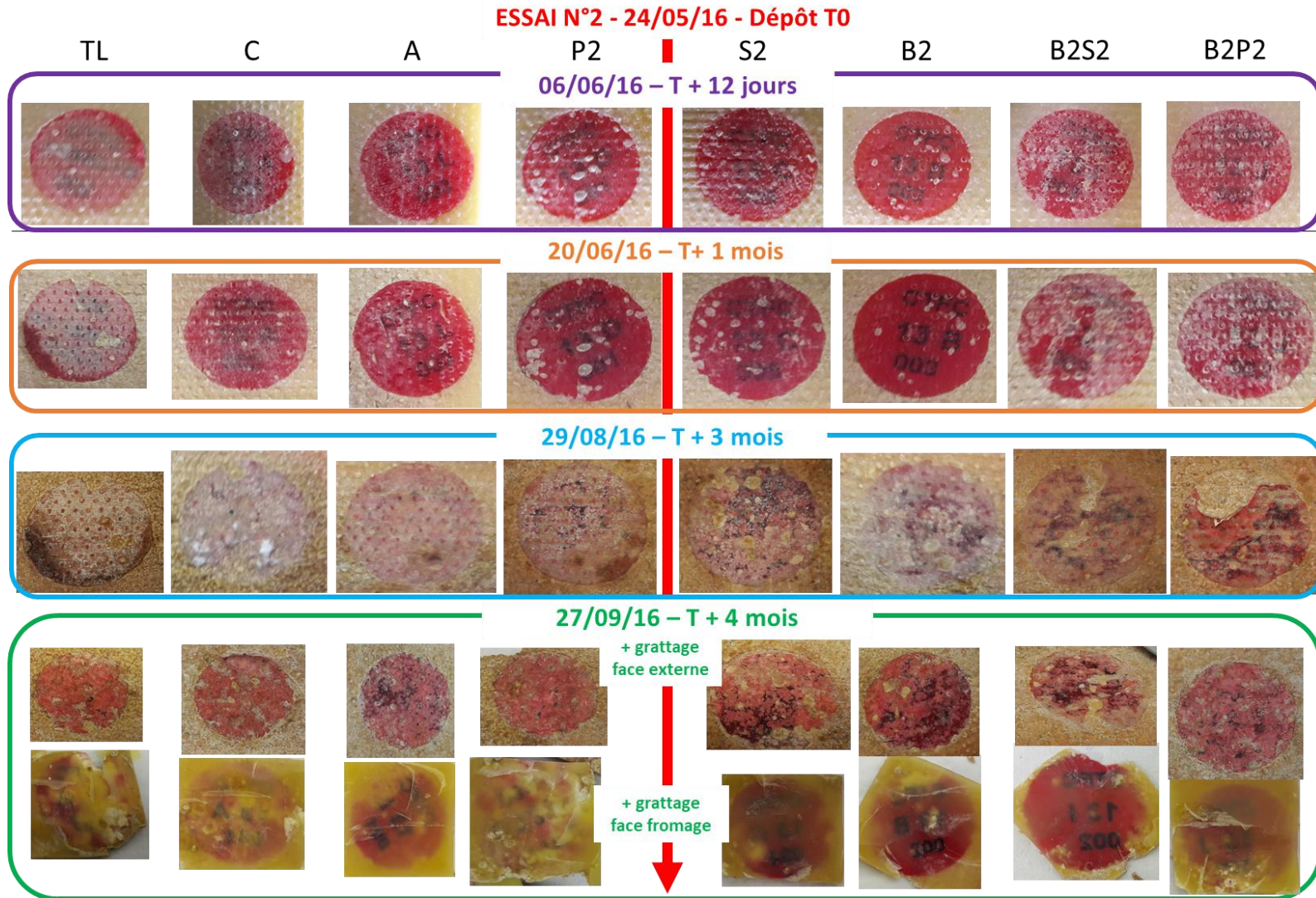


Figure III-7 : Suivi chronologique de la maturation des fromages et de l'évolution visuelle des étiquettes en caséine pour l'essai N°2

Pour confirmer ces observations visuelles, les prélèvements effectués par « grattage » des étiquettes à 3 mois pour l'essai N°1 et à 4 mois pour l'essai N°2 ont été cultivés sur milieu CRBM (Cheese Ripening Bacteria Media comme développé par Denis et al.) à 15°C afin de comparer la charge microbienne recouvrant chaque étiquette (observée après 7 jours d'incubation) dont le calcul est présenté en Figure III-8 (Denis, Gueguen, Henry, & Levert, 2001). Les résultats sont présentés dans le Table III-6 suivant :

Calcul de la charge en microorganismes recouvrant les étiquettes et se développant sur milieu CRBM :

$$\text{Charge en microorganismes (\%)} = \frac{\text{Aires cumulées des colonies observées}}{\text{Aire de la boîte de Petri}}$$

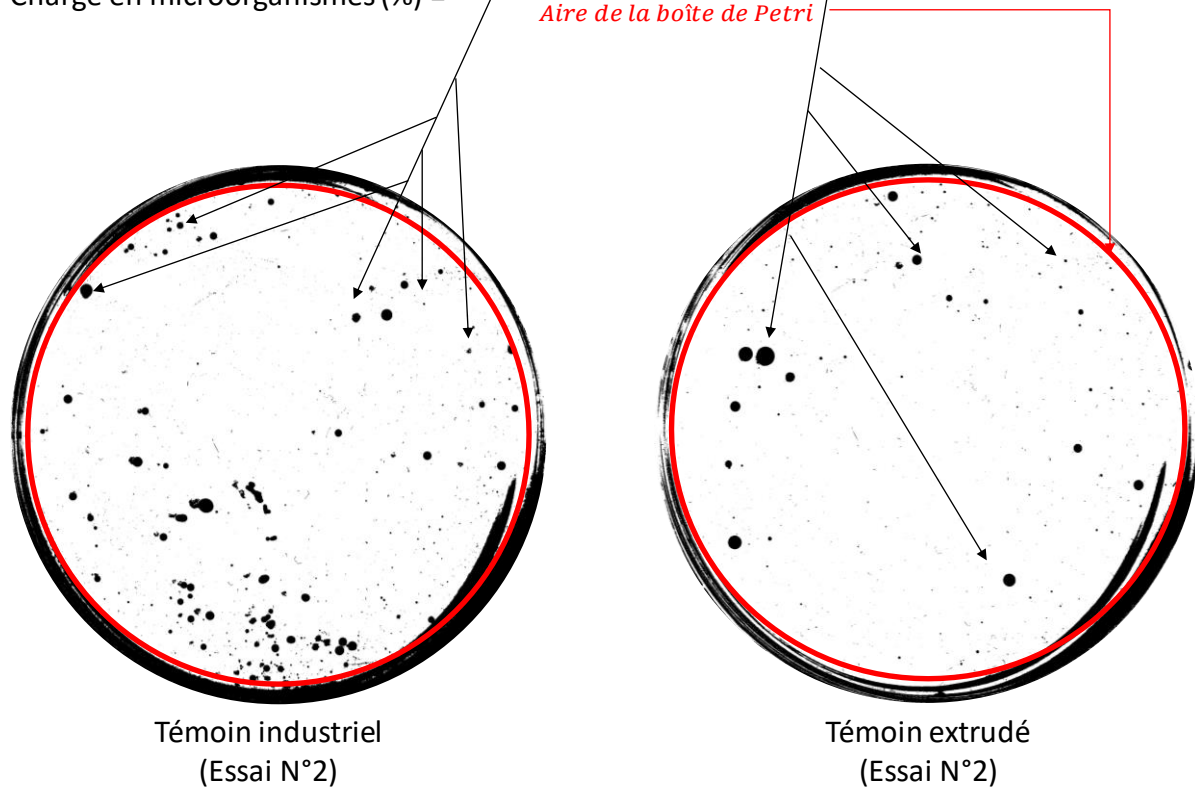


Figure III-8 : Schématisation du calcul de la charge de microorganismes recouvrant les étiquettes et se développant sur milieu CRBM à l'aide du logiciel ImageJ

L'analyse des prélèvements confirme les observations visuelles faites sur les étiquettes. En effet, dans l'essai N°1, on voit que la charge retrouvée sur l'étiquette contenant du sorbate de potassium à raison de 1% est significativement plus faible que toutes les autres. Concernant l'essai N°2, toutes les étiquettes fabriquées par extrusion (même sans sels d'acides organiques/témoin) semblent avoir réduit la charge de recouvrement comparées au matériau industriel contenant seulement de l'éthanol.

Table III-6 : Détermination de la charge de microorganismes recouvrant les étiquettes et se développant sur milieu CRBM comme décrit dans le schéma en Figure III-8 (n=3). L'analyse statistique est réalisée séparément pour chaque essai.

N° Essai	Code	Dénomination	Charge (exprimé en % d'aire de la boîte de Petri recouvert par la flore de Comté)
N°1	IM	Témoin industriel	17,3 ± 2,8 <sup>ab</sup>
	C1	Témoin extrudé	14,7 ± 2,0 <sup>abc</sup>
	EO	1% Huile essentielle de thym à linalol	18,7 ± 1,4 <sup>a</sup>
	P1	1% Propionate de calcium	11,6 ± 1,0 <sup>bc</sup>
	S1	1% Sorbate de potassium	10,4 ± 0,9 <sup>c</sup>
	B1	1% Benzoate de sodium	18,9 ± 2,3 <sup>bc</sup>
N°2	IM	Témoin industriel	8,0 ± 0,4 <sup>a</sup>
	C	Témoin extrudé	3,1 ± 0,4 <sup>cd</sup>
	A	Acide acétique 10°	3,1 ± 0,5 <sup>cd</sup>
	P2	2% Propionate de calcium	3,0 ± 0,9 <sup>cd</sup>
	S2	2% Sorbate de potassium	3,7 ± 0,7 <sup>cd</sup>
	B2	2% Benzoate de sodium	4,1 ± 1,2 <sup>c</sup>
	B2S2	2% Benzoate de sodium + 2% Sorbate de potassium	6,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
	B2P2	2% Benzoate de sodium + 2% Propionate de calcium	2,7 ± 0,6 <sup>d</sup>

Ce résultat est d'ailleurs en accord avec ceux obtenus dans l'article présenté précédemment sur la souche *E. coli*. On peut ainsi supposer que le procédé influence la structure du matériau qui sera ainsi plus ou moins sensible à la dégradation par la flore fromagère. Les conditions du procédé telles que la température ou la pression peuvent affecter les interactions et l'hydrophobicité du réseau de la matrice du matériau, ce qui engendre une vitesse différente de dégradation par les microorganismes lors de l'affinage des fromages.

Ainsi, les étiquettes en caséine testées *in situ* sur des fromages de Comté ont été rapidement recouvertes par la flore d'affinage des fromages après 1 mois d'affinage en cave à 15°C. Cependant, les observations visuelles et les prélèvements semblent indiquer une meilleure préservation et un recouvrement moins important chez certaines formulations testées, notamment celles contenant du sorbate de potassium et du benzoate de sodium.



### III.10 Conclusions générales et perspectives – Chapitre III

Les acides organiques testés (sorbate de potassium, benzoate de sodium et propionate de calcium) montrent une capacité inhibitrice intéressante contre *Escherichia coli* ATCC 10536 à 15°C. Le benzoate de sodium et le sorbate de potassium semble être plus efficaces que le propionate à la fois contre *E. coli* et contre la flore fromagère. Contrairement à d'autres études, un effet antagoniste a été montré pour la combinaison de différents antimicrobiens et notamment pour la formulation B2S2 qui perd 17% de son inhibition contre *E. coli* par rapport à l'effet cumulé du sorbate et du benzoate pris séparément ; et la charge de flore fromagère retrouvée sur cette formulation est également significativement plus importante.

La matrice de caséine présure produite par extrusion a permis l'incorporation de conservateurs avec des propriétés antimicrobiennes intéressantes. L'extrusion bivis et notamment les contraintes thermomécaniques n'ont pas affectées les capacités antimicrobiennes des composés actifs. Le réseau de protéine produit par le procédé d'extrusion semble apporter une protection supplémentaire contre les microorganismes et les dégradations engendrées par ces derniers. L'étude sur le modèle d'*E. coli* a également montré une efficacité des conservateurs à une concentration 25 fois inférieure à la concentration minimale inhibitrice précédemment déterminée. Ce résultat montre une nouvelle fois l'importance de la matrice et laisse envisager une réduction de l'utilisation des conservateurs d'un point de vue industriel.

Pour les biopolymères, un relargage par gonflement induit est le mécanisme principal de libération des composés actifs tels que les acides organiques, par la diffusion des molécules d'eau à travers la matrice. En fromagerie, lors de la production de Comté, après avoir moulé le caillé, les étiquettes en caséine sont placées puis, une étape de pression de 24h est réalisée. Cette dernière étape permet d'égoutter un maximum le fromage, dont le lactosérum va s'écouler pendant 24h. Le lactosérum passera ainsi à travers les étiquettes en caséine, ce qui engendre un gonflement et le relargage des agents actifs qui ne sont plus disponibles dans l'étiquette lors de l'affinage. Afin de réduire le gonflement et la sensibilité à l'eau du matériau, l'ajout de composés hydrophobes a été envisagé et est présenté dans le chapitre suivant.

Ce nouveau matériau actif peut être considéré avec un fort potentiel d'industrialisation puisqu'il répond à différentes attentes socio-économiques actuelles. En effet, le procédé d'extrusion permet un changement d'échelle facilité pour la production de ce type de matériau et la réduction des conservateurs permise par l'action de la matrice correspond aux exigences des consommateurs pour des produits plus « Ecolabel », plus sains et sans excès d'additifs.

### III.11 Références

- Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., López, J., Garrigós, M. del C., Valente, A. J. M., & Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 121, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.015>
- Atarés, 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(4), 678–687. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.05.018>
- Avena-Bustillos, R. J., & Krochta, J. M. (1993). Water Vapor Permeability of Caseinate-Based Edible Films as Affected by pH, Calcium Crosslinking and Lipid Content. *Journal of Food Science*, 58(4), 904–907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09388.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.019>
- Bonomi, F., & Iametti, S. (1988). A spectrofluorimetric approach to the estimation of the surface hydrophobicity modifications in milk proteins upon thermal treatment. *Milchwissenschaft (Germany, F.R.)*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE88V012188>
- Bonomi, F., & Iametti, S. (1991). Real-time monitoring of the surface hydrophobicity changes associated with isothermal treatment of milk and milk protein fractions. *Milchwissenschaft (Germany, F.R.)*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE91V0048>
- Bouarab-Chibane, L., Ouled-Bouhedda, B., Leonard, L., Gemelas, L., Bouajila, J., Ferhout, H., Cottaz A., Joly C., Degraeve P., Oulahal, N. (2017). Preservation of fresh ground beef patties using plant extracts combined with a modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2905-3>
- Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223–237. <https://doi.org/10.1080/10408690490464276>

- Chick, J., & Hernandez, R. j. (2002). Physical, Thermal, and Barrier Characterization of Casein-Wax-Based Edible Films. *Journal of Food Science*, 67(3), 1073–1079. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09455.x>
- Chick, J., & Ustunol, Z. (1998). Mechanical and Barrier Properties of Lactic Acid and Rennet Precipitated Casein-Based Edible Films. *Journal of Food Science*, 63(6), 1024–1027. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15846.x>
- Colak, B. Y., Peynichou, P., Galland, S., Oulahal, N., Assezat, G., Prochazka, F., & Degraeve, P. (2015). Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability. *Industrial Crops and Products*, 72, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.047>
- Colak, B. Y., Peynichou, P., Galland, S., Oulahal, N., Prochazka, F., & Degraeve, P. (2016). Antimicrobial Activity of Nisin and Natamycin Incorporated Sodium Caseinate Extrusion-Blown Films: A Comparative Study with Heat-Pressed/Solution Cast Films. *Journal of Food Science*, 81(5), E1141-1150. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13284>
- Denis, C., Gueguen, M., Henry, E., & Levert, D. (2001). New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Le Lait*, 81(3), 365–379. <https://doi.org/10.1051/lait:2001138>
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Bockstal, A., & Debevere, J. (2000). Study on antimicrobial activity of aq food packaging material containing potassium sorbate. *Acta Alimentaria*, 29(2), 137–146. <https://doi.org/10.1556/AAlim.29.2000.2.4>
- Fernández-Pan, I. (2016). Current Antimicrobials used for Edible Films and Coatings Development. *MOJ Food Processing & Technology*, 2(6). <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2016.02.00055>
- Flores, S., Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2007). Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.004>
- Flores, S. K., Costa, D., Yamashita, F., Gerschenson, L. N., & Grossmann, M. V. (2010). Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. *Materials Science and Engineering: C*, 30(1), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.001>
- Ganske, F., & Bornscheuer, U. T. (2006). Growth of Escherichia coli, Pichia pastoris and Bacillus cereus in the Presence of the Ionic Liquids [BMIM][BF<sub>4</sub>] and [BMIM][PF<sub>6</sub>] and Organic Solvents. *Biotechnology Letters*, 28(7), 465–469. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-0006-7>

- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2005). Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). *International Journal of Food Microbiology*, *101*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.003>
- Han, J. H., & Aristippos, G. (2005). 15 - Edible films and coatings: a review. In *Innovations in Food Packaging* (pp. 239–262). London: Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123116321500474>
- Harris, D., & Brashears, M. M. (2012). Microbiological and organoleptic characteristics of beef trim and ground beef treated with acetic acid, lactic acid, acidified sodium chlorite, or sterile water in a simulated commercial processing environment to reduce *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *Meat Science*, *90*(3), 783–788. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.11.014>
- Hernandez-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation—A Review. *Journal of Food Science*, *73*(2), R30–R39. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x>
- Hernandez-Izquierdo, V. M., Reid, D. S., McHugh, T. H., De J. Berrios, J., & Krochta, J. M. (2008). Thermal Transitions and Extrusion of Glycerol-Plasticized Whey Protein Mixtures. *Journal of Food Science*, *73*(4), E169–E175. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00735.x>
- Karina Flores, S., Costa, D., Yamashita, F., Noemi Gerschenson, L., & Grossmann, M. V. (2010). Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, *30*(1), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.10.001>
- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(4), 239–251. <https://doi.org/10.1080/10408690490464906>
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, *22*(3), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.003>
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Antimicrobial Activity of Biodegradable Polysaccharide and Protein-Based Films Containing Active

- Agents. *Journal of Food Science*, 76(3), R90–R102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02102.x>
- Mazzola, P. G., Jozala, A. F., Novaes, L. C. D. L., Moriel, P., Christina, T., & Penna, V. (2009). Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *ResearchGate*, 45(2), 241–248. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200008>
- Mbandi, E., & Shelef, L. A. (2002). Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology*, 76(3), 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00026-0)
- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigós, M. del C., & Jiménez, A. (2016). Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.42631>
- Nam, S., Scanlon, M. G., Han, J. H., & Izydorczyk, M. S. (2007). Extrusion of pea starch containing lysozyme and determination of antimicrobial activity. *Journal of Food Science*, 72(9), E477–E484. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00513.x>
- Neetoo, H., Ye, M., & Chen, H. (2008). Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pâté and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.001>
- Noor, R., Islam, Z., Munshi, S. K., & Rahman, F. (2013). Influence of Temperature on *Escherichia coli* Growth in Different Culture Media. *ResearchGate*, 7(2). Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/233761514\\_Influence\\_of\\_Temperature\\_on\\_Escherichia\\_coli\\_Growth\\_in\\_Different\\_Culture\\_Media](https://www.researchgate.net/publication/233761514_Influence_of_Temperature_on_Escherichia_coli_Growth_in_Different_Culture_Media)
- Park, S. Y., Kang, S., & Ha, S.-D. (2016). Antimicrobial effects of vinegar against norovirus and *Escherichia coli* in the traditional Korean vinegared green laver (*Enteromorpha intestinalis*) salad during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.002>
- Poimenidou, S. V., Bikouli, V. C., Gardeli, C., Mitsi, C., Tarantilis, P. A., Nychas, G.-J., & Skandamis, P. N. (2016). Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157:H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.013>

- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *ResearchGate*, 38(8), 859–865. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.014>
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, 98(3), 404–419. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.031>
- Rocha, M. da, Loiko, M. R., Tondo, E. C., & Prentice, C. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. *Food Hydrocolloids*, 37, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.017>
- Sanjurjo, K., & Flores, S. (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39(6), 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.016>
- Sayanjali, S., Ghanbarzadeh, B., & Ghiassifar, S. (2011). Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1133–1138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.017>
- Shen, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.003>
- Smith, J., & Hong-Shum, L. (2011). *Food Additives Data Book*. John Wiley & Sons.
- Stanojevic, D., & Comic, L. (2009). Antimicrobial effects of Sodium Benzoate, Sodium Nitrite and Potassium Sorbate and their Synergistic Action in vitro. *ResearchGate*, 15(4), 308–312.
- Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *ResearchGate*, 95(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004>
- Türe, H., Gällstedt, M., & Hedenqvist, M. S. (2012). Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate. *Food Research International*, 45(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.012>

# Chapitre IV. Casein/wax blend extrusion for production of edible films as carriers of potassium sorbate

## – A comparative study

Elodie Chevalier<sup>1,2</sup>, Asma Chaabani<sup>1</sup>, Gilles Assezat<sup>2</sup>, Frédéric Prochazka<sup>2</sup>,

Nadia Oulahal<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, Plateforme Alimentec, rue Henri de Boissieu F-01000 Bourg En Bresse, France

<sup>2</sup> Université de Lyon, F-69003, France ; CNRS, UMR5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, F-42023, Saint- Etienne, France

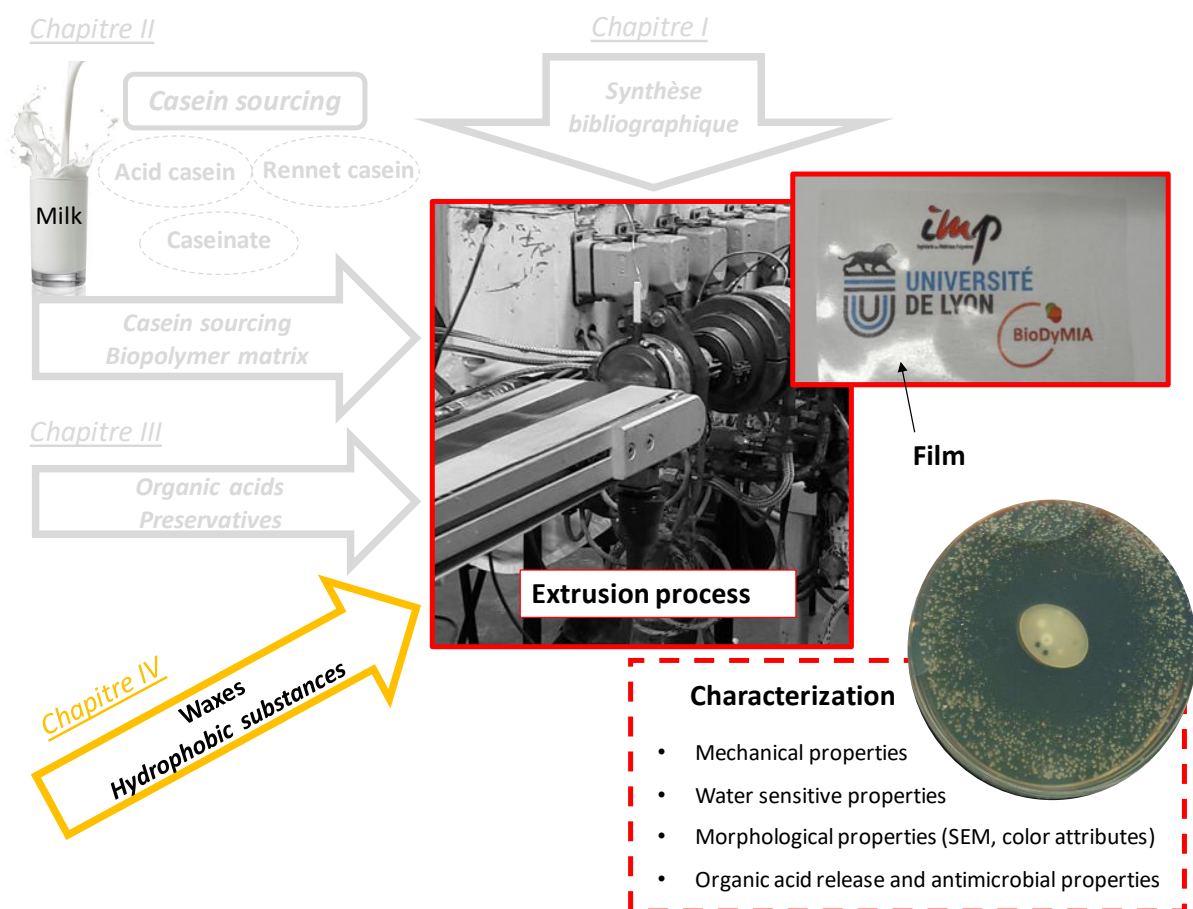


Figure IV-1 : Organisation générale des chapitres du manuscrit – Chapitre IV



## Table des figures

Figure IV-1 : Organisation générale des chapitres du manuscrit – Chapitre IV .....	IV-194
Figure IV-2 : Résumé graphique .....	IV-198
Figure IV-3 : Picture of edible sheet based on casein and 13.2% glycerol (without wax and without KS). Color parameter values are: $a^* = -1.60 \pm 0.05$ ; $b^* = -1.34 \pm 0.02$ ; $L^* = 40.68 \pm 0.54$ .....	IV-208
Figure IV-4 : SEM micrographs of sheets cross-section with 2% KS and no wax (A), 5% beeswax (B), 5% carnauba wax (C), illustrating pore types.....	IV-210
Figure IV-5 : Mechanical properties of the different extruded casein based sheets conditioned at 50% relative humidity (RH) or 80% RH and 30°C (n=5), represented as tensile strength as function of elongation at break. WW: Without wax, BW: Beeswax, CW: Candelilla wax, CaW: Carnauba wax and KS: potassium sorbate.....	IV-213
Figure IV-6 : Inhibition zone diameters of sheets with 0, 2 or 10% KS and different waxes (Beeswax, candelilla wax or Carnauba wax) against <i>Escherichia coli</i> ATCC10536 after 6 days of incubation at 15°C. ....	IV-220
Figure IV-7 : Inhibition zone diameters of sheets with 0, 2 or 10% KS and different waxes (Beeswax, candelilla wax or Carnauba wax) against <i>Escherichia coli</i> ATCC10536 follow-up after 6 days and 20 days of incubation at 15°C.....	IV-222
Figure IV-8 : Charge microbienne développée à partir de prélèvements de croûtes de 2 mois et 6 mois d'affinage en fonction de la présence de différentes formulations de matériaux contenant des cires et du sorbate de potassium (n=3) .....	IV-224

## Table des tableaux

Table IV-1 : Formulations of extruded sheets studied in this work and their abbreviations.....	IV-204
Table IV-2 : CIELab color values ( $a^*$ , $b^*$ and $L^*$ ) and total color difference ( $\Delta E$ ) values of casein based sheets as function of potassium sorbate concentration and wax type and concentration.....	IV-209
Table IV-3 : SEM cross-sectional analysis (n=10) of sheets morphology by evaluation of area covered by dispersed wax particle (%) and dispersed wax particle size ( $\text{mm}^2$ ).....	IV-211
Table IV-4 : Effect of potassium sorbate (KS) and waxes (beeswax-BW; candelilla wax-CW and carnauba wax-CaW) concentration on moisture content (MC), total soluble matter (TSM), potential soluble matter not released from sheet and swelling degree (SW) of extruded casein based sheets.....	IV-215
Table IV-5 : Potassium sorbate release from casein/wax sheets expressed as total KS release amount after 24 h immersion in water at 15°C. ....	IV-219

# Chapitre IV : Extrusion d'un mélange de polymères à base de caséine et de cires pour le développement de films comestibles supports de sorbate de potassium – Une étude comparative

## IV.1 Introduction

Le dernier chapitre de ce manuscrit est également présenté sous forme d'une publication en appliquant la mise en forme du journal. Cet article a été soumis auprès du journal « *Food Packaging and Shelf Life* ».

Les résultats du chapitre précédent, concernant notamment les essais *in situ* sur les fromages, ont montré une bonne tenue du matériau extrudé sur les fromages et une potentielle réponse inhibitrice de la flore qu'il s'agirait de renforcer. En effet, on peut supposer qu'en évitant un gonflement induit par le relargage du lactosérum sortant du caillé pressé trop important et une libération trop rapide des agents de conservation, les étiquettes antimicrobiennes seraient en mesure de rester lisibles plus longuement lors de l'affinage des fromages en caves. Afin de répondre à cette hypothèse, il a été envisagé d'ajouter des composés hydrophobes aux formulations afin de créer un mélange de polymères modifiant ainsi les propriétés de sensibilité à l'eau, dont le gonflement ou la perméabilité à la vapeur d'eau et d'améliorer potentiellement les capacités antimicrobiennes apportées par l'ajout de sorbate de potassium.

Dans ce travail, le procédé d'extrusion a été utilisé pour la fabrication de matériaux à base de caséine présure et de différentes cires (cire d'abeille, cire de candelilla et cire de carnauba). La production d'un mélange protéine/cire par extrusion n'a été réalisée jusqu'à présent que par l'équipe de Janjarasskul et al. avec des protéines de lactosérum et de la cire de candelilla (Janjarasskul, Rauch, McCarthy, & Krochta, 2014). Après avoir réussi à incorporer des cires à raison de 1% ou 5% (m/m de caséine) dans une matrice protéique en extrusion bivis, le matériau ainsi obtenu a été caractérisé. Les caractéristiques visuelles (colorimétrie), les propriétés mécaniques et les propriétés de sensibilité à l'eau telles que, la teneur en eau, le taux de matières solubles, le taux de gonflement à l'eau et la perméabilité à la vapeur d'eau ont été évalués. Afin d'obtenir un matériau antimicrobien, deux concentrations en sorbate de potassium ont été incorporées (2% et 10% m/m de caséine).

Le sorbate de potassium est d'ailleurs pris en compte lors la caractérisation du matériau car à forte concentration il affecte les propriétés de celui-ci comme auparavant démontré par Kowalczyk et al. ou bien Türe et al., avec un effet plastifiant du sorbate (Kowalczyk, Kordowska-Wiater, Solowiej, & Baraniak, 2015; Türe, Gällstedt, Kuktaite, Johansson, & Hedenqvist, 2011).

Ces différentes formulations extrudées ont pu être testées sur une souche modèle *Escherichia coli* ATCC 10536 avant d'être testées sur une flore plus complexe extraite de croûte de Comté de 2 mois et 6 mois d'âge d'affinage.

L'originalité de ce travail réside en particulier dans l'utilisation du procédé d'extrusion à une échelle semi-industrielle, quelques kilogrammes par heure en débit d'entrée en poudre (comparé à l'étude de Janjarasskul et al. qui ont utilisé une extrudeuse de laboratoire – quelques centaines de grammes par heure) (Janjarasskul et al., 2014). En outre, trois origines de cire sont incorporées afin de permettre une étude comparative extensive et d'analyser les relations entre les caractéristiques des cires et les effets sur les propriétés du matériau.

## IV.2 Graphical abstract

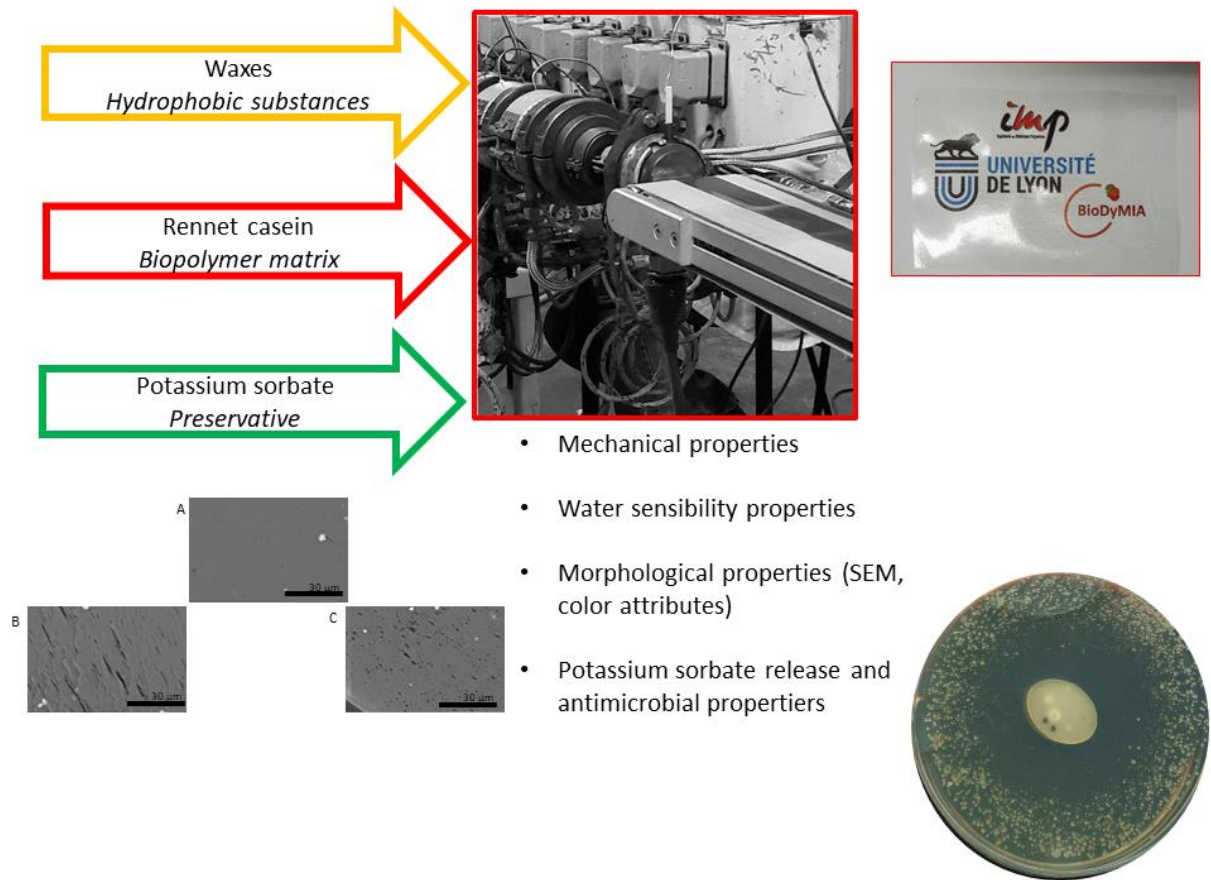


Figure IV-2 : Résumé graphique

### IV.3 Abstract

Potassium sorbate as preservative was incorporated in rennet casein sheets containing waxes (beeswax, candelilla and carnauba waxes) and its release and antimicrobial potential against *Escherichia coli* were analysed. One of the interesting parts of this work is the use of a twin screws extrusion process for the production of casein/wax bioplastics. The presence of KS significantly inhibits *E. coli* and that even at low concentration (10-fold lower than the MIC) and even after 20 days at 15°C, which suggests effect of casein matrix as preservative carrier. Besides, a plasticizing action of KS was demonstrated at 10% addition on mechanical properties (decrease of TS and increase of EB) and on water barrier properties. Concerning water vapour permeability, only beeswax among waxes introduced in sheets was efficient to reduce WVP (by 20%). No significant impact on sheet colour parameters was observed.

The present study demonstrates that casein is a good matrix for waxes incorporation and that a coherent and homogeneous material could be produced with interesting antimicrobial properties thanks to potassium sorbate. Finally, the work provided here might help researches on biopolymer as preservative carriers that can be produced by an easily industrial process.

### IV.4 Keywords:

Extrusion; edible film; casein; wax; potassium sorbate; *Escherichia coli*

## IV.5 Introduction

Packaging wastes and pollution are meant to be reduced in the near future and new packaging solutions should be developed to enhance part of biodegradable and nontoxic packaging. Edible films or sheets are a response to this context concerning new, biodegradable and environmentally friendly packaging research. Additionally, healthier and high-quality foods with longer shelf life are requested nowadays by consumers. In recent years, researches have focusing on active packaging to act as carrier of active substances. Antimicrobials are extensively studied as active molecules incorporated in films to prevent microbial growth in food (Appendini & Hotchkiss, 2002; Cha & Chinnan, 2004; Chowdhury, 2013; Kowalczyk et al., 2015).

Biopolymers based on polysaccharides, lipids or proteins or blends of these categories are often used as matrix for active edible films. Casein is the main protein of milk and has been described as good film forming raw material, allowing production of flexible and transparent films with good oxygen-, aroma- and oil-barrier properties at low relative humidity (Khwaldia, Perez, Banon, Desobry, & Hardy, 2004; Krochta, 2002). Casein proteins were studied by several authors as active molecule carrier (Arrieta et al., 2014; Atarés, Bonilla, & Chiralt, 2010; Colak et al., 2016).

Protein films production can be achieved by two main casting solutions: wet and dry processes. Solution or wet casting is commonly used in the literature to produce edible films. This process allows the production of stand-alone films based on several raw materials (Arrieta et al., 2014; Basiak, Galus, & Lenart, 2015; Emiroğlu, Yemiş, Coşkun, & Candoğan, 2010). However, wet casting is not an easily industrial scale up process that could be used to produce commercial amount of films. Indeed, due to solvent use or energy- and time-consuming solvent evaporation step, this process doesn't seem to be a good replacer of synthetic polymer production. Dry process, like extrusion process, is at the opposite a large-scale production technic. Besides, this process is already used for synthetic polymer production and would just need to be adapted to new biopolymers blends. This continuous process, depending on the extruder size, can involve important feeding rates that imply rapid and large production with great commercial potential. Caseinate proteins have been successfully produced by extrusion process by Colak et al. and Belyammi et al. (Belyamani, Prochazka, & Assezat, 2014; Colak, Gouanve, Degraeve, Espuche, & Prochazka, 2015).

Proteins are recognized as good polymer matrix and imply excellent oxygen, aroma and oil barrier film production up to intermediate relative humidity conditions (Gennadios, 2002).

However, hydrophilic nature of protein results in poor moisture barrier properties as WVP, swelling or solubility for example. Increasing interactions between protein chains by cross-linking and addition of lipids are the two principal techniques studied to decrease hydrophilic character of protein films. Caseinate cross-linking by enzymes, heating treatment,  $\gamma$ -irradiations, formaldehyde or calcium ions have been developed on solvent cast films (Audic & Chaufer, 2005; Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Juvonen et al., 2011; Lacroix, Jobin, Mezgheni, Srour, & Boileau, 1998; Vachon et al., 2000). Protein/lipid blends could be interesting for commercial large-scale production by extrusion to reduce cost of protein based materials. Moreover, polymeric blend films are meant to take advantage of both components, in other words good oxygen barrier from protein and good moisture barrier from lipids for example.

For biopolymers, a swelling induced release is the main mechanism of active compounds release by diffusion of water molecules through polymeric matrix (Mastromatteo, Mastromatteo, Conte, Nobile, & Alessandro, 2010). Therefore, hydrophobic substances incorporation in the biopolymeric matrix is meant to delayed hydration and swelling and subsequently active agents diffusion (Ouattara, Simard, Piette, Bégin, & Holley, 2000; Ozdemir & Floros, 2003).

Concerning protein/lipid blending, few authors presented a work on caseinate and lipid or wax addition where films were exclusively prepared by wet casting (Aliheidari, Fazaeli, Ahmadi, Ghasemlou, & Emam-Djomeh, 2013; Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Chick & Hernandez, 2002; Fabra, Talens, & Chiralt, 2008; Jiménez, Fabra, Talens, & Chiralt, 2013). To the best of our knowledge, incorporation of wax by an extrusion process was only reported by Janjarasskul et al. and Rauch with whey protein isolates as matrix of the material (Janjarasskul et al., 2014; Rauch, D. J., 2008). They proved that wax powder could be incorporated in the dry blend powder up to 8.1% and that extruder operating conditions were affecting films properties.

Casein used in this study are not common in literature indeed, rennet casein is less studied than caseinate because of its insolubility in water without any other treatment and the poor dispersibility observed when solvent casting solution are prepared. Aim of this work, first of all, is to assess the potential of extrusion process on polymeric blend material made of rennet casein and different waxes (beeswax, candelilla wax and carnauba wax). Then, characteristics of sheets produced have been evaluated to determine the extent of modifications occurring by wax addition and particularly concerning water sensibility of sheets. Three different waxes were chosen in this work to have a comparative study of the

effect of wax origin and physicochemical characteristics on the formulation and process. Finally, active edible sheet based on casein/wax have been studied regarding potential carrier of potassium sorbate as antimicrobial agent and antimicrobial properties have been assessed.



## IV.6 Material and methods

### IV.6.1 Materials/Chemicals

Rennet casein native powder was purchased from Eurial Ingredients (Nantes, France). Different waxes (beeswax, candelilla wax or carnauba wax) were purchase from Aroma-Zone (Cabrières d'Avignon, France). Glycerol and potassium sorbate were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

### IV.6.2 Casein sheet preparation

Casein sheets were prepared through a dry process with a co-rotating twin screw extruder as previously described by Colak et al. with modifications (Colak et al., 2015). A blend of rennet casein powder, wax powder and potassium sorbate (depending on the formulation, listed in *Table IV-1*) was introduced into the first zone of the extruder. Glycerol (13.2% w/w of protein powders) and an aqueous solution of acetic acid at 5° were added into the second zone to facilitate processability through amphiphilic property of acetic acid. Temperature from hopper to die (5 cm width and 1 mm thickness) ranged from 10°C to 75°C. Sheets thickness is about 500 µm +/- 50 µm depending on formulation (determined with a digital micrometer). Residence time in twin screw extruder with a flow powder rate of 2 kg/h and screw speed at 170 rpm was determined between 2 and 6 min. Prepared sheets were stored in plastic bags in cold room (4°C) until further experiments. All sheets specimens were conditioned 48 h in a climate room at 50% relative humidity (RH) and 23°C before testing.

Materials obtained differ by wax origin (beeswax, candelilla wax or carnauba wax) and concentration (0%, 1% or 5% w/w of casein) and potassium sorbate concentration (0%, 2% or 10% w/w of casein).

Table IV-1 : Formulations of extruded sheets studied in this work and their abbreviations.

Abbreviations	Formulations (ingredients concentration expressed as percentage w/w of casein)				
<b>Without wax</b>					
KS 0	BW1	Rennet casein	13.2 % glycerol	Beeswax (BW) 1%	
	CW1			Candelilla wax (CW) 1%	
	CaW1			Carnauba wax (CaW)1%	
<b>Without wax</b>					
KS 2	BW1	Rennet casein	13.2 % glycerol	Beeswax 1%	
	BW5			Beeswax 5%	
	CW1			Potassium sorbate (KS) 2%	Candelilla wax 1%
	CW5*				Candelilla wax 5%
	CaW1				Carnauba wax 1%
	CaW5				Carnauba wax 5%
<b>Without wax</b>					
KS 10	BW1	Rennet casein	13.2 % glycerol	Beeswax 1%	
	CW1			Potassium sorbate 10%	Candelilla wax 1%
	CaW1				Carnauba wax 1%

*CW5\* / KS2 : High concentration (5%) of candelilla wax did not produce a coherent and homogenous matrix through extrusion technic*

## IV.6.3 Visual and morphological characterization

### IV.6.3.1 Color

Color of sheets was determined with a colorimeter (Minolta chromameter CR-200) using the CIELAB color parameters. L, a, and b values were averaged from 9 readings across for each sample on a on black background: a =  $-1.62 \pm 0.03$ ; b =  $-1.47 \pm 0.02$ ; L =  $30.10 \pm 0.05$ . The total color difference ( $\Delta E$ ) was calculated according to the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  and  $\Delta b^*$  are the differentials between a sample color parameter and the color parameters of formulation without wax and without potassium sorbate used as standard. Parameters of this standard material are the followings (on black background):  $a^* = -1.60 \pm 0.05$ ;  $b^* = -1.34 \pm 0.02$ ;  $L^* = 40.68 \pm 0.54$ .

#### *IV.6.3.2 Scanning electron microscopy (SEM)*

Microstructure of cryofractured sheets were examined by Scanning Electron Microscopy (SEM) (Hitachi TM3030, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan).

The cryofractured sheets were mounted on aluminium stubs using double sided carbon adhesive tape. 15 kV of accelerating voltage was used to test all samples. Pictures were analysed by ImageJ software to determined porosity as percentage of area covered by pores and pores size.

#### *IV.6.4 Mechanical properties*

Tensile specimens were cut as  $L=20$  mm,  $b_1=4.5$  mm,  $b_2=8.5$  mm, where  $L$  is the distance between shoulders,  $b_1$  is width of part between shoulders and  $b_2$  is width of grip section. Samples thickness was approximately  $500 \pm 50$   $\mu\text{m}$  (determined with a digital micrometer). Test specimens were conditioned at 50% RH and 80% RH at 30°C during one week before tensile test. Five specimens were tested per each composition. Testing was conducted on a Shimadzu Autograph AGS-X test machine (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) fitted with a calibrated 500 N load cell and a cross-head speed of 5 mm/min. Ultimate tensile strength (TS) and elongation at break (EB) were obtained and the mean for each sample was plot on a graph.

#### *IV.6.5 Water sensibility properties*

##### *IV.6.5.1 Moisture content (MC)*

The moisture content was determined by Karl Fisher method. Small discs of 4mm diameter were cut and placed at 50% RH, 23°C for 48 h. Discs were weighed and then heated up to 110°C. Moisture content was determined by using a 899 Karl Fisher coulometer (Metrohm, Herisau, Switzerland). Moisture content was considered for theoretical total soluble matter calculation with glycerol content and potassium sorbate content.

#### IV.6.5.2 Total soluble matter (TSM) and Swelling index (SW)

For all tests, 1.5 cm diameter discs of sheet samples were cut and conditioned at 50% RH, 23°C in a climate room for 48 h and weighed ( $m_1$ ). Conditioned samples were then dried in a ventilated oven at 60°C during 24 h. Dried samples were soaked in distilled water containing 0.02% sodium azide (to avoid growth of microorganisms) during 24 h under oscillating agitation and weight of insoluble remaining part of the samples was read after a quick drying on absorbent paper ( $m_2$ ). Wet samples were dried again in a ventilated oven at 60°C during 24 h. Finally, dried samples were placed in the climate room at 50% RH at 23°C and weighed after 48 h ( $m_3$ ).

With weights determined for six replicates per sample, total soluble matter and swelling index were determined according to the following equations:

$$\text{Total soluble matter (\%)} = \left(100 - \frac{m_3}{m_1}\right) * 100$$

$$\text{Swelling index (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_3} * 100$$

#### IV.6.5.3 Water vapor permeability (WVP)

The gravimetric modified cup method based on ASTM E96/E96M was used with modifications to determine the WVP of edible sheets. Sheets were cut into circles (65 mm in diameter) and a digital micrometer was used to measure their thickness at three random spots, which were then averaged (noted  $\delta$ ).

Sheet samples were sealed (with sealant) on the top of cups containing saturated solution of NaCl (75% RH) and placed in a climate room at 50% RH and 23°C. Weight measurements were taken at regular time intervals (about 4h) over 3 days and the weight variations were plotted as a function of time. Measurements were performed in triplicate. Linear regression was used to determine the water vapor transmission rate (WVTR), which is the slope/ sheet area. The WVP was calculated by the following relationship.

$$WVP (g.Pa^{-1}.s^{-1}.m^{-1}) = \frac{WVTR . \delta}{S(R_1 - R_2)}$$

Where, S is the saturated vapour pressure and  $R_1$  and  $R_2$  are the inside and outside cup relative humidity.

#### IV.6.6 Potassium sorbate release in water analysed by HPLC

Water was chosen as an aqueous food stimulant to study potassium sorbate release kinetic from material. Sheet discs of 1.5 cm diameter were cut and conditioned 48 h at 50% RH and 23°C before being weighed. The discs were placed in tubes containing 10 mL of deionized water and 0.02% sodium azide (to avoid microbial growth during experiment). Tubes were placed at 15°C under light oscillating agitation during 24h. Experiment was carried out in duplicate. After 24 h water samples were taken from each tube to be analysed by HPLC. Potassium sorbate release analyses were carried out in a high-performance liquid chromatograph (Schimadzu, Kyoto, Japan). A Varian MetaCarb 87H column (dimensions: 300 \* 7.8 mm<sup>2</sup>) (Agilent Technologies, Santa Clara, France) was used with sulfuric acid at 0.04N (isocratic elution) as mobile phase. The flow rate was 0.6 mL/min. Other HPLC parameters are an injection volume of 50 µL of collected samples (placed in autosampler cooled at 4°C during analysis) and a column oven temperature of 65°C. Potassium sorbate was followed by a diode array detector at 260 nm.

#### IV.6.7 Antimicrobial activity

To evaluate the capacity of retention or release of potassium sorbate from rennet casein/wax blend and its antimicrobial capacity, agar disc diffusion method was used. Discs of 1.5 cm diameter were cut from material extruded strip.

TSA (tryptic soy agar) plates were inoculated in surface with *Escherichia coli* ATCC10536 10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. Material was then disposed on the middle of Petri dishes. Inoculated plates containing material to test were placed in humid chamber conditions during period of the experiment. Plates were placed for 2 hours at 4°C (to allow diffusion of potassium sorbate without strain growth) before incubation at 15°C.

Scans of Petri dishes after 6 days and 20 days of incubation were analysed using software ImageJ to determine inhibition diameter for each material. This assay was performed 2 times in triplicate for each material.

#### IV.6.8 Statistical analyses

Data were analysed with XLSTAT software (Addinsoft, v19.02). Fisher's test was used to compare the statistical difference of compositions within the different experiments through one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## IV.7 Results and discussion

Coherent sheets were extruded with waxes and antimicrobial agent studied (potassium sorbate). No macroscopic change of sheets was observed except for formulation with 5% of candelilla wax. Extrusion of this blend was difficult, candelilla wax was not completely incorporated in the matrix, and final sheet was not homogenous and smooth compared to other formulations. Therefore, high concentration (5%) of candelilla wax formulation was not studied further in this work.

### IV.7.1 Visual and morphological characterization

#### IV.7.1.1 Color

Edible sheets of this study are aimed for food applications and the transparency is an important factor to consider. This attribute is essential for consumer acceptability. In the case of wax addition, color change and especially opacity change should be avoided.

Lab color values of different sheets based on casein and glycerol were obtained to observe influence of wax addition and potassium sorbate addition. Standard chosen is the formulation without wax and without potassium sorbate presented in *Figure IV-3*.



*Figure IV-3* : Picture of edible sheet based on casein and 13.2% glycerol (without wax and without KS). Color parameter values are:  $a^* = -1.60 \pm 0.05$ ;  $b^* = -1.34 \pm 0.02$ ;  $L^* = 40.68 \pm 0.54$ .

*This sheet is used as standard for the determination of total color difference ( $\Delta E$ ).*

The standard sheet values are:  $a^* = -1.60 \pm 0.05$ ;  $b^* = -1.34 \pm 0.02$ ;  $L^* = 40.68 \pm 0.54$ . The  $L^*$  value indicates lightness of sheets and as the  $L^*$  value increases, the sheets are more coloured (measures on black background). Background was proved to influence color measurements and Meléndez-Martínez et al. and Stinco et al. proved that black background allows the best color discrimination between samples (Meléndez-Martínez, Vicario, & Heredia, 2005; Stinco et al., 2012). Standard sheet has  $L^*$  value a little higher than black background indicating a good transparency of sheets as shown in *Figure IV-3*.

*Table IV-2 : CIELab color values ( $a^*$ ,  $b^*$  and  $L^*$ ) and total color difference ( $\Delta E$ ) values of casein based sheets as function of potassium sorbate concentration and wax type and concentration.*

		$a^*$	$b^*$	$L^*$	$\Delta E$
	<b>Without wax</b>	$-1.60 \pm 0.05^c$	$-1.34 \pm 0.02^c$	$40.68 \pm 0.54^{ef}$	$0.42 \pm 0.30^g$ (Standard used for comparison)
<b>KS 0</b>	<b>BW1</b>	$-1.62 \pm 0.02^{cd}$	$-1.57 \pm 0.03^f$	$40.79 \pm 0.51^{de}$	$0.54 \pm 0.11^{fg}$
	<b>CW1</b>	$-1.68 \pm 0.04^{cde}$	$-1.43 \pm 0.07^{de}$	$40.86 \pm 0.53^{de}$	$0.45 \pm 0.32^{fg}$
	<b>CaW1</b>	$-1.58 \pm 0.03^c$	$-1.48 \pm 0.03^e$	$40.27 \pm 0.59^f$	$0.66 \pm 0.26^{efg}$
	<b>BW1</b>	$-1.02 \pm 0.35^a$	$-1.67 \pm 0.07^g$	$40.45 \pm 0.69^{ef}$	$0.96 \pm 0.38^{de}$
	<b>BW5</b>	$-1.40 \pm 0.03^b$	$-1.69 \pm 0.03^g$	$41.84 \pm 0.76^c$	$1.28 \pm 0.66^{cd}$
<b>KS 2</b>	<b>CW1</b>	$-1.71 \pm 0.04^{def}$	$-1.18 \pm 0.04^a$	$41.25 \pm 0.74^d$	$0.77 \pm 0.55^{ef}$
	<b>CaW1</b>	$-1.61 \pm 0.04^c$	$-1.39 \pm 0.04^{cd}$	$40.21 \pm 0.28^f$	$0.48 \pm 0.28^{fg}$
	<b>CaW5</b>	$-1.63 \pm 0.03^{cd}$	$-1.25 \pm 0.04^b$	$39.21 \pm 0.27^g$	$1.47 \pm 0.27^c$
	<b>BW1</b>	$-1.78 \pm 0.04^{ef}$	$-2.83 \pm 0.06^h$	$42.88 \pm 0.21^b$	$2.67 \pm 0.20^b$
<b>KS 10</b>	<b>CW1</b>	$-1.91 \pm 0.04^g$	$-2.98 \pm 0.13^i$	$43.69 \pm 0.21^a$	$3.45 \pm 0.15^a$
	<b>CaW1</b>	$-1.80 \pm 0.07^f$	$-2.96 \pm 0.10^i$	$42.98 \pm 0.57^b$	$2.84 \pm 0.51^b$

Data is presented as mean  $\pm$  standard error and means with different superscript alphabets in the column are significantly different ( $p < 0.05$ )

The highest  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values were exhibited by formulations containing 10% of potassium sorbate (*Table IV-2*). The total color difference ( $\Delta E$ ) provide a good mean of sheet comparison since all color parameters are involved.  $\Delta E$  is higher as potassium sorbate increases. Increased opacity due to KS has already been reported by Kowalczyk et al. for carboxymethyl cellulose, gelatine or oxidized potato starch films (Kowalczyk et al., 2015). The change in opacity could be explained by solid state of KS particles that may cause heterogeneity in sheets that decrease the light transmission.

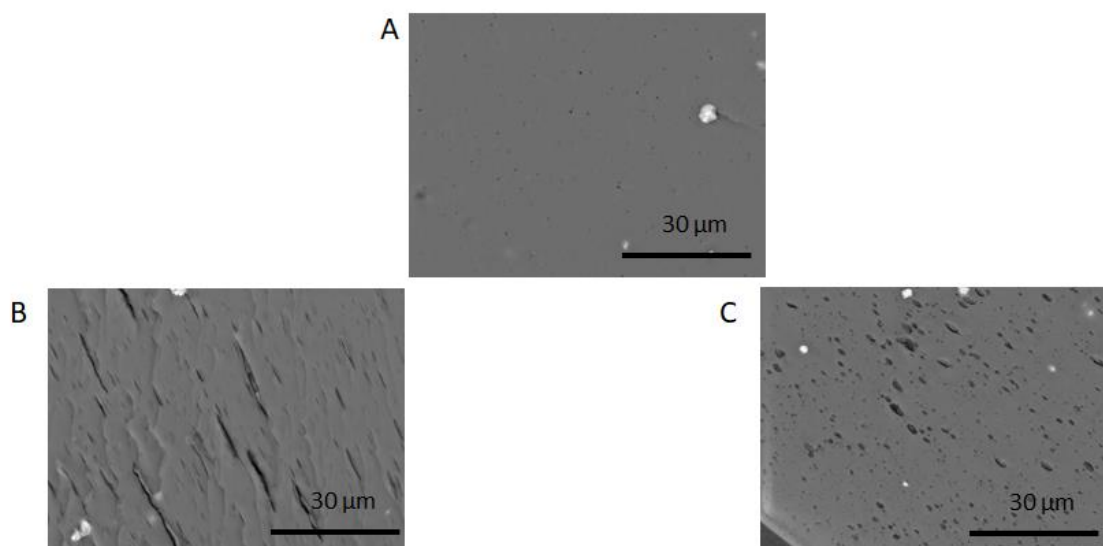
Concerning yellowish color it could be attributed to oxidative degradation of KS by cleavage of the double bonds and leading to aldehydes and ketones which may cause also

off-flavours (Chowdhury, 2013, 6592880, 2003, 6495718, 2002). Polymerization products of aldehydes can react with amino groups and lead to Maillard products that are responsible for color changes, especially yellowish color. Sheet protein matrix might have undergone interactions with KS that could induce yellow color (Ofman, Campos, & Gerschenson, 2004; Valencia-Chamorro, Palou, del Río, & Pérez-Gago, 2008).

The presence of 1% of wax without KS doesn't affect sheet color ( $P < 0.05$ ). Even with increased wax concentration sheets colors are not significantly affected ( $\Delta E$  comprised between 0.77 and 1.28) except for carnauba wax at 5% that got  $\Delta E$  of 1.47, which is still a slightly perceptible change. Several studies have reported a significant increase of total color difference with wax addition in edible films compositions, therefore it could be supposed that the stable color with wax could be attributed to extrusion process compared to other authors that used emulsion solvent casting (Muscat, Adhikari, McKnight, Guo, & Adhikari, 2013; Rodrigues et al., 2014). This result concerning wax incorporation in sheets allowing a better color stability of edible sheet is very interesting for industrial food applications. Overall the total color difference of all sheets is under 6 and difference from the reference without wax and KS is only perceptible through very close observations.

#### *IV.7.1.2 Scanning electron microscopy (SEM)*

In the present study impact of KS and wax addition on material morphology was evaluated by SEM observations. Freeze-fractured cross section showed presence of waxes and the typical dispersion in extruded materials (*Figure IV-4*).



*Figure IV-4 : SEM micrographs of sheets cross-section with 2% KS and no wax (A), 5% beeswax (B), 5% carnauba wax (C), illustrating pore types.*



Indeed, through analysis of SEM pictures presented in *Table IV-3* morphology observed could be correlated to wax particle dispersion since area observed on SEM cross-section (dark phase on pictures) is corresponding to the percentage of wax addition in the protein matrix. Regardless type of wax incorporated, when 1% of wax is added, around 1% of area is observed as a phase dispersion in the protein matrix in SEM observations; similarly, for 5% wax incorporation, around 5% of area observed correspond to a phase dispersion. Area analysis corresponds to wax particles dispersion in the protein matrix and this observation proves that waxes were homogeneously dispersed in sheets during extrusion process. Phase dispersion was previously observed on extruded sheets based on whey protein isolate and candelilla wax produce by Janjarasskul et al. (Janjarasskul et al., 2014).

*Table IV-3 : SEM cross-sectional analysis (n=10) of sheets morphology by evaluation of area covered by dispersed wax particle (%) and dispersed wax particle size (mm<sup>2</sup>).*

		<b>Area covered by dispersed wax particle (%)</b>	<b>Dispersed wax particle size (in mm<sup>2</sup>)</b>
<b>KS 0</b>	<b>Without wax</b>	0.4 ± 0.2 <sup>f</sup>	0.12 ± 0.04 <sup>c</sup>
	<b>BW1</b>	1.2 ± 0.3 <sup>cde</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>c</sup>
	<b>CW1</b>	0.9 ± 0.3 <sup>def</sup>	0.15 ± 0.03 <sup>c</sup>
	<b>CaW1</b>	1.3 ± 0.5 <sup>cd</sup>	0.27 ± 0.11 <sup>c</sup>
<b>KS 2</b>	<b>Without wax</b>	0.3 ± 0.1 <sup>f</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>c</sup>
	<b>BW1</b>	1.4 ± 0.2 <sup>cd</sup>	0.22 ± 0.04 <sup>c</sup>
	<b>BW5</b>	6.2 ± 2.2 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.89 <sup>a</sup>
	<b>CW1</b>	1.1 ± 0.3 <sup>de</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>c</sup>
	<b>CaW1</b>	0.8 ± 0.5 <sup>def</sup>	0.14 ± 0.04 <sup>c</sup>
	<b>CaW5</b>	5.4 ± 1.6 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.13 <sup>b</sup>
<b>KS 10</b>	<b>Without wax</b>	0.7 ± 0.3 <sup>ef</sup>	0.21 ± 0.09 <sup>c</sup>
	<b>BW1</b>	1.8 ± 0.7 <sup>c</sup>	0.27 ± 0.08 <sup>c</sup>
	<b>CW1</b>	1.2 ± 0.4 <sup>de</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>c</sup>
	<b>CaW1</b>	1.0 ± 0.3 <sup>def</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>c</sup>

Wax addition at 1% is affecting sheet morphology properties and 5% wax addition (beeswax and carnauba wax) has a significant effect on sheet morphology. SEM pictures from these particular formulations with 5% wax are illustrated in *Figure IV-4*.

The shape and size of wax particles, especially obvious at high wax concentration, depend on wax origin (*Figure IV-4*). Indeed, shape factors observed for 5% wax addition are significantly depending on type of wax incorporated.

Beeswax seems to bring long and tight particles shape (*Figure IV-4, B*) since carnauba wax particles are smaller but numerous of them are present (*Figure IV-4, C*). Particles shape might be due to melting temperature and hardness properties of waxes since these parameters could influence differently blend softening inside the extruder. Melting temperature is lower for beeswax (62-65°C) than for carnauba wax (83-86°C). Since extrusion process temperature is under 75°C, beeswax particles will have less viscosity and particles will flow and formed elongated particles in the matrix. The different wax particles shapes can significantly affect barrier properties by influencing material tortuosity.

#### IV.7.2 Mechanical properties

Waxes have shown to modify material morphology and wax particles shape in the protein matrix is depending on wax origin which could impact sheet mechanical properties. Mechanical properties of sheets containing waxes and KS are presented in *Figure IV-5* expressed as Young modulus (*Figure IV-5, A*) or as Ultimate tensile strength as function of Elongation at break (*Figure IV-5, B*). Two conditioning conditions (50% RH and 80% RH) were studied to see influence of wax addition on mechanical properties of casein hydrophilic matrix under two humidity conditions.

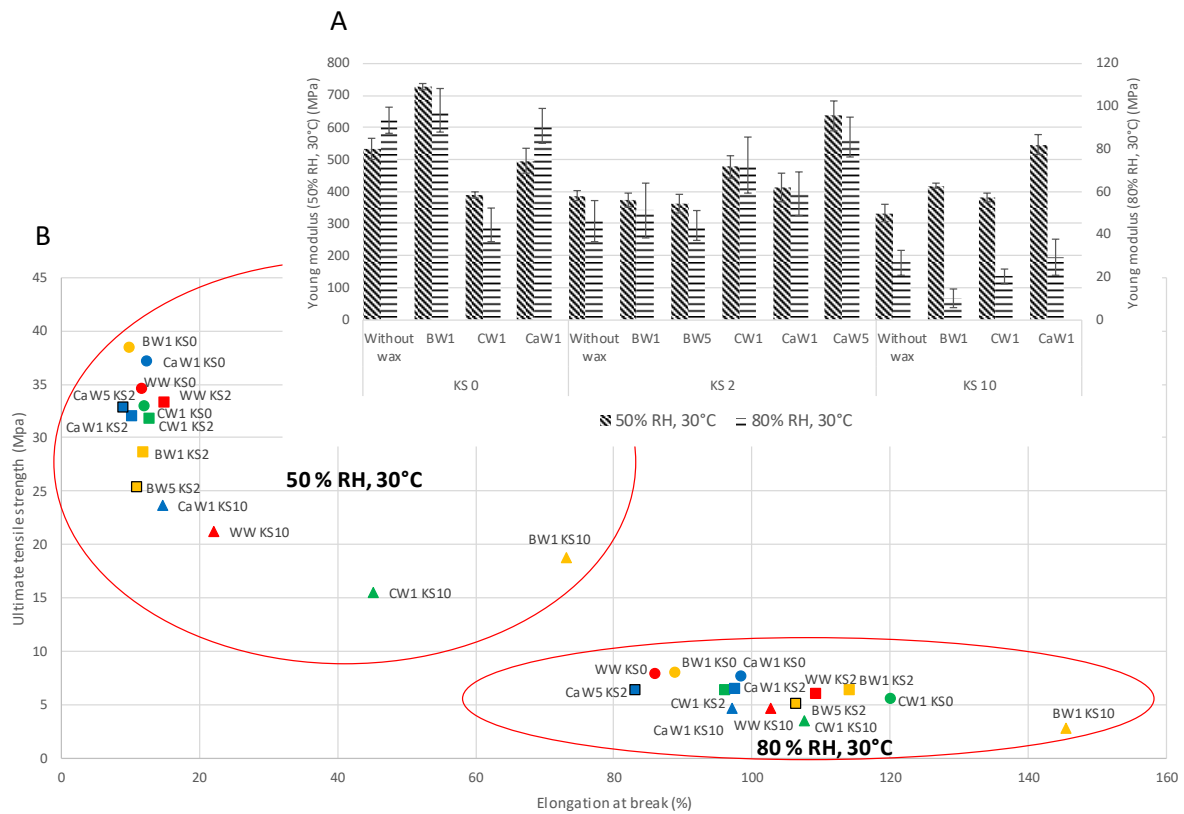


Figure IV-5 : Mechanical properties of the different extruded casein based sheets conditioned at 50% relative humidity (RH) or 80% RH and 30°C (n=5), represented as tensile strength as function of elongation at break. WW: Without wax, BW: Beeswax, CW: Candelilla wax, CaW: Carnauba wax and KS: potassium sorbate.

#### IV.7.2.1 Effect of moisture content

Relative humidity conditioning affects greatly material even with wax addition. Water molecules are commonly used as plasticizer for hydrocolloids edible films production. Figure IV-5 reveals that water affect significantly casein extruded sheets mechanical properties since Young modulus (YM) and ultimate tensile strength (TS) are decreased by 5-10 times with 80% RH conditioning. Similarly, elongation at break (EB) increases by 2-9 times with higher sample relative humidity conditioning. Moisture acts as plasticizer and decreases intermolecular interactions and by this way increase free volume and finally decrease mechanical resistance (Sobral, Menegalli, Hubinger, & Roques, 2001).

#### *IV.7.2.2 Effect of potassium sorbate*

KS incorporation is modifying significantly mechanical properties of sheets. When KS concentration increased, YM and TS are decreasing and EB is increasing. This result is in keeping with other researches, where it has been suggested that KS act as a plasticizer (Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2005; Kowalczyk et al., 2015; Shen, Wu, Chen, & Zhao, 2010). Indeed, several authors have observed a plasticizing effect of KS in biopolymers and Türe et al. proved that glass transition temperature was decreasing when concentration of KS is higher in wheat gluten films (Türe, Gällstedt, & Hedenqvist, 2012). As plasticizing agent, potassium sorbate can modify the polymer network by disrupting and decreasing polymer interchain, increasing free volume and lowering the glass transition temperature.

#### *IV.7.2.3 Effect of waxes*

Wax incorporation at 5% appears to reduce EB especially at 80% RH. Carnauba wax incorporated at high concentration (5%) affects significantly mechanical properties and particularly YM and EB. Incorporation of 5 times more carnauba wax led to an increase of YM up to 35% (50% RH) and a decrease of EB up to 15% (80% RH). Waxes are hydrophobic substances that are brittle therefore at high concentration in the matrix it can affect sheet properties and especially by preventing good water binding. Similar results were found by Janjarasskul et al. for extruded sheets containing between 5.3 and 8.1% (w/w of whey protein) of candelilla wax (Janjarasskul et al., 2014). However, beeswax at 1% had generally greater EB and lower TS than candelilla wax, carnauba wax and sheet without wax. Talens and Krochta already reported more stretchable and flexible films through use of beeswax compared to carnauba wax with whey protein isolate matrix (Talens & Krochta, 2005).

Table IV-4 : Effect of potassium sorbate (KS) and waxes (beeswax-BW; candelilla wax-CW and carnauba wax-CaW) concentration on moisture content (MC), total soluble matter (TSM), potential soluble matter not released from sheet and swelling degree (SW) of extruded casein based sheets.

	WVP ( $10^{12} \cdot \text{g.m/Pa.s.m}^2$ )	Moisture content MC (% g/g dry basis)	Theoretical total soluble matter TSM (%) (= moisture content + glycerol content (13,2%) + KS content)	Measured total soluble matter TSM (%)	Potential soluble matter not release from material (%)	Swelling index SW (%)	
<b>KS 0</b>	<b>Without wax</b>	6.89 ± 1.11 <sup>def</sup>	7.54 ± 1.19 <sup>a</sup>	20.7	19.1 ± 0.4 <sup>bcd</sup>	8.0	148.8 ± 3.0 <sup>b</sup>
	<b>BW1</b>	5.51 ± 0.63 <sup>gh</sup>	7.26 ± 0.01 <sup>a</sup>	20.5	17.1 ± 1.7 <sup>ef</sup>	16.7	159.6 ± 6.5 <sup>b</sup>
	<b>CW1</b>	6.66 ± 0.45 <sup>ef</sup>	6.20 ± 0.22 <sup>bcd</sup>	19.4	17.3 ± 1.4 <sup>def</sup>	10.9	124.6 ± 8.7 <sup>cd</sup>
	<b>CaW1</b>	6.18 ± 0.96 <sup>fgh</sup>	5.99 ± 0.04 <sup>bcd</sup>	19.2	16.7 ± 1.1 <sup>f</sup>	12.8	116.1 ± 5.9 <sup>d</sup>
<b>KS 2</b>	<b>Without wax</b>	6.56 ± 0.97 <sup>efg</sup>	6.80 ± 0.54 <sup>ab</sup>	22.0	18.6 ± 1.7 <sup>cde</sup>	15.4	131.2 ± 7.6 <sup>c</sup>
	<b>BW1</b>	5.25 ± 0.26 <sup>h</sup>	7.29 ± 1.10 <sup>a</sup>	22.5	19.1 ± 1.7 <sup>bc</sup>	14.9	149.7 ± 6.9 <sup>b</sup>
	<b>BW5</b>	4.90 ± 0.33 <sup>h</sup>	5.94 ± 0.23 <sup>bcd</sup>	21.1	18.9 ± 1.7 <sup>bcde</sup>	10.8	151.7 ± 6.1 <sup>b</sup>
	<b>CW1</b>	7.52 ± 1.06 <sup>cde</sup>	6.33 ± 0.05 <sup>bcd</sup>	21.5	18.9 ± 1.1 <sup>def</sup>	12.3	126.3 ± 9.0 <sup>cd</sup>
	<b>CaW1</b>	7.35 ± 1.51 <sup>cdef</sup>	6.54 ± 0.18 <sup>bcd</sup>	21.7	18.4 ± 1.3 <sup>cdef</sup>	15.2	98.5 ± 5.8 <sup>e</sup>
	<b>CaW5</b>	6.01 ± 0.70 <sup>fgh</sup>	5.87 ± 0.31 <sup>cd</sup>	21.1	18.2 ± 1.2 <sup>cdef</sup>	13.5	100.6 ± 8.6 <sup>e</sup>
<b>KS 10</b>	<b>Without wax</b>	9.2 ± 0.90 <sup>ab</sup>	5.77 ± 0.69 <sup>cd</sup>	29.0	23.8 ± 1.8 <sup>a</sup>	17.9	157.8 ± 3.6 <sup>b</sup>
	<b>BW1</b>	8.03 ± 0.72 <sup>bcd</sup>	6.20 ± 0.23 <sup>bcd</sup>	29.4	23.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	20.0	172.0 ± 11.4 <sup>a</sup>
	<b>CW1</b>	9.59 ± 1.41 <sup>a</sup>	6.79 ± 0.09 <sup>ab</sup>	30.0	20.6 ± 1.4 <sup>b</sup>	31.2	125.6 ± 6.0 <sup>cd</sup>
	<b>CaW1</b>	8.61 ± 0.26 <sup>abc</sup>	6.65 ± 0.21 <sup>abc</sup>	29.8	23.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	22.7	149.1 ± 4.9 <sup>b</sup>

Data is presented as mean ± standard error and means with different superscript alphabets in the column are significantly different (p < 0.05)

These authors have suggested that significant amounts of free fatty acids were responsible of viscous property of beeswax and that esters of hydroxylated fatty acids (12 carbon atoms) contribute to carnauba wax hardness. Carnauba wax shown less elongated particles shape on SEM pictures (*Figure IV-4*) that could also explain higher TS and lower EB of this wax. Beeswax seems to have a greater plasticizing effect that could be attributed to the lower melting temperature 62-65°C) and hardness of beeswax (Shellhammer & Krochta, 1997). Beeswax is also the wax type among the 3 that exhibited higher moisture content (see *Table IV-4*) and water, as previously described, is an important plasticizer for biopolymers, which might explain its particular mechanical properties. Nevertheless, casein/wax blend extruded sheet with similar TS and EB values to casein based sheets can be made. Without considering potassium sorbate (KS), TS of formulations without wax and with 1% waxes varied from 32.8 to 37.1 and from 5.4 to 7.8 for 50% RH and 80% RH respectively. Just as TS, EB is similar at 0% KS for all formulations from 9.9 to 12.5 for 50% RH for example. This result proved that extrusion process allowed a compact and continuous sheet formation for casein/1% wax blends. Haq et al. have produced gum cordia/beeswax sheet by solvent casting process and encounter a decrease in TS and EB due to poor incorporation of beeswax (Haq, Hasnain, Jafri, Akbar, & Khan, 2016). Janjarasskul et al. compared different processes among solution casting and extrusion to produce whey protein/candelilla wax sheets and found that tensile properties are in general better for extruded sheets than solution-cast sheets except at wax concentration above 5.3% (w/w protein) (Janjarasskul et al., 2014). As in the previously described work, 5% of candelilla wax seems to be a limit of incorporation to get homogenous and coherent material but not for carnauba wax and even less for beeswax incorporation.

Depending on concentration of KS, wax origin and concentration and relative humidity environment, a wide range of mechanical properties are available and this is a useful to predict potential applications.

### IV.7.3 Water sensitive properties (WVP, MC, TSM, SW)

Protein based material are highly water sensitive and poor water barriers. Water resistance properties are of great interest for fresh food or other food containing moisture to prevent them from drying out. *Table IV-4* shows the water sensibility and affinity of the different casein based sheets depending on KS and wax addition.

#### *IV.7.3.1 Effect of potassium sorbate*

Sorbate addition affects significantly and negatively WVP since 10% of KS increased WVP by 33% compared to material without KS. This result is similar to other studies where barrier properties decreased as potassium sorbate concentration increased (Chowdhury, 2013; Kowalczyk et al., 2015; Kristo, Koutsoumanis, & Biliaderis, 2008; Pranoto, Rakshit, & Salokhe, 2005; Shen et al., 2010; Türe et al., 2012). As previously described, KS seems to act as plasticizer and increases chain mobility and free volume which cause an increase in water permeability (Pranoto et al., 2005). Effect of high KS concentration indicates modification of sheet structure that impact directly water permeation. KS is a hygroscopic substance that can link water molecules but this explanation was not considered in this study since moisture content of sheets containing more KS is not increasing. However, higher KS concentration formulation seems to link less water molecules, which could imply interactions between casein network and KS. TSM tends to confirm this trend with 8%, 15.4% and 17.9% of soluble matter (probably KS) not release from material at 0%, 2% and 10% of KS concentration respectively. Casein based material containing KS concentration seems to be easily penetrated by water but water molecules are not particularly linked to the network. However, sorbate presence at only 2% did not affect WVP. Cagri et al. reported similar result for protein sheets containing 0.5% and 0.75% of sorbic acid (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2001).

#### *IV.7.3.2 Effect of waxes*

Lipid addition to hydrophilic sheets is aimed to improved water barrier. In this work, wax origin was found to affect wax efficiency to reduce WVP. Formulations at 2% of KS allow comparison between beeswax, candelilla wax and carnauba wax at 1% and 5%. Similar results (with 1% of waxes) are observed for 0% and 10% of KS. Generally, beeswax is the most efficient wax which decreases WVP by 20% in this work. Difference between waxes water barrier efficiency could probably be attributed to the shape factors observed in SEM pictures for dispersed wax particles in the protein matrix. Beeswax elongated particles could act as factors affecting the tortuous pathways for water molecules and allow increased water vapor barrier. Beeswax particles are elongated in shape and uniformly dispersed in the protein matrix and could increase the tortuous migration path length of water molecules diffusing through the material, improving water vapor barrier. Several studies have reported the good moisture barrier of beeswax (often compared to other lipid substances) in association with wheat gluten, whey protein and cellulose for example (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Fennema, Donhowe, & Kester, 1994; Gontard, Duchez, Cuq, & Guilbert, 1994; Kester & Fennema, 1989; Shellhammer & Krochta, 1997). Haq et al. already reported decrease of WVP due to wax addition at 5 to 20% (w/w) (Haq et al., 2016). WVP decrease described by these authors was much higher than in this work due to wax concentration but WVP measurements are also highly dependent on applied pressure difference (25% RH difference in this work and between 58 and 90% RH difference in Haq et al. study). Carnauba wax decreases WVP only by 8% and this at high concentration (5%) compared to beeswax that decrease significantly WVP even at 1% of concentration. Shih et al. also reported no significant decrease in WVP values under 50% of rice wax w/w pullulan, which is a wax similar in composition with carnauba wax (Shih, Daigle, & Champagne, 2011). Besides, various parameters are affecting WVP of extruded material and can explain poor water barrier even with wax addition, as extruder configurations, screw speed, feed rate and operating conditions (Rauch, D. J., 2008).

Wax addition is affecting moisture content only at 5% concentration by lowering water uptake. The soluble fraction however seems to be significantly affected by wax (except for formulations at 2% KS). Potential soluble matter that is not released from sheets increases with wax. Concerning swelling degree, candelilla and carnauba wax were more efficient to reduce swelling. Beeswax unlike other waxes increased the swelling degree of 7 to 15% depending on sorbate concentration. This result with lower WVP of beeswax containing sheet might imply that this formulation is a better moisture barrier because passing



aqueous vapor is immobilized inside the network and make it swell instead of passing through due to the more tortuous path length for water molecules (Kowalczyk et al., 2015).

#### IV.7.4 Potassium sorbate release in water analysed by HPLC

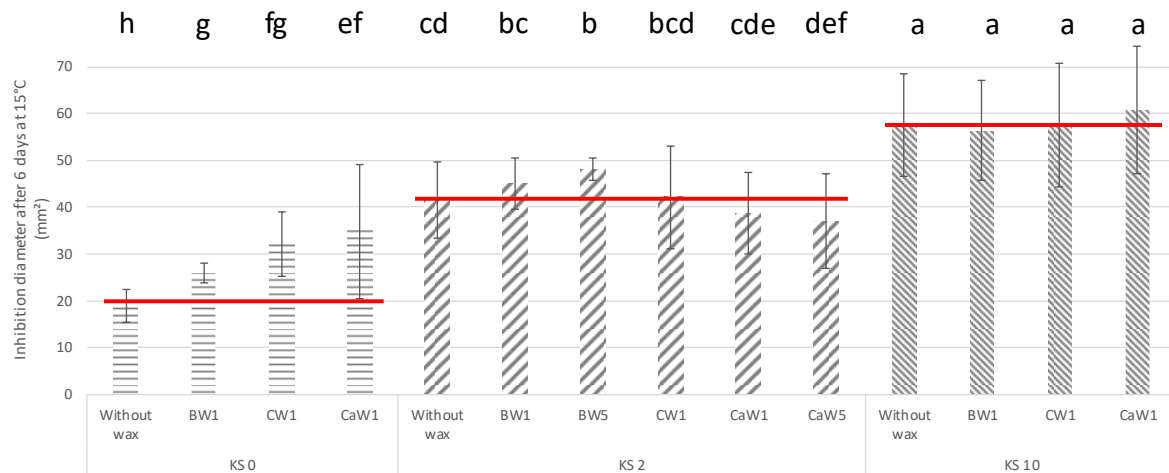
Waxes were introduced into sheets formulation to increase hydrophobicity of the material and modify swelling induced release of active compound (KS). Total release after 24h is presented in *Table IV-5*. Waxes added to casein matrix is reducing the amount of total KS released. Ozdemir et al. found that wax increased films tortuosity and this may explain lower release amount observed in presence of waxes (Ozdemir & Floros, 2003). Sheets containing waxes appeared to retain KS better than control sheets, which was assumed also with total soluble matter estimated to remains in the matrix (in *Table IV-4*).

*Table IV-5 : Potassium sorbate release from casein/wax sheets expressed as total KS release amount after 24 h immersion in water at 15°C.*

		Total potassium sorbate amount release after 24h (mg)
KS 2	Without wax	17.7 ± 0.1 <sup>ab</sup>
	BW1	16.7 ± 5.1 <sup>ab</sup>
	BW5	14.4 ± 0.2 <sup>b</sup>
	CW1	15.7 ± 0.1 <sup>b</sup>
	CaW1	15.7 ± 0.1 <sup>ab</sup>
	CaW5	17.1 ± 0.4 <sup>ab</sup>
KS 10	Without wax	86.1 ± 0.8 <sup>a</sup>
	BW1	76.6 ± 4.8 <sup>b</sup>
	CW1	47.3 ± 1.7 <sup>c</sup>
	CaW1	83.3 ± 0.8 <sup>ab</sup>

#### IV.7.5 Antimicrobial activity of sheets

The antimicrobial activity of different biopolymeric blends as function of wax and KS concentration against *Escherichia coli* ATCC 10536 at 15°C were assayed by the disc diffusion method and is presented in *Figure IV-6* and *Figure IV-7*.



*Figure IV-6* : Inhibition zone diameters of sheets with 0, 2 or 10% KS and different waxes (Beeswax, candelilla wax or Carnauba wax) against *Escherichia coli* ATCC10536 after 6 days of incubation at 15°C.

Control sheet without wax and sorbate showed inhibitory effect due to the presence of acetic acid added at 2.3% w/w casein to help sheet processability as amphiphilic substance. *E. coli* strain is sensitive to organic acid at 15°C and inhibition diameters are between 20 and 60 mm for all formulations. All formulations containing organic acids (acetic acid and potassium sorbate) revealed an antimicrobial effect, which demonstrated that organic acids remained chemically active in the sheet after extrusion process and thermo-mechanical treatment applied. Furthermore, sheets containing 2% and 10% of KS are 5 to 10 times less concentrated than the MIC determined at 5 g/L (data not shown at 15°C of incubation temperature). Even at low concentration, casein based sheets as carrier of KS seems to efficiently inhibit growth of *E. coli* after 6 days at 15°C. Other studies reported higher amount of KS to inhibit *E. coli* strains as Shen et al. where 15% of KS was necessary in potato starch sheets or Pranoto et al. where 20% KS in chitosan sheets was not sufficient to inhibit *E. coli* (at 30°C and 37°C for 24 h of incubation respectively) (Pranoto et al., 2005; Shen et al., 2010). As expected, inhibition zone diameter increased when KS concentration increased. However, inhibition zone diameters didn't increase linearly according to KS content. Sheets with 10% KS didn't get inhibition diameter 5 times larger than 2% KS sheets. According to Pranoto et al. that made similar observation, lack of inhibition improvement with higher KS content could be due to chemical interactions between

protein amino groups and carboxyl groups of KS, decreasing sorbate release into the medium (Pranoto et al., 2005).

Potential soluble matter not released (*Table IV-4*) and total amount release of KS (*Table IV-5*) described above support this hypothesis, where KS remains immobilized in the casein matrix, since part of KS is not released in water and especially for 10% KS sheets. Interactions between casein and KS could also be evidenced by change observed in sheet mechanical properties. Diffusivity of KS was proved by Ozdemir et al. to decrease with higher protein or beeswax content, which shows the importance of interactions that could happen between KS and matrix (casein and waxes in this study) for antimicrobial efficiency comprehension (Ozdemir & Floros, 2003).

Waxes added to formulations allow at least similar or better antimicrobial response. Without KS, waxes revealed an increased inhibition diameter that could be due to antimicrobial properties of waxes. According to several authors, beeswax particularly and other waxes as citrus wax and jojoba liquid wax revealed antimicrobial properties against Gram+ and Gram- bacteria (Fratini, Cilia, Turchi, & Felicioli, 2016; Guirguis, Abd Elkader, & Nasrat, 2013; Johann et al., 2007; Kacániová et al., 2012). Unfortunately, few studies have been made on candelilla and carnauba wax as antimicrobial agent to compare results of this work.

In combination with KS, waxes didn't modify inhibition of *E. coli* except for beeswax with 2% KS. Beeswax containing materials have the highest rate of swelling among other wax materials and might improve potassium sorbate release over time. Arcan et al. showed a relationship between melting point of waxes and release rate of lysozyme from zein/wax materials, where low melting point wax allowed greater release rate of lysozyme (Arcan & Yemenicioğlu, 2013). In the present study, KS is also more efficient on bacteria with low melting point waxes (Beeswax<Candelilla<Carnauba). Moreover, sheets with 2% KS and beeswax are almost as efficient as sheets with 10% KS, which lead to assumed that KS concentration could be reduced thanks to wax incorporation. This result is very interesting for food industries where antimicrobial agent reduction is of great interest these last years.

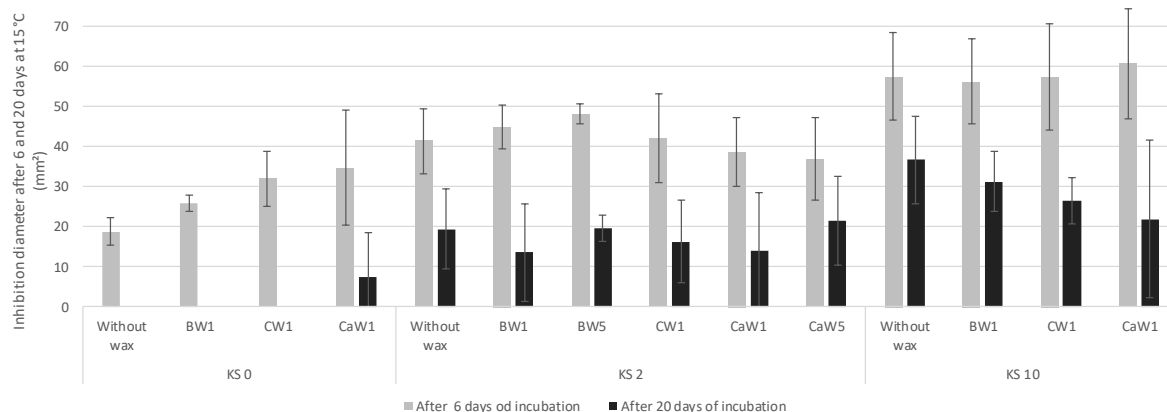


Figure IV-7 : Inhibition zone diameters of sheets with 0, 2 or 10% KS and different waxes (Beeswax, candelilla wax or Carnauba wax) against *Escherichia coli* ATCC10536 follow-up after 6 days and 20 days of incubation at 15°C.

Antimicrobial activity was followed until 20 days at 15°C for each sheet (Figure IV-7). Carnauba wax on casein based carrier material kept an antimicrobial activity after 20 days, which was not expected. Potassium sorbate act as a good bacteriostatic agent at concentrations tested. Increase in KS concentration allowed a better stability of inhibition diameters. Materials containing waxes have lower inhibition diameter than controls. It could be assumed that extrusion process allowed efficient mixing and homogenization of casein/wax material, which improved wax particle dispersion (as previously described by SEM pictures analysis) but didn't increase hydrophobicity of sheets especially when sheets are in contact with aqueous medium for a long period. Besides, waxes were proved to immobilize KS and to slow down its release, that might explain the lower inhibition zone diameter observed at 20 days of incubation.

According to data obtained, these sheets could be used as active packaging for potential food application to prevent microbial growth and to extend shelf life.

## IV.8 Conclusion

This work demonstrates the potential of extrusion process for production of protein/wax sheets. Casein is a good matrix for waxes incorporation and a coherent and homogeneous material could be produced at 1% of wax addition. A wide range of properties (mechanical properties, water barrier and swelling behaviour) can be obtained through wax and KS incorporation. Sheets with 5% wax concentration were produced with no color difference compare to control sheet, which is interesting for commercial applications. Wax origin and concentration modify the sheet structure by increasing the porosity. Potassium sorbate at quite low concentration (5-10-fold lower than the MIC) provide a good antimicrobial activity against *Escherichia coli* and remains chemically active after thermo-mechanical treatment applied during extrusion. KS used at 10% revealed a plasticizer effect on sheets. This study suggest that interactions could occur between casein, waxes and KS, which induces water sensitivity properties modification and immobilization of KS molecules. KS was proved to be a good bacteriostatic agent that could inhibit *E. coli* at least 20 days. Incorporation of waxes improved KS efficiency at low concentration and this might help industrials reducing preservative amount in food or food packaging.

Data presented in this work provide a first attempt to understand interactions between protein network, hydrophilic substances and organic acid as preservative for the development of active edible packaging. Further studies will be needed to assess the extensive potential of wax addition in protein sheet to release antimicrobial agents or any other active molecules through industrial process as extrusion process.

## IV.9 Acknowledgements

Funding: This work was supported by Region Rhône-Alpes (under ARC Environnement project), Conseil Départemental de l'Ain and Bourg en Bresse Agglomération.

## IV.10 Etude complémentaire

Pour compléter cette étude, le matériau à base de caséine présure et de différentes cires a été testé sur de la flore issue de croûte de Comté de 2 et 6 mois d'âge d'affinage afin de mimer la réaction de la flore fromagère sur un temps plus court *in vitro*. Les codes utilisés pour les formulations dans l'article ont été repris dans cette étude avec l'ajout du matériel industriel (présenté dans le chapitre III) actuellement déposé sur les fromages comme témoin supplémentaire. Des prélèvements de croûtes de Comté issues de la fromagerie présentée dans le précédent chapitre ont été effectués. La croûte a ensuite été « grattée » en surface (environ 2 cm<sup>2</sup>) afin de récolter la flore présente. Après dilution, la solution de croûte a été diluée puisensemencée dans des boîtes de Petri contenant le milieu CRBM (Cheese Ripening Bacteria Media). Les différents matériaux sont ensuite déposés en triplicat sur les boîtes de Petri précédemmentensemencées. Après 7 jours d'incubation à 15°C, la charge microbienne contenue dans les boîtes de Petri en présence des différents matériaux a été analysée. La charge microbienne est déterminée par analyse des images scannées des boîtes de Petri par le logiciel ImageJ en considérant l'aire de la boîte recouverte par la flore en pourcentage par rapport à l'aire totale de la boîte.

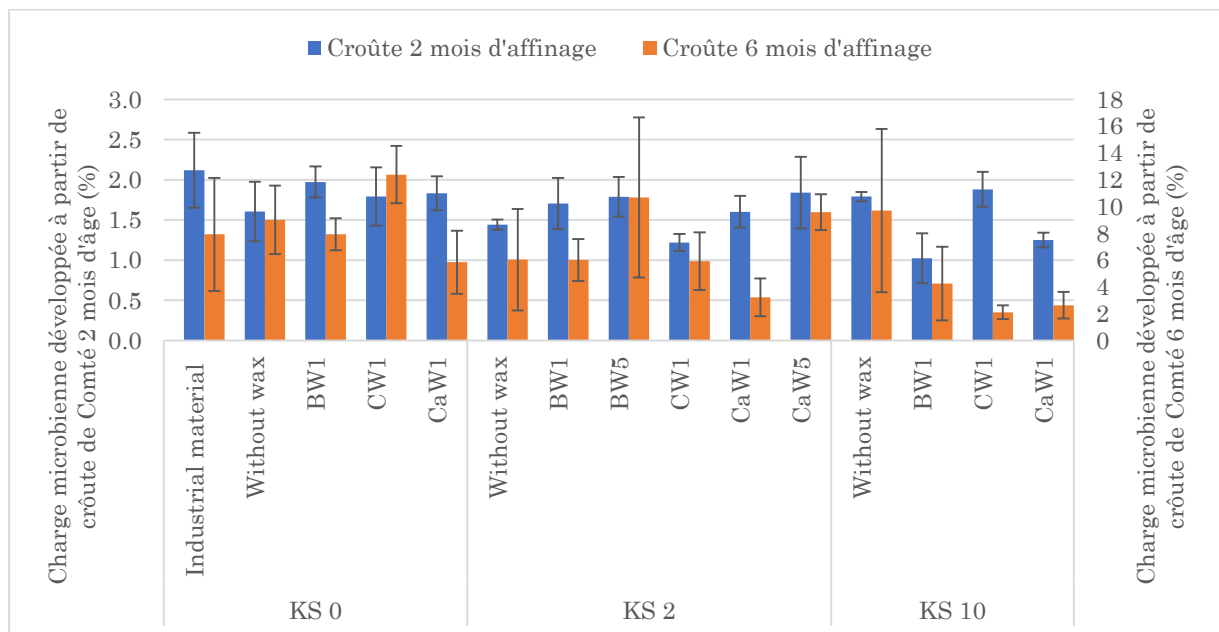


Figure IV-8 : Charge microbienne développée à partir de prélèvements de croûtes de 2 mois et 6 mois d'affinage en fonction de la présence de différentes formulations de matériaux contenant des cires et du sorbate de potassium (n=3)

La Figure IV-8 présente les résultats d'analyse d'image obtenus après 7 jours d'incubation à 15°C. On peut remarquer une tendance du sorbate de potassium à inhiber le développement de la flore. Les prélèvements de croûtes sont issus de fromages différents et à un stade d'affinage différent impliquant par conséquent une flore particulière dans chaque cas, ce qui explique la dissimilarité dans les réponses observées. Le développement de la flore de la croûte 6 mois d'âge semble être inhibé par les formulations contenant 10% de sorbate de potassium et des cires à raison de 1%. En effet, en présence de cire, les formulations à 10% de sorbate permettent de diminuer de moitié la charge microbienne observée. On peut supposer qu'à 1% d'incorporation, la cire permet un relargage du sorbate suffisant et de manière progressive (en comparaison avec le témoin sans cire), ce qui diminue le développement de la flore fromagère.

Il semblerait également que l'ajout de cires à une concentration plus élevée dans le matériau (5%) favorise le développement de microorganismes. Les formulations contenant 5% de cire d'abeille et 5% de cire de carnauba favorisent la croissance de la flore (charge 2 à 3 fois plus élevée) que lorsque 1% de cire seulement est ajouté. L'article précédemment décrit a montré que les mélanges de polymères contenant 5% de cires ont la particularité d'être moins perméables à la vapeur d'eau et d'avoir une teneur en eau plus faible qui pourrait induire le développement d'une flore différente induisant un recouvrement du milieu plus important.

Aucun de ces deux effets n'avait été observé sur *Escherichia coli*. La cire ajoutée avec 10% de sorbate ne permettait pas d'améliorer l'inhibition contre *E. coli* et au contraire, l'ajout de 5% de cire en présence de 2% de sorbate renforçait l'inhibition notamment sur 20 jours.

Il s'agit ici d'une étude préliminaire sur une flore complexe (celle du Comté) qui évolue au cours de l'affinage avec une succession levures (*Candida*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*) puis bactéries (notamment bactéries corynéformes et *Micrococcaceae*). Cependant, les résultats laissent présager une interaction intéressante entre la cire et le sorbate incorporés au réseau protéique dans un mélange de polymères. Le développement d'un plan d'expérience pourrait, par exemple, permettre une analyse plus poussée de ces interactions avant un essai *in situ* sur des fromages.

## IV.11 Conclusions générales et perspectives – Chapitre IV

Ce travail a démontré la faisabilité de la production d'un matériau à base d'un mélange de caséine présure et de cires (jusqu'à 5% m/m de caséine pour la cire d'abeille et de carnauba et jusqu'à 1% pour la cire de candelilla) par extrusion bivis avec un débit de poudre de 2 kg/h. L'incorporation des trois ingrédients du mélange (caséine présure, cires et sorbate de potassium) permet d'obtenir un large éventail de propriétés à la fois mécaniques et de barrière à l'eau par exemple tout en satisfaisant les caractéristiques nécessaires de transparence pour être utilisés comme emballages alimentaires.

Plus spécifiquement, l'ajout de cire influence la structure du matériau, la cire extrudée se retrouve totalement sous forme d'une phase dispersée équitablement dans la matrice. L'origine de la cire quant à elle va affecter le facteur de forme de la phase dispersée, ce qui a une influence sur la perméabilité à la vapeur d'eau et les propriétés mécaniques. Ainsi, l'ajout de cire d'abeille permet de diminuer d'au moins 20% la perméabilité à la vapeur d'eau des films probablement en augmentant la longueur du chemin tortueux qu'empruntent les molécules d'eau. La cire d'abeille se démarque des autres cires avec un allongement à la rupture plus important et une contrainte maximale plus faible pour le matériau à base de cire d'abeille. Les propriétés particulières apportées par l'incorporation de cire d'abeille peuvent être expliquées par la structure et les caractéristiques définissant cette cire. En effet, certains auteurs font l'hypothèse que la quantité d'acides gras libres présent dans la cire d'abeille est responsable de la viscosité particulière de celle-ci. L'effet plastifiant de la cire d'abeille peut quant à lui être expliqué par sa température de fusion plus faible que celle des autres cires.

Le sorbate de potassium ajouté au matériau afin d'obtenir un mélange actif s'est révélé affecter d'autres propriétés que la réponse antimicrobienne. Le sorbate est efficace à des faibles concentrations (5 à 25 fois plus faible que la concentration minimale inhibitrice) contre *Escherichia coli* ATCC 10536 et permet un effet bactériostatique pendant 20 jours. La présence d'une teneur en sorbate de 10% affecte les propriétés mécaniques du matériau, le sorbate agit comme un plastifiant et augmente l'allongement à la rupture par exemple.



Les interactions entre les cires et le sorbate de potassium sont encore à approfondir mais, cette étude a permis de démontrer un effet synergique antimicrobien (1% de cire et 2% de sorbate) qui est économiquement et socialement intéressant pour la réduction des conservateurs en agroalimentaire. Un effet similaire de synergie a pu être observé en présence de flore fromagère mais seulement pour 10% de sorbate. Le développement d'une étude plus large sur plus de microorganismes pourrait apporter des réponses supplémentaires concernant les relations entre la composition du matériau et son action antimicrobienne.

## IV.12 Références

- Aliheidari, N., Fazaeli, M., Ahmadi, R., Ghasemlou, M., & Emam-Djomeh, Z. (2013). Comparative evaluation on fatty acid and *Matricaria recutita* essential oil incorporated into casein-based film. *International Journal of Biological Macromolecules*, *56*, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.02.007>
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *3*(2), 113–126. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7)
- Arcan, I., & Yemenicioğlu, A. (2013). Development of flexible zein–wax composite and zein–fatty acid blend films for controlled release of lysozyme. *Food Research International*, *51*(1), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.011>
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., López, J., Garrigós, M. del C., Valente, A. J. M., & Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, *121*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.015>
- Atarés, 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*(4), 678–687. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.05.018>
- Audic, J.-L., & Chaufer, B. (2005). Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, *41*(8), 1934–1942. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.023>
- Avena-Bustillos, R. J., & Krochta, J. M. (1993). Water Vapor Permeability of Caseinate-Based Edible Films as Affected by pH, Calcium Crosslinking and Lipid Content. *Journal of Food Science*, *58*(4), 904–907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09388.x>
- Basiak, E., Galus, S., & Lenart, A. (2015). Characterisation of composite edible films based on wheat starch and whey-protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(2), 372–380. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12628>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.019>
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. t. (2001). Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal of Food Science*, *66*(6), 865–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15188.x>

- Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223–237.  
<https://doi.org/10.1080/10408690490464276>
- Chick, J., & Hernandez, R. j. (2002). Physical, Thermal, and Barrier Characterization of Casein-Wax-Based Edible Films. *Journal of Food Science*, 67(3), 1073–1079.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09455.x>
- Chowdhury, T. (2013). Effect of antimicrobial on mechanical, barrier and optical properties of corn starch based self-supporting edible film. *International Journal of Food Studies*, 2(2), 212–223. <https://doi.org/10.7455/ijfs/2.2.2013.a7>
- Colak, B. Y., Gouanve, F., Degraeve, P., Espuche, E., & Prochazka, F. (2015). Study of the influences of film processing conditions and glycerol amount on the water sorption and gas barrier properties of novel sodium caseinate films. *Journal of Membrane Science*, 478, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.12.027>
- Colak, B. Y., Peynichou, P., Galland, S., Oulahal, N., Prochazka, F., & Degraeve, P. (2016). Antimicrobial Activity of Nisin and Natamycin Incorporated Sodium Caseinate Extrusion-Blown Films: A Comparative Study with Heat-Pressed/Solution Cast Films. *Journal of Food Science*, 81(5), E1141-1150. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13284>
- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283–288.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.016>
- Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 393–400.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.022>
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.024>
- Fennema, O., Donhowe, I. G., & Kester, J. J. (1994). Lipid type and location of the relative humidity gradient influence on the barrier properties of lipids to water vapor. *Journal of Food Engineering*, 22(1), 225–239. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)90032-9)

- Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., & Felicioli, A. (2016). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *9*(9), 839–843. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.003>
- Gennadios, A. (2002). *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press.
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J., & Guilbert, S. (1994). Edible Composite Films of Wheat Gluten and Lipids - Water-Vapor Permeability and Other Physical-Properties. *International Journal of Food Science and Technology*, *29*(1), 39–50.
- Guirguis, O. W., Abd Elkader, M. F. H., & Nasrat, A. A. (2013). Enhancing antimicrobial activity for chitosan by adding Jojoba liquid wax. *Materials Letters*, *93*, 353–355. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.11.096>
- Haq, M. A., Hasnain, A., Jafri, F. A., Akbar, M. F., & Khan, A. (2016). Characterization of edible gum cordia film: Effects of beeswax. *LWT - Food Science and Technology*, *68*, 674–680. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.011>
- Jager, M., & DE. (2003, July 15). 6592880. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect2=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/search-bool.html&r=1&f=G&l=50&d=PALL&RefSrch=yes&Query=PN/6592880>
- Janjarasskul, T., Rauch, D. J., McCarthy, K. L., & Krochta, J. M. (2014). Barrier and tensile properties of whey protein–candelilla wax film/sheet. *LWT - Food Science and Technology*, *56*(2), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.034>
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antioxidant capacity of starch–sodium caseinate films containing lipids. *Journal of Food Engineering*, *116*(3), 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.010>
- Johann, S., Oliveira, V. L. de, Pizzolatti, M. G., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Branco, A., & Smânia Jr, A. (2007). Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *102*(6), 681–685. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000087>
- Juvonen, H., Smolander, M., Boer, H., Pere, J., Buchert, J., & Peltonen, J. (2011). Film formation and surface properties of enzymatically crosslinked casein films. *Journal of Applied Polymer Science*, *119*(4), 2205–2213. <https://doi.org/10.1002/app.32943>
- Kacániová, M., Vuković, N., Chlebo, R., Haščík, P., Rovná, K., Cubon, J., ... Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Sciences*, *64*(3), 927–934.
- Kester, J. J., & Fennema, O. (1989). An Edible Film of Lipids and Cellulose Ethers: Barrier Properties to Moisture Vapor Transmission and Structural Evaluation. *Journal of Food Science*, *54*(6), 1383–1389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05118.x>

- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 239–251. <https://doi.org/10.1080/10408690490464906>
- Kowalczyk, D., Kordowska-Wiater, M., Solowiej, B., & Baraniak, B. (2015). Physicochemical and Antimicrobial Properties of Biopolymer-Candelilla Wax Emulsion Films Containing Potassium Sorbate - A Comparative Study. *Food and Bioprocess Technology*, 8(3), 567–579. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1423-6>
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.003>
- Krochta, J. (2002). Proteins as Raw Materials for Films and Coatings. In *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420031980.ch1>
- Lacroix, M., Jobin, M., Mezgheni, E., Srour, M., & Boileau, S. (1998). Polymerization of calcium caseinates solutions induced by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 52(1–6), 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0969-806X\(98\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0969-806X(98)00144-3)
- Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., Nobile, D., & Alessandro, M. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in food science & technology*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400094768>
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2005). Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background. *Food Quality and Preference*, 16(5), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.09.003>
- Muscat, D., Adhikari, R., McKnight, S., Guo, Q., & Adhikari, B. (2013). The physicochemical characteristics and hydrophobicity of high amylose starch–glycerol films in the presence of three natural waxes. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.033>
- Ofman, M. H., Campos, C. A., & Gerschenson, L. N. (2004). Effect of preservatives on the functional properties of tapioca starch: analysis of interactions. *LWT - Food Science and Technology*, 37(3), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.010>
- Ouattara, B., Simard, R. e., Piette, G., Bégin, A., & Holley, R. a. (2000). Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan-based Antimicrobial Packaging Films. *Journal of Food Science*, 65(5), 768–773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13584.x>

- Ozdemir, M., & Floros, J. d. (2003). Film Composition Effects on Diffusion of Potassium Sorbate Through Whey Protein Films. *Journal of Food Science*, 68(2), 511–516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05703.x>
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *ResearchGate*, 38(8), 859–865. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.09.014>
- Rauch, D. J. (2008). *Screw speed, feed rate, and composition effects on extruder operating conditions and extruded whey protein sheet properties*. Master's thesis, University of California, Davis, USA.
- Rodrigues, D. C., Caceres, C. A., Ribeiro, H. L., de Abreu, R. F. A., Cunha, A. P., & Azeredo, H. M. C. (2014). Influence of cassava starch and carnauba wax on physical properties of cashew tree gum-based films. *Food Hydrocolloids*, 38, 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.010>
- Schmidt, R., & DE. (2002, December 17). 6495718.
- Shellhammer, T. H., & Krochta, J. M. (1997). Whey Protein Emulsion Film Performance as Affected by Lipid Type and Amount. *Journal of Food Science*, 62(2), 390–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04008.x>
- Shen, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.003>
- Shih, F. F., Daigle, K. W., & Champagne, E. T. (2011). Effect of rice wax on water vapour permeability and sorption properties of edible pullulan films. *Food Chemistry*, 127(1), 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.096>
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 423–432. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3)
- Stinco, C., Fernández-Vázquez, R., Meléndez-Martínez, A., Heredia, F., Mejías, E., & Vicario, I. (2012). Influence of Different Backgrounds on the Instrumental Color Specification of Orange Juices. In J. Caivano & M. del Pilar, *Color in Food* (pp. 143–152). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11878-18>
- Talens, P., & Krochta, J. M. (2005). Plasticizing Effects of Beeswax and Carnauba Wax on Tensile and Water Vapor Permeability Properties of Whey Protein Films. *Journal of Food Science*, 70(3), E239–E243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07141.x>

- Türe, H., Gällstedt, M., & Hedenqvist, M. S. (2012). Antimicrobial compression-moulded wheat gluten films containing potassium sorbate. *Food Research International*, 45(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.012>
- Türe, H., Gällstedt, M., Kuktaite, R., Johansson, E., & Hedenqvist, M. S. (2011). Protein network structure and properties of wheat gluten extrudates using a novel solvent-free approach with urea as a combined denaturant and plasticiser. *Soft Matter*, 7(19), 9416–9423. <https://doi.org/10.1039/C1SM05830D>
- Vachon, C., Yu, H. L., Yefsah, R., Alain, R., St-Gelais, D., & Lacroix, M. (2000). Mechanical and structural properties of milk protein edible films cross-linked by heating and gamma-irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3202–3209. <https://doi.org/10.1021/jf991055r>
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., del Río, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2008). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by Hydroxypropyl Methylcellulose–Lipid Edible Composite Films Containing Food Additives with Antifungal Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11270–11278. <https://doi.org/10.1021/jf802384m>

## Conclusion générale

Dans un contexte de développement durable et de sécurité alimentaire, l'objectif de ce travail était le développement d'un matériau antimicrobien par une technique de production facilement industrialisable. Dans ce projet, différentes exigences ont été imposées : l'utilisation de certaines matières premières telles que la caséine afin de répondre aux prérequis réglementaires concernant la traçabilité des fromages AOP (étiquettes en caséine) et les acides organiques pour répondre à la demande des industriels du secteur fromager. Dans un cadre plus général, l'ensemble du secteur alimentaire très consommateur d'emballages pétrosourcés cherche à faire face aux changements d'habitudes de consommation et aux préoccupations concernant la sécurité alimentaire. En effet, les crises sanitaires récentes, l'attrait du « clean label » et des consommateurs toujours plus demandeurs d'éco-solutions ouvrent un marché pour des matériaux innovants en redéfinissant parfois les critères et la définition des emballages. Biodégradabilité, comestibilité, capacité de conservation et production à grande échelle ont été les moteurs de ce projet à chaque étape de la réflexion concernant le développement, la compréhension et l'optimisation des matériaux.

La caséine en bonne place en tant que matière première à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle pour la fabrication de matériaux (Galalithe) a été délaissée dès l'arrivée des matières synthétiques issues de la pétrochimie au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle. Comme pour d'autres ressources naturelles, la caséine ou plus précisément les caséinates ont été de nouveau étudiés depuis quelques décennies pour répondre aux attentes des utilisateurs et consommateurs vers des matières plus respectueuses de l'environnement. Cependant, à l'heure actuelle très peu de matériaux biodégradables, issus totalement d'une ressource renouvelable sont commercialisés. Un des principaux freins à la fabrication et à la commercialisation de ces biomatériaux (après le prix élevé de la matière première), provient de la technologie couramment utilisée pour la transformation (voie humide ou solvant). Dans ce travail, l'un des enjeux, majeur et novateur, a été l'application de la technologie d'extrusion (actuellement utilisée pour la production des matériaux synthétiques) à une échelle semi-industrielle sur toutes les formulations développées.



Le procédé d'extrusion des caséinates a été développé dans un brevet [1] puis approfondi lors de deux thèses [2], [3]. Cependant, les caséinates, forme neutralisée de la caséine acide, sont hydrosolubles et ne correspondent pas à l'application d'emballage alimentaire ou d'étiquetage de fromages recherchée. Dans un premier temps, il a donc fallu développer un matériau à base de caséine insoluble dans l'eau afin de pouvoir l'appliquer sur des denrées alimentaires humides (ex : fromages).

Deux caséines commercialisées sont insolubles : la caséine acide et la caséine présure. Ces deux caséines ont des caractéristiques physico-chimiques différentes entre elles et différentes des caséinates. La première étape engagée dans ce travail a été la fabrication de matériaux issus de 3 caséines (caséine acide, caséine présure et caséinate de sodium) et de caractériser ces matériaux. L'optimisation du procédé d'extrusion a permis de transformer des caséines insolubles dans l'eau et des caséinates à des températures relativement basses (<75°C) apportant ainsi un attrait economico-environnemental supplémentaire. Extraite du lait, la caséine possède une structure et des caractéristiques qui dépendront de la méthode d'extraction utilisée (coagulation acide ou enzymatique) et des traitements qui lui seront appliqués (neutralisation dans un bain d'hydroxyde). Ces caractéristiques propres à la matière première ont pu être reliées aux propriétés observées chez les matériaux extrudés à partir de ces caséines. Les caséines « acide » et « présure » malgré leur insolubilité dans l'eau ont des réponses différentes face aux molécules d'eau. En effet, la caséine présure ayant conservé son calcium colloïdal (contrairement à la caséine acide) se lie plus facilement aux molécules d'eau et rend le matériau très sensible à l'humidité (teneur en eau et un gonflement supérieurs). Par contre, l'analyse de la sensibilité à l'eau en surface par la méthode des angles de contact, laisse supposer un lien étroit entre la présence ou non de la partie glycoprotéique de la caséine  $\kappa$  et l'hydrophobicité de surface. La caséine présure ayant perdu l'extrémité de la caséine  $\kappa$  après coagulation ne possède plus son caractère hydrophile qui est d'ailleurs à la base de la stabilisation des micelles du lait.

Le glycérol qui s'est révélé être un plastifiant adapté pour ces films (en comparaison avec d'autres essais non développés dans ce manuscrit). Par sa nature hygroscopique, le glycérol a tendance à augmenter l'attraction des molécules d'eau et par conséquent le caractère hydro-sensible du matériau. A partir d'un mélange à première vue simple composé d'une ressource naturelle (la caséine), d'un plastifiant (le glycérol) et d'eau (par ajout ou dans l'environnement), une large gamme de propriétés a pu être observée.

L'amélioration de la traçabilité en fromagerie est l'une des applications qui a été envisagée dans les autres chapitres avec le développement d'un matériau comestible et antimicrobien. Allonger la durée de conservation des denrées, diminuer l'incorporation de conservateurs dans les aliments et répondre à la demande de produits prêts à l'emploi, tels sont les enjeux actuels autour de films et d'enrobages comestibles antimicrobiens. Dans la seconde partie de cette étude, la famille des acides organiques et notamment le benzoate de sodium, le sorbate de potassium et le propionate de calcium, couramment utilisés comme conservateurs en agroalimentaire, ont été étudiés pour leur capacité antimicrobienne sur une souche modèle d'*Escherichia coli*. Un plan d'expérience a notamment permis d'établir les concentrations minimales inhibitrices de ces trois acides organiques sous des conditions de culture d'*E. coli* mimant les caves d'affinage de fromages (soit une forte humidité créée par une chambre humide dans les essais de matériaux sur agar et une température d'incubation de 15°C). Le sorbate et le benzoate ont montré des capacités inhibitrices contre *E. coli* supérieures au propionate ; CMI de 5 g/L pour le sorbate et le benzoate contre plus de 20 g/L pour le propionate. La mise en place du plan d'expérience a également permis de voir que sous les conditions d'essai imposées, aucun effet synergique antimicrobien n'apparaît lors de l'emploi d'une combinaison de ces agents antimicrobiens. Après cette étude théorique des agents actifs et de leurs actions sur *Escherichia coli*, ces derniers ont été incorporés à un film extrudé de caséine présure. Le choix de la caséine présure pour la production de matériau n'est pas anodin puisque cette caséine s'est révélée précédemment adéquate pour la production d'un matériau insoluble (dépôt sur denrée humide) et sensible à l'humidité (tenue du matériau sur la denrée et relargage des molécules actives par gonflement induit par l'eau). Le matériau incorporant des acides organiques montre des capacités inhibitrices d'*Escherichia coli* à des concentrations jusqu'à 25 fois inférieures à la CMI déterminée dans le plan d'expérience. Les contraintes thermomécaniques appliquées en extrusion ne semblent pas avoir affecté l'activité antimicrobienne des sels d'acides organiques et l'incorporation de ces composés dans la matrice protéique semble apporter une protection supplémentaire contre le microorganisme testé. Ce résultat montrant l'importance du choix de la matrice est très intéressant d'un point de vue industriel pour la diminution de l'utilisation de conservateurs dans les aliments.

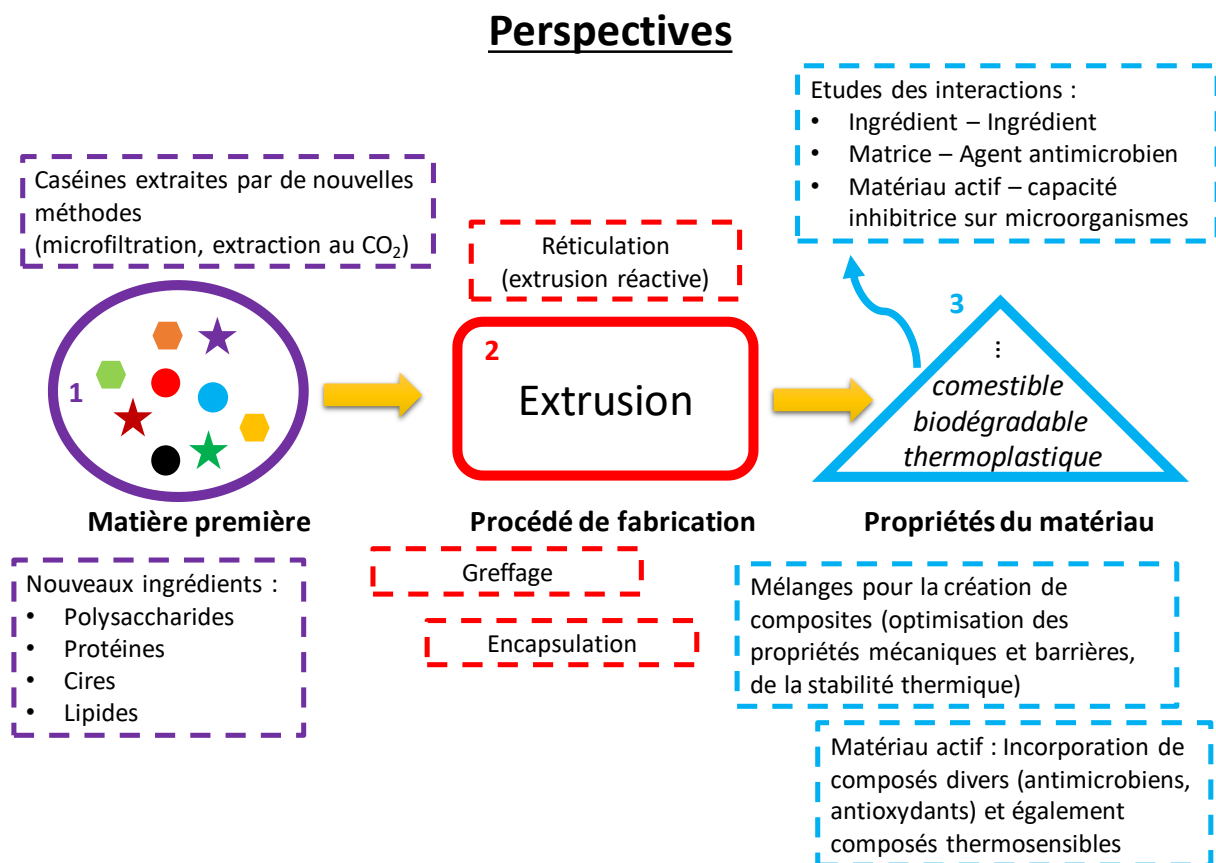
Deux essais *in situ* de dépôt de différentes formulations d'étiquettes bio-résistantes contenant des acides organiques ont été menés sur des fromages de Comté. Malgré un recouvrement rapide des étiquettes par la flore de la croûte de Comté après 1 mois d'affinage en cave, les observations de l'évolution des étiquettes et l'analyse de la flore les recouvrant ont permis de constater une amélioration de la préservation pour certaines formulations dont notamment celles contenant du sorbate de potassium et du benzoate de sodium.

Lors de la production d'un fromage de Comté, après caillage du lait et dépôt des étiquettes de traçabilité en caséine, le fromage est pressé pendant 24h, ce qui engendre un flux sortant de lactosérum à travers le moule et surtout, à travers les étiquettes en caséine. Or, le relargage des acides organiques se fait dans les matrices hydrocolloïdes par un gonflement induit par l'eau. Afin de réduire l'impact du gonflement et de la sensibilité à l'eau, le développement d'un matériau composite incorporant des composés hydrophobes tels que des cires a été envisagé. Le procédé d'extrusion a ainsi permis la transformation d'un mélange de caséine présure et de cires, avec une incorporation jusqu'à 5% (m/m de caséine) pour la cire d'abeille et pour la cire de carnauba et jusqu'à 1% pour la cire de candelilla. L'origine de la cire apporte des propriétés originales à chaque composition dont notamment la cire d'abeille qui diminue la perméabilité à l'eau des films d'au moins 20%. Avec une température de fusion basse et une quantité d'acides gras libres importante, la cire d'abeille agit également comme plastifiant du matériau. En présence de sorbate de potassium (agent antimicrobien) dans les formulations, des synergies entre cires et sorbate semblent améliorer l'inhibition d'*Escherichia coli* (1% de cire et 2% de sorbate) et l'inhibition de la flore issue de la croûte de Comté (1% de cire et 10% de sorbate).

Dans ce travail, de nombreux matériaux ont été envisagés, beaucoup ont donné lieu à des essais, certains sont développés dans ce manuscrit. Ces essais montrent des propriétés différentes à la fois mécaniques et de sensibilité aux molécules d'eau ; ces matériaux ne demandent qu'à trouver une application appropriée. D'un matériau hydrosoluble à insoluble en passant par des matériaux aux propriétés « barrière » et « antimicrobiennes » différentes, l'éventail des opportunités de commercialisation en emballage alimentaire ou en étiquetage est vaste.

## Perspectives

Le travail présenté ici permet d'avoir un aperçu des possibilités de transformation d'une matière première renouvelable par extrusion bivis. Cette technologie permet une industrialisation facilitée de la production cependant, des démarches supplémentaires de compréhension et de tests seront nécessaires au développement appliqué de ces matériaux. En effet, plusieurs pistes de recherches ont été envisagées en complément de cette étude et sont présentées dans le schéma suivant :



*Schéma récapitulatif des perspectives envisageables à la suite de ce travail de thèse*

A partir du schéma récapitulatif ci-dessus, on peut voir qu'il existe différents points d'entrée possibles à la poursuite de ce travail de thèse. En effet, dans les paragraphes suivants sont développées des pistes de travail (1) concernant la diversité de la matière première (caséine et autres ingrédients) puis (2) concernant des modifications applicables lors du procédé de fabrication et enfin (3) à propos des propriétés finales du matériau.

1. De nouvelles caséines apparaissent sur le marché grâce à la tendance actuelle pour les régimes hyperprotéinés pour sportifs. De nouvelles techniques d'extraction de

la caséine comme la microfiltration ont été développées à une échelle industrielle afin de fournir une protéine conservant au maximum ses qualités nutritives dont notamment les minéraux pour les régimes pour sportifs. Cette technique d'extraction permet d'obtenir une caséine dite micellaire avec une structure et des caractéristiques différentes de celles étudiées dans le Chapitre II puisque cette caséine au niveau de sa structure conserve à la fois la totalité de la caséine  $\kappa$  et également les minéraux. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer le potentiel de toutes les caséines présentes sur le marché (en fonction de la méthode d'extraction) en tant que matière première sur la base d'un matériau plastifié.

La caséine ayant pu être transformée en extrusion avec un profil de vis, un profil de température et un savoir-faire particulier, permet de concevoir la possibilité de transformation par extrusion d'autres protéines ou d'autres hydrocolloïdes et ressources naturelles jusqu'alors transformés par voie solvant pour la formation de films et enrobages. A ce jour, aucun matériau plastique à base de protéines ou de polysaccharides n'est commercialisé mais les recherches scientifiques s'orientent clairement vers le procédé d'extrusion pour permettre une industrialisation facilitée. Ainsi, différents amidons, la zéine, les protéines de tournesol, les protéines de lactosérum, les caséinates, le gluten de blé, la kératine et les protéines de soja ont déjà pu être fabriqués à l'échelle du laboratoire ou pilote par extrusion. De nombreuses autres matières premières disponibles telles que les protéines de pois, les protéines de pomme de terre ou encore les farines de gluten de maïs restent à étudier afin de compléter les connaissances actuelles concernant la processabilité des matières d'origines biosourcées.

2. Le procédé d'extrusion baxis en lui-même face à des matières biosourcées restent peu compris. En effet, il peut modifier les propriétés d'une formulation comme démontré par Janjarasskul et al. [4]. Par conséquent, des formulations testées jusqu'alors par voie humide (voie solvant) doivent être testées et optimisées pour le procédé d'extrusion. Afin de renforcer les propriétés barrières et mécaniques des biomatériaux, des auteurs ont montré qu'il était possible de réticuler l'amidon plastifié avec de l'acide citrique [5]. Ces auteurs ont ainsi réalisé l'extrusion réactive d'amidon de maïs réticulé, par contre le même procédé n'a pas été possible pour un mélange amidon/pectine, ce qui démontre l'importance du choix et de l'étude de la matière première.

Il pourrait être intéressant d'étudier également l'encapsulation ou bien le greffage des molécules actives afin de garder une protection de l'étiquette à plus long terme lors de l'affinage. Dans l'exemple du Comté, la flore évolue au cours de l'affinage et il a été constaté une succession levures/bactéries au court du temps. Il semblerait que le ralentissement dans la croissance des levures après 30 jours d'affinage soit lié aux salages et frotages répétés de la croûte et aux conditions à la surface du fromage (dont notamment le pH) [6]. Ce changement de conditions pourrait devenir un élément déclencheur des molécules actives pour une meilleure protection des étiquettes. Boyaci et al. ont d'ailleurs récemment développé un film antimicrobien à base de protéines de lactosérum et de lysozyme avec un mécanisme de relargage déclenché par une acidification du pH [7].

3. Afin de créer un matériau de remplacement pour les matériaux synthétiques actuels issus de la pétrochimie, les nouveaux matériaux d'origine biosourcée doivent se rapprocher des caractéristiques de ces-derniers. En complexifiant les mélanges de polymères et en créant de nouveaux mélanges biosourcés avec des propriétés supplémentaires que chaque ingrédient seul ne possède pas. Depuis quelques années, les recherches scientifiques sur les biopolymères produits par extrusion s'orientent d'ailleurs préférentiellement vers des mélanges de biopolymères afin d'améliorer les propriétés barrières et mécaniques, la sensibilité à l'eau et la stabilité thermique :

<b>Matrice</b>	<b>Référence</b>
Isolat de protéines de lactosérum dans une matrice d'amidon thermoplastique	Azevedo et al., 2017 [8]
Amidon de manioc/gélatine	Thumthanaruk et al., 2017 [9]
Amidon de maïs/pectine	Róz et al., 2016 [5]
Caséinate	Colak et al., 2015 [10]
Amidon de maïs/gélatine/cellulose	Rodriguez-Castellanos et al., 2015 [11]
Caséinate	Belyamani et al., 2014 [12]
Isolat de protéines de lactosérum/Cire de candelilla	Janjarasskul et al., 2014 [4]

Un mélange de biopolymères apporte des performances améliorées, c'est pourquoi il est intéressant de mélanger des protéines et des lipides afin de conserver une bonne barrière aux gaz apportée par les protéines et une bonne barrière à l'humidité apportée par les lipides. Pour débloquent le verrou observé dans ce manuscrit (concentration de cire >5% impossible à incorporer), des agents tensioactifs (comme la lécithine de soja souvent utilisée en formulation

agroalimentaire) pourraient par leurs caractères amphiphiles aider les interactions matrice protéique/composés hydrophobes.

D'une manière plus approfondie, il semble intéressant de poursuivre l'analyse et la caractérisation des interactions ingrédient/ingrédient formant la matrice polymère transformée par extrusion.

L'activité antimicrobienne d'un matériau « actif » passe par les propriétés de relargage de la molécule active et donc par l'étude des interactions entre la matrice et le composé antimicrobien. Des analyses de spectroscopie et de chromatographie peuvent être envisagées pour suivre différents agents incorporés à des matrices afin de déterminer leur capacité de relargage. Dans ce travail, seuls des acides organiques ont été incorporés au biopolymère mais, grâce à la technologie d'extrusion permettant un temps de séjour de la matière de seulement quelques minutes à des températures et pressions relativement basses, un grand nombre d'agents de conservation (substances minérales ou organiques, huiles essentielles, bacteriocines) peuvent être incorporés et devraient apporter une activité antimicrobienne satisfaisante. Dans ce projet, les acides organiques ont été choisis pour répondre aux exigences des industriels impliqués, il faudra donc connaître par avance l'application visée par ce type de matériau actif pour choisir les conservateurs appropriés et surtout autorisés dans chaque secteur.

De même, dans ce travail seule une souche d'*Escherichia coli* (ATCC 10536) a été étudiée, il serait intéressant d'obtenir des résultats sur d'autres bactéries à Gram négatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*), ainsi que sur des bactéries à Gram positives (*Listeria sp.*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.*), sur des levures et sur des moisissures. Un travail sur différents microorganismes avec des caractéristiques physico-chimiques différentes (méthode d'Adhésion Microbienne Au Solvant – MATS) pourrait apporter des informations dans la compréhension des interactions mélange de biopolymères /microorganismes.

L'application de toutes ces connaissances pourrait apporter une réduction de la bio-adhésion en milieu agroalimentaire et permettre une meilleure conservation des denrées alimentaires.

## Références complémentaires

- [1] F. Prochazka and G. Assezat, “Casein and/or Caseinate Thermoplastic Granule, Composition, and Method for Producing Same,” WO/2012/010421, 27-Jan-2012.
- [2] 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,” 2014.
- [3] Imane Belyamani, “Développement d’un matériau thermoplastique, biodégradable et hydrosoluble a base d’une protéine du lait,” 2011.
- [4] T. Janjarasskul, D. J. Rauch, K. L. McCarthy, and J. M. Krochta, “Barrier and tensile properties of whey protein–candelilla wax film/sheet,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 56, no. 2, pp. 377–382, May 2014.
- [5] D. Róz *et al.*, “Water Susceptibility and Mechanical Properties of Thermoplastic Starch–Pectin Blends Reactively Extruded with Edible Citric Acid,” *Materials Research*, vol. 19, no. 1, pp. 138–142, Feb. 2016.
- [6] C. Piton, “Evolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l’affinage,” *Le Lait*, vol. 68, no. 4, pp. 419–433, 1988.
- [7] D. Boyacı, F. Korel, and A. Yemenicioğlu, “Development of activate-at-home-type edible antimicrobial films: An example pH-triggering mechanism formed for smoked salmon slices using lysozyme in whey protein films,” *Food Hydrocolloids*, vol. 60, pp. 170–178, Oct. 2016.
- [8] V. M. Azevedo *et al.*, “Effect of replacement of corn starch by whey protein isolate in biodegradable film blends obtained by extrusion,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 971–980, Feb. 2017.
- [9] B. Thumthanaruk, U. Rodsuwan, P. Chancharern, O. Kerdchoechuen, N. Laohakunjit, and G. W. Chism, “Physico-Chemical Properties of Extruded Copolymer Film,” *J. Food Process Preserv.*, vol. 41, no. 2, p. UNSP e12808, Apr. 2017.
- [10] B. Y. Colak *et al.*, “Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability,” *Industrial Crops and Products*, vol. 72, pp. 142–151, Oct. 2015.
- [11] W. Rodriguez-Castellanos, F. Martinez-Bustos, D. Rodrigue, and M. Trujillo-Barragan, “Extrusion blow molding of a starch-gelatin polymer matrix reinforced with cellulose,” *Eur. Polym. J.*, vol. 73, pp. 335–343, Dec. 2015.
- [12] I. Belyamani, F. Prochazka, G. Assezat, and F. Debeaufort, “Mechanical and barrier properties of extruded film made from sodium and calcium caseinates,” *Food Packaging and Shelf Life*, vol. 2, no. 2, pp. 65–72, Dec. 2014.



# ANNEXES

# ANNEXE A : Poster présenté lors de la journée de la recherche de l'EDSIS à Saint Etienne le 16 juin 2016



## Production d'un matériau comestible et antimicrobien à base de caséine



Application : Etiquettes biorésistantes pour la traçabilité des fromages



Elodie Chevalier<sup>1</sup>, Gilles Assezat<sup>1</sup>, Frédéric Prochazka<sup>1</sup>, Nadia Oulahal<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France ; CNRS, UMR5223, Ingénierie des Matériaux Polymères, F-42023, Saint-Etienne, France ;  
<sup>2</sup>Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 – ISARA Lyon, Laboratoire BioDYMIA, Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, Technopôle Alimentec – Rue Henri de Boissieu, F-01000 Bourg en Bresse, France



### Introduction : Production actuelle d'étiquettes de fromages

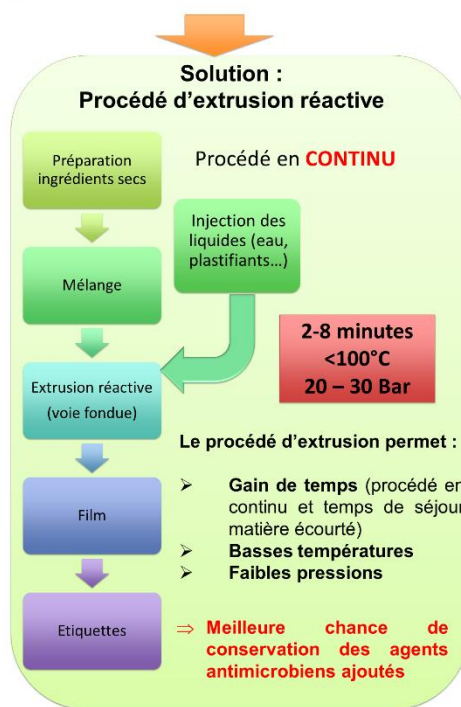


### Production d'étiquettes actives :

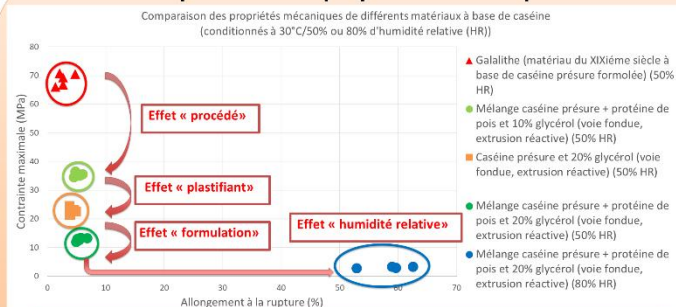
**Objectif :**  
 Elaboration d'étiquettes pour la traçabilité des fromages

### Contraintes :

- Matériau comestible
- Sensibilité des conservateurs alimentaires aux fortes pressions et hautes températures



### Comparaison des propriétés mécaniques :



- ⇒ Importance du **procédé** (formol, « cocotte-minute », voie humide ou voie fondue)
- ⇒ Importance de la **formulation** (protéines +/- solubles)
- ⇒ Importance du **plastifiant**
- ⇒ Importance de l'**humidité relative** (données non présentées)

### Optimisation :

- ❖ Production d'un matériau thermoplastique à partir de protéines
- ⇒ Contrôle des interactions (covalentes et non-covalentes)
- ❖ Ajout d'additifs pour faciliter le procédé d'extrusion et améliorer les propriétés mécaniques

#### Plastifiants:

- Réduction de la température du procédé par augmentation de la mobilité moléculaire et diminution de la viscosité

#### Agents chélateurs d'ions calcium:

- Rupture des ponts phosphocalciques entre les protéines
- Augmentation de la solubilité des protéines et procédé d'extrusion facilité

### Conclusion & Perspectives :

- ⇒ Du film à base de caséine peut être **extrudé** à faible pression et basse température, permettant la préservation future d'**agents antimicrobiens** thermolabiles pendant le procédé
- ⇒ **Essais du matériau comestible développé in situ** sur fromage auprès d'industriels et **in vitro** en cours d'étude



16/06/2016 – Journée de la recherche de l'EDSIS



## ANNEXE B : Publication dans Food Hydrocolloids (Chapitre II) :

Chevalier E., Assezat G., Prochazka F., Oulahal N. (2017) Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, Food Hydrocolloids, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>.

### ARTICLE IN PRESS

Food Hydrocolloids xxx (2017) 1e10



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodhyd](http://www.elsevier.com/locate/foodhyd)



## Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration

Elodie Chevalier <sup>a,b,\*</sup>, Gilles Assezat <sup>b</sup>, Frederic Prochazka <sup>b</sup>, Nadia Oulahal <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n 3733, IUT Lyon 1, Plateforme Alimentec, rue Henri de Boissieu F-01060 Bourg En Bresse Cedex 9, France  
<sup>b</sup> Université de Lyon, Ingénierie des Matériaux Polymères, UMR CNRS 5223, Université de Saint-Etienne, Jean Monnet, F-42023 Saint-Etienne, France

### article info

Article history:  
Received 12 June 2017  
Received in revised form  
28 August 2017  
Accepted 28 August 2017  
Available online xxx

Keywords:  
Edible film  
Casein  
Glycerol  
Extrusion  
Mechanical properties  
Water properties

### abstract

Different source of casein depending on their extraction method from milk are available on the market. Sheets from 3 different types of casein (rennet casein, acid casein and sodium caseinate) were developed using a dry process: extrusion. Casein sourcing, plasticizer concentration (13.2%w/w or 24.2%w/w) and relative humidity environment were studied for each sheet through color, density and porosity, water sensitivity and mechanical properties evaluation. A wide range of properties seems to be available through casein based sheets depending on casein source, which affected greatly water solubility (caseinates are 100% water soluble compare to acid and rennet casein). Besides, acid and rennet casein have different behaviour with water and even more with higher glycerol amounts. Indeed, rennet casein sheet is less sensitive to water than acid casein sheet at low glycerol concentration (13.2%w/w) but at the opposite, at high glycerol amount in sheets, rennet casein sheet is more hydrophilic than acid casein sheets.

Extrusion is an easy scale up process and it was used to produce casein based sheets with improved water vapor permeability (WVP). These findings can be used to find the suitable food packaging application for each casein based sheet with a low cost and efficient process.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Edible films or sheets based on hydrocolloids as polysaccharides or proteins have gained interest among the scientific community and industries over the last two decades due to their consequent potential for food packaging (Pavlath & Orts, 2009). Consumers request more environmental friendly packaging for their food that's why food industries are looking to substitute traditional synthetic plastic or at least part of it in their applications. Edible films based on biobased and biodegradable material have gained great attention these last years to produce casings, bags, pouches, wraps and

covers.

From low to intermediate relative humidity, protein films are good oxygen barrier, which make protein films appropriate choice for oxygen-sensitive food (Krochta, 2002).

Nevertheless, protein films are well known to have high water vapor permeability (WVP) compared to edible waxes or low-density polyethylene (LDPE) films for example.

Edible biobased films have been formulated from several protein sources as gelatine, corn zein, wheat gluten, peanut protein and milk proteins as whey protein and casein (Arrieta & Peltzer, 2013; Belyamani, Prochazka, Assezat, & Debeaufort, 2014; Galus & Kadzinska, 2016a; Gontard, Guilbert, & Cuq, 1993; Guerrero, Reteigi, Gabilondo, & de la Caba, 2010; Jangchud & Chinnan, 1999; Lai & Padua, 1997; Sobral, Menegalli, Hubinger, & Roques, 2001). Structure, mechanical (flexibility) and barrier properties are modified by adding plasticizers to film formulations (Vieira, da Silva, dos Santos, & Beppu, 2011). Plasticizers are added to improve processability, increase elongation and decrease film stiffness. However, adding plasticizers increases water vapor

\* Corresponding author. Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n 3733, IUT Lyon 1, Plateforme Alimentec, rue Henri de Boissieu F-01060 Bourg En Bresse Cedex 9, France.

E-mail addresses: [e.chevalier@univ-st-etienne.fr](mailto:e.chevalier@univ-st-etienne.fr) (E. Chevalier), [gilles.assezat@univ-st-etienne.fr](mailto:gilles.assezat@univ-st-etienne.fr) (G. Assezat), [prochazk@univ-st-etienne.fr](mailto:prochazk@univ-st-etienne.fr) (F. Prochazka), [nadia.oulahal@univ-lyon1.fr](mailto:nadia.oulahal@univ-lyon1.fr) (N. Oulahal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>  
0268-005X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Chevalier, E., et al., Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, Food Hydrocolloids (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>

permeability and decreases moisture barrier ability of protein films. Glycerol is the most commonly used plasticizer for improving edible film processability and properties by increasing free volume and mobility of the molecules (Hernandez-Izquierdo & Krochta, 2008).

The majority of traditional synthetic plastics are prepared by so-called “hot compounding” techniques as calendaring, injection, compression moulding and extrusion. Ingredients in these processes are combined under heat and shearing forces that bring about a state of molten plastic (thermoplastic properties of polymers) which, could be shaped as desired with good strength and integrity properties (Vieira et al., 2011). In the contrary, most of edible films are produced by solution casting technique, which consist in dissolving the biopolymer in suitable solvent to make a film-forming solution that is spread over a surface and a film is obtained after solvent evaporation. Drying time and difficult scale up are the main drawbacks of this process. Extrusion process is very interesting and promising process with easy scale up possibility to produce edible films. Several proteins have been tested at laboratory or pilot scale to produce packaging material by extrusion since few years as wheat gluten, keratin, gelatin, sunflower protein isolate, corn zein, soy protein, whey protein and caseinate (Barone, Schmidt, & Gregoire, 2006; Belyamani et al., 2014; Colak, Gouanve, Degraeve, Espuche, & Prochazka, 2015; Hernandez-Izquierdo, Reid, McHugh, De J. Berrios, & Krochta, 2008; Krishna, Nindo, & Min, 2012; Rouilly, Mériaux, Geneau, Silvestre, & Rigal, 2006; Ullsten et al., 2009; Wang & Padua, 2003; Zhang, Mungara, & Jane, 2001).

Casein is the main protein extracted from milk (~80%) which comprises 4 different components,  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein, which together in milk form colloidal micelles stabilized by caseins arrangements and calcium phosphate bridges (Swaisgood, 1993). Depending on coagulation method, different type of casein are obtained with specific characteristics, rennet and acid casein are the major type available (Kinsella, 1984). Acid casein refers to precipitated casein obtained by acidification of milk pH to 4.6 (isoelectric point of casein) with mineral acids or lactic acid (produced by lactic acid bacteria). Colloidal calcium phosphates of acid casein are solubilized and lost during coagulation process. Acid casein are insoluble in water and pH is around 4.6. In rennet casein case, coagulation is obtained by action of enzymes, chymosin (rennet), which cleaves a chemical bound in  $\kappa$ -casein. Chymosin cleaves  $\kappa$ -casein tail also referred as glycomacropetide and induce a destabilisation of casein micelles. Rennet casein obtained are insoluble in water, conserved their colloidal calcium phosphates and pH is around 7.5. Acid casein can be solubilized by neutralization with a base as sodium, potassium or calcium hydroxide to get sodium, potassium or calcium caseinates. Caseinate from acid casein don't have colloidal calcium phosphates, have a pH close to 7 and are highly water soluble.

Acid and rennet caseins are less studied than caseinate and extrusion process is a novelty for these proteins. Chick and Ustunol already reported lactic acid and rennet casein use as film forming hydrocolloids however, they modified the pH to facilitated processability during solvent casting by increasing pH which induce neutralization of casein into caseinate (Chick & Ustunol, 1998). Besides, to the best of our knowledge, there is no published studies regarding production and characterisation of insoluble rennet and acid casein edible sheets produced by extrusion process. Therefore, the aim of the present work is to evaluate the possibility to produce casein based sheet plasticized with different glycerol concentrations by extrusion process. Besides, sheet characterisation and study of casein sourcing and glycerol concentration influence in processability and sheet properties were also evaluated in order to get indications on potential food packaging applications of these sheets.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials/chemicals

Rennet casein native powder was purchased from Eurial Ingredients (Nantes, France); acid casein powder and sodium caseinate from EPI Ingredients (Ancenis, France). Glycerol was obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

### 2.2. Casein sheet preparation

Casein sheets were prepared through a dry process with a co-rotating twin screw extruder as previously described by Colak et al. with modifications (Colak, Peynichou, et al., 2015). Casein powder (rennet or acid casein or sodium caseinate) were introduced into the first zone of the extruder. Glycerol (13.2 or 24.2% (w/w) of protein powders) was added into the second zone. Temperature from hopper to die (5 cm width and 1 mm thickness) ranged from 10 °C to 75 °C. Sheets thickness is about 500  $\mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$  depending on formulation. Residence time in twin screw extruder with a powder feed speed of 2 kg/h and screw speed at 170 rpm was determined between 2 and 6 min. Prepared sheets were stored in plastic bags in cold room (4 °C) until further experiments. For color characterization, water vapor permeability analysis, water sorption analysis and water contact angle determination, extruded sheets were thinned into films of 100  $\mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$  under heated platens at 75 °C for 3 min in order to facilitated characterizations. All sheets specimens were conditioned for at least 48 h in a climate room at 50% relative humidity (RH) and 23 °C before testing.

Materials obtained differ by casein powder type and plasticizer (glycerol) concentration.

### 2.3. Physicochemical characterization

#### 2.3.1. Colour

Colour of films was determined with a colorimeter (Minolta chromameter CR-200) using the CIELAB colour parameters.  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  values were averaged from 9 readings across for each sample on a black background:  $a^* = -1.43 \pm 0.04$ ;  $b^* = -0.95 \pm 0.02$ ;  $L^* = 29.80 \pm 0.01$ . The total colour difference ( $\Delta E$ ) was calculated according to the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Where  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  and  $\Delta b^*$  are the differentials between a sample colour parameter and the colour parameter of a standard used as film background.

#### 2.3.2. Density and porosity

Relative density of the different sheets, previously dried, was determined by a pycnometer, using ethanol 95–96% as solvent.

Microstructure of cryofractured sheets were examined by Scanning Electron Microscopy (SEM) (Hitachi TM3030Hitachi High-Technologies Corporation Tokyo Japan).

The cryofractured sheets were mounted on aluminium stubs using double sided carbon adhesive tape. 15 kV of accelerating voltage was used to test all samples. Pictures were analysed by ImageJ software to determined porosity as percentage of area covered by holes.

#### 2.3.3. FT-IR

FT-IR was recorded on Alpha Spectrometer (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany). FT-IR spectrum of sheet samples were recorded with diamond ATR detector between 4000 and 400  $\text{cm}^{-1}$

Please cite this article in press as: Chevalier, E., et al., Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, *Food Hydrocolloids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>

using a total of 24 scans at room temperature.

#### 2.4. Water sensitive properties

##### 2.4.1. Moisture content, water solubility and swelling index

For all tests, 1.5 diameter discs of sheet samples were cut and conditioned at 50% RH, 23 °C in a climate room for 48 h and weighed ( $m_1$ ). Methods described by Wu et al. and Razavi et al. were used with modifications to calculate water solubility and moisture content (Razavi, Mohammad Amini, & Zahedi, 2015; Wu, Zhong, Li, Shoemaker, & Xia, 2013). Conditioned samples were then dried in a ventilated oven at 75 °C during 24 h and weighed ( $m_2$ ). Dried samples were soaked in distilled water containing 0.02% sodium azide (to avoid growth of microorganisms) during 24 h under oscillating agitation and weight of insoluble remaining part of the samples was read after a quick drying on absorbent paper ( $m_3$ ). Wet samples were dried again in a ventilated oven at 75 °C during 24 h and weighed ( $m_4$ ). Finally, dried samples were placed in the climate room at 50% RH at 23 °C and weighed after 48 h ( $m_5$ ).

With weights determined for four replicates per sample, moisture content, solubility and swelling index were determined according to the following equations:

$$\text{Moisture content (\%)} = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) * 100$$

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{m_2 - m_4}{m_2} * 100$$

$$\text{Swelling index (\%)} = \frac{m_3 - m_5}{m_5} * 100$$

##### 2.4.2. Water vapor permeability (WVP)

The gravimetric modified cup method based on ASTM E96/E96M was used with modifications to determine the WVP of edible films. Films were cut into circles (65 mm in diameter) and a digital micrometer was used to measure their thickness at three random spots, which were then averaged (noted  $\delta$ ).

Film samples were sealed (with sealant) on the top of cups containing saturated solution of NaCl (75% RH) and placed in a climate room at 50% RH and 23 °C. Weight measurements were taken at regular time intervals (about 4 h) over 3 days and the weight variations were plotted as a function of time. Measurements were performed in triplicate. Linear regression was used to determine the water vapor transmission rate (WVTR), which is the slope/film area. The WVP was calculated by the following relationship.

$$\text{WVP (g.Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-1}) = \frac{\text{WVTR}}{S(R_1 - R_2).\delta}$$

Where, S is the saturated vapour pressure and R1 and R2 are the inside and outside cup relative humidity.

##### 2.4.3. Water sorption properties

Dynamic Vapor Sorption (DVS) instrument Q5000 SA (TA Instruments, New Castle, USA) was used to determined water sorption of the films. Samples of 8 mm diameter and an approximate weight of 5 mg of thin pressed films (thickness around  $150 \pm 50 \mu\text{m}$ ) were prepared. Sample was placed in stainless steel mesh basket inside the DVS instrument, which was set to go through a sorption beginning with 0% RH and increasing in intervals of 10% RH until 90% RH at a temperature of 23 °C. Data obtained were corrected by analysing real dried weight at 0% RH

with a Coulometer 899, which allows coulometric water determination according to Karl Fisher (Metrohm, Herisau, Switzerland).

##### 2.4.4. Water contact angles

The angle between the film surface, as baseline, and droplet (2  $\mu\text{L}$ ) of water, called contact angle ( $\theta$ ), was evaluated with a drop shape analyser Krüss DSA25 using the sessile drop method (Krüss GmbH, Hamburg, Germany). A drop of 2  $\mu\text{L}$  was deposited on the film surface and contact angle as well as kinetic sorption was followed from 10 to 120 s. Effect of evaporation was analysed on PMMA support over 120 s, that is considered as impermeable to water and aqueous solutions. The determination of angles was replicated 3 times and averaged. Since films are water soluble or at least highly hydrophilic, measurements were done at specific times without waiting equilibrium. Pictures example of films reaction to water droplet were extracted from movies saved during kinetic sorption observation. This is not possible to consider values as absolute contact angles due to water sorption reaction over time (no equilibrium state), however for comparison purpose between the different film compositions among themselves, it is reasonable to follow this approach in order to characterize films and draw conclusions on their properties.

##### 2.5. Mechanical properties

Tensile specimens were cut as  $L = 20 \text{ mm}$ ,  $b_1 = 4.5 \text{ mm}$ ,  $b_2 = 8.5 \text{ mm}$ , where L is the distance between shoulders,  $b_1$  is width of part between shoulders and  $b_2$  is width of grip section. Samples thickness was approximately  $500 \pm 50 \mu\text{m}$ . Test specimens were conditioned at 50% RH, 65% RH and 80% RH at 30 °C during one week before tensile test. Five specimens were tested per each composition. Testing was conducted on a Shimadzu Autograph AGS-X test machine (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) fitted with a calibrated 500 N load cell and a cross-head speed of 5 mm/min. Ultimate tensile strength and elongation at break were obtained and the mean for each sample was plot on a graph.

##### 2.6. Statistical analyses

Data were analysed with XLSTAT software (Addinsoft, v19.02). Fisher's test, Low Significant Difference (LSD) was used to compare the statistical difference of compositions within the different experiments through one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Physicochemical characterization

##### 3.1.1. Color

Color parameters are fundamental for biopolymer films, especially for packaging use and bring a great contribution to the consumers' willingness to buy a food product. Film color can be affected by different factors as plasticizers addition, thermal treatment and production process for example. Lab colour values of different films based on different casein source and with 13.2% or 24.2% of glycerol were obtained using a black background as standard. Background was proved to influence color measurements and Meléndez-Martínez et al. and Stinco et al. proved that black background allows the best color discrimination between samples (Meléndez-Martínez, Vicario, & Heredia, 2005; Stinco et al., 2012). As can be seen in Table 1, all films showed a and b values close to 0 ( $-1.15 < a^* < -0.87$  and  $-0.99 < b^* < -0.53$ ), which indicates no dark pronounced color of films. The main difference observed between the different films compositions occurred on lightness parameter ( $L^*$ ). Indeed,  $L^*$  parameter indicate that glycerol concentration is a

**Table 1**

Values (average  $\pm$  standard deviation) of color parameters L, a\*, b\* and calculated  $\Delta E^{**}$  of rennet casein, acid casein and sodium caseinate based films plasticized with glycerol at 13.2 or 24.2% (w/w), n = 9. \*\*Comparison by subtraction of black background as standard.

Sheet composition	a*	b*	L*	$\Delta E^{**}$
Rennet casein +13.2% Glycerol	$-0.89 \pm 0.02^a$	$-0.75 \pm 0.05^c$	$41.62 \pm 0.98^a$	$11.75 \pm 0.95^a$
Rennet casein +24.2% Glycerol	$-0.87 \pm 0.04^a$	$-0.68 \pm 0.08^b$	$40.46 \pm 0.82^b$	$10.57 \pm 0.84^b$
Acid casein +13.2% Glycerol	$-0.93 \pm 0.16^a$	$-0.99 \pm 0.06^d$	$42.31 \pm 1.68^a$	$12.27 \pm 1.73^a$
Acid casein +24.2% Glycerol	$-1.15 \pm 0.23^b$	$-0.63 \pm 0.07^b$	$39.75 \pm 1.34^b$	$9.80 \pm 1.34^b$
Sodium caseinate +13.2% Glycerol	$-1.14 \pm 0.07^b$	$-0.53 \pm 0.10^a$	$42.10 \pm 0.20^a$	$12.33 \pm 0.20^a$
Sodium caseinate +24.2% Glycerol	$-0.96 \pm 0.07^a$	$-0.77 \pm 0.10^c$	$40.07 \pm 0.73^b$	$10.36 \pm 0.72^b$

Different letters indicate significantly different levels within each formulation,  $p < 0.05$ .

significant factor affecting lightness. The total color difference ( $\Delta E$ ) provide a good mean of film comparison since all parameters (a\*, b\*, L\*) are included in the analysis.  $\Delta E$  showed that glycerol is affecting lightness and increasing glycerol concentration in casein films (24.2%) resulted in significant increase ( $p < 0.05$ ) in lightness and transparency for all casein type films since  $\Delta E$  is lower. Plasticizers are generally proved to have this effect on hydrocolloid films and were previously reported (Ahmadi, Kalbasi-Ashtari, Oromiehie, Yarmand, & Jahandideh, 2012; Jouki, Khazaei, Ghasemlou, & HadiNezhad, 2013). This plasticizer effect could be attribute to increased polymer chain mobility and intermolecular spacing with glycerol increase (Farhan & Hani, 2017). It is also remarkable that films with same amount of glycerol but with different casein source have similar color values. Extruded materials based on different casein sources seem to produce films with similar and good transparency properties. Casein source used in this work have less influence on transparency than glycerol concentration. However, differences in color attributes were described for films made with sodium or calcium caseinates for example but, this difference was not obvious at high glycerol concentration (Arrieta et al., 2014; Fabra, Talens, & Chiralt, 2010).

### 3.1.2. Density and porosity

Relative density was measured and porosity (percentage of area covered by holes) was analysed from SEM pictures of cryofractured samples. Results are summarized in Table 2. The sheet density seems to be depending on casein source. Density and porosity don't seem to be affected by glycerol amount. However, density of sodium caseinate sheets (1.24) was lower than acid casein sheets (1.25–1.26) and rennet casein sheets (1.30). The lower density for sodium caseinate based sheets could be explained by the porosity observed on cryofractures as can be seen in Fig. 1 and Table 2. Density difference is probably due to porosity observed in sheets. Pression observed during extrusion process could also explain the density difference since pression was 2–4 times lower during caseinate sheet extrusion than during acid and rennet casein sheet extrusion under the same other conditions (temperature and screw speed). Pressure during extrusion seems to be impacted by raw material origin and has a noticeable effect on final sheet porosity and density.

Zarzycki et al. already demonstrated that increasing moisture content of pea-wheat extrudates results in higher porosity

(Zarzycki et al., 2015). The porosity observed could be an indication of longitudinal expansion as previously supposed by Zarzycki et al. and Kasprzak and Rzedzicki (Kasprzak & Rzedzicki, 2007; Zarzycki et al., 2015).

Even if casein powders conditioned at 50% RH before extrusion had similar water content values, the different casein sources have different water sensitivity during process. Indeed, water amount added in the extruder was adjusted for each formulation, which implies different amount of linked water during extrusion process and that could probably explain density and porosity value (caseinate > rennet casein > acid casein).

### 3.1.3. FT-IR

The FTIR spectra of casein based sheets plasticized with 13.2% or 24.2% of glycerol are shown in Fig. 2. Absorption peaks corresponding to stretching vibrations of amide bonds associated to protein network are located between 1200 and 1700  $\text{cm}^{-1}$  (Pereira, Souza, Cerqueira, Teixeira, & Vicente, 2010). Typical absorption bands of glycerol are located in the region 800–1150  $\text{cm}^{-1}$  containing 5 peaks corresponding to the vibrations of C-C and C-O linkages (Guerrero et al., 2010).

The FTIR spectra obtained for extruded casein sheets showed incorporation of glycerol compared to spectra of native casein powder with additional peaks in the glycerol typical region 800–1150  $\text{cm}^{-1}$ . When different substances are mixed, physical blend versus chemical interactions are reflected by changes in characteristic spectra peaks (Guan, Liu, Zhang, & Yao, 1998). In all casein based sheet spectra, Amide II region, derived mostly from in-plane N-H bending, is shifted from 1510 (native protein powder) to around 1530  $\text{cm}^{-1}$  for extruded plasticized sheets. This result indicated that strong interactions were engaged between casein and hydroxyl groups of glycerol. Besides, increase in glycerol concentration implied greater shifting of the peak from around 1510  $\text{cm}^{-1}$  to 1530  $\text{cm}^{-1}$  (for 13.2% glycerol) and 1535  $\text{cm}^{-1}$  (for 24.2% glycerol). This kind of peak shifting due to linkages of hydroxyl groups was reported by several authors on polymer blend (Wu et al., 2013). Caseins are protein with limited secondary structures (Horne & Banks, 2004). This lack of secondary structure and the good heat stability of caseins (Walstra, 1990) implied a lower process effect on protein morphology as confirmed by FTIR results.

**Table 2**

Values (average  $\pm$  standard deviation) of relative density and porosity of rennet casein, acid casein and sodium caseinate based sheet plasticized with glycerol at 13.2 or 24.2% (w/w). For density and porosity number of repetitions n = 3.

Sheet composition	Relative density	Porosity (Percentage of area covered by holes)
Rennet casein +13.2% Glycerol	$1.30 \pm 0.01^a$	$0.14 \pm 0.02^b$
Rennet casein +24.2% Glycerol	$1.30 \pm 0.01^a$	$0.30 \pm 0.09^c$
Acid casein +13.2% Glycerol	$1.25 \pm 0.01^b$	$0.11 \pm 0.07^c$
Acid casein +24.2% Glycerol	$1.26 \pm 0.01^b$	$0.05 \pm 0.01^c$
Sodium caseinate + 13.2% Glycerol	$1.24 \pm 0.01^c$	$0.63 \pm 0.10^a$
Sodium caseinate + 24.2% Glycerol	$1.24 \pm 0.01^c$	$0.72 \pm 0.11^a$

Please cite this article in press as: Chevalier, E., et al., Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, *Food Hydrocolloids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>

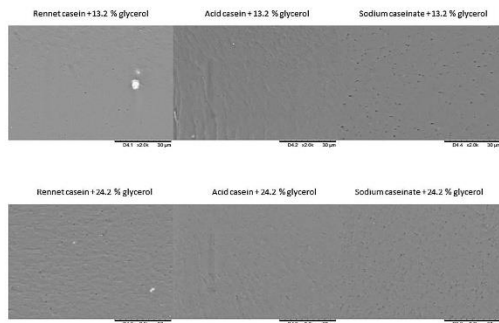


Fig. 1. Scanning electron micrographs (SEM) of cross-sections of extruded casein based sheets plasticized with different amount of glycerol.

### 3.2. Water sensitive properties

#### 3.2.1. Moisture content, solubility and swelling index

Sheets were conditioned, dried and emerged in water to study the effect of casein source and amount of plasticizer added on casein based extruded sheets. Moisture content (MC), solubility (S) and Swelling index (SI) of casein based edible sheets plasticized with glycerol are presented in Table 3. All casein based sheets containing 24.3% glycerol as plasticizer exhibited significantly higher moisture content value due to the hygroscopic nature of glycerol, which allows water binding through sheet surface wetting and moisture absorption (Kokoszka, Debeaufort, Lenart, & Voilley, 2010b).

Concerning solubility, results proved that sodium caseinate sheets are fully soluble after 24 h immersion in water (even more, no sheet integrity was observed after 3 h of immersion). Soluble part of acid and rennet casein sheets were mostly related to the glycerol amount contained, which is soluble in water. As raw material, caseinate are well known to be highly water soluble and acid or rennet casein in the contrary are insoluble in water. Same results were observed after extrusion process for the different casein type sheets. These results showed impact of casein extraction treatment on the properties of edible sheets. Indeed, raw material should be selected according to the desirable food application requirements.

Besides, swelling index is also an important parameter for food application when sheets is going to be in contact with water. Swelling of all sheets were at least of 70% (weight increase) and this is probably due to high amount of active hydroxyl groups in sheets. Swelling index of acid casein sheet was lower than rennet casein sheet and this could be attribute to the loss of colloidal calcium phosphate in acid casein. Indeed, it has been demonstrated that amount of linked water depend on the quantity of colloidal calcium linked to the protein (Mariette, Tellier, Brule, & Marchal, 1993), which is the case for rennet casein, where colloidal calcium phosphate remains linked between caseins.

#### 3.2.2. Water sorption properties

Water sorption isotherms of casein based films containing 13.2% or 24.2% of glycerol are presented in Fig. 3. The sigmoid shape of water sorption isotherms is typical of many hydrophilic polymers and is frequently reported in the literature (Cuq, Gontard, Cuq, & Guilbert, 1997; Kristo, Koutsoumanis, & Biliaderis, 2008). All sorption isotherms could be separated in two parts. At  $a_w < 0.5$ , behaviour in moisture sorption is less depending on casein source and plasticizer amount and showed a gradual initial increase in

moisture content, compared to the rapid increment in film water uptake at  $a_w > 0.5$ . Up to  $a_w = 0.5$ , films with less plasticizer (13.2%) are more sensitive to moisture sorption since less binding sites are engaged with glycerol. Sorption increase at higher  $a_w$  has been reported with addition of plasticizers and low molecular weight constituents since they can absorb more readily water than biopolymer at high  $a_w$  (Godbillot, Dole, Joly, Rogé, & Mathlouthi, 2006; Kristo et al., 2008). Indeed, at high  $a_w$  value, hydrogen bonding between protein matrix and glycerol could be disrupted by water sorption and interactions casein – water and glycerol – water could be promoted and allows increased moisture uptake and swelling of films.

Film water sorption depend on glycerol amount but also on casein source at high  $a_w$ . Sodium caseinate films are more sensitive to moisture sorption than rennet casein films and acid casein films. As previously described for swelling index, extraction method and solubility properties of casein raw material have a significant effect on water sensitivity of extruded films. Indeed, caseinate are well known to be water soluble while acid and rennet casein are non-soluble. Even if acid and rennet casein have similar solubility properties, they don't have similar water sensitivity due to their structure difference:  $\kappa$ -casein tail missing for rennet casein and colloidal calcium phosphate missing for acid casein for example.

#### 3.2.3. Water vapor permeability (WVP)

Water sorption previously described measure the water binding ability and water affinity of films depending on relative humidity conditions, whereas WVP correspond to diffusivity and mass transfer of moisture on a molecular level. Both parameters are of main importance and should be as low as possible in case of food packaging applications in order to avoid moisture transfer between the food and the surrounding atmosphere or between two components with different  $a_w$  (Gontard, Guilbert, & Cuq, 1992; McHUGH, Avena-Bustillos & Krochta, 1993). As can be seen on Table 3, casein films are good barrier to water vapor (WVP less than  $11.10^{-12}$  g m/Pa.s.m<sup>2</sup>). Indeed, WVP values are at least 5 to 300 times lower than other protein or polysaccharide films containing glycerol previously reported (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Aydt, Weller, & Testin, 1991; Banerjee & Chen, 1995; Chick & Ustunol, 1998; Gontard et al., 1992; Shen, Wu, Chen, & Zhao, 2010). These low WVP value compared to the literature could be due to the extrusion process, since previously literature mentioned concerns hydrocolloids films prepared by solution casting. Extrusion process could induce a denser structure through compressive and shear stresses effect in the process which could reduce WVP. This result was also observed by Dang et al. who found better WVP values (10–100 times lower) for starch containing chitosan prepared by blown film extrusion (Dang & Yoksan, 2016) than similar material prepared by solution casting (Shen et al., 2010).

Based on WVP values, casein source and glycerol amount have a significant effect on the water vapor permeability. Indeed, high glycerol amount (24.2%) or use of water soluble sodium caseinate induced a weaker water barrier property. Plasticization by glycerol or other plasticizers has been reported to increase WVP of hydrocolloid film (Ahmadi et al., 2012; Razavi et al., 2015). Difference in WVP could be also explained by the casein film structure previously described (Table 2) that showed higher porosity for caseinate than rennet and acid casein, which have denser material structure that could be correlated to the water barrier value.

#### 3.2.4. Water contact angles

Film surface properties are analysed by water contact angle determined over time for 120 s for each film. Casein source seems to affect water absorption from films and it could be interesting to observe water absorption kinetic for each casein based film

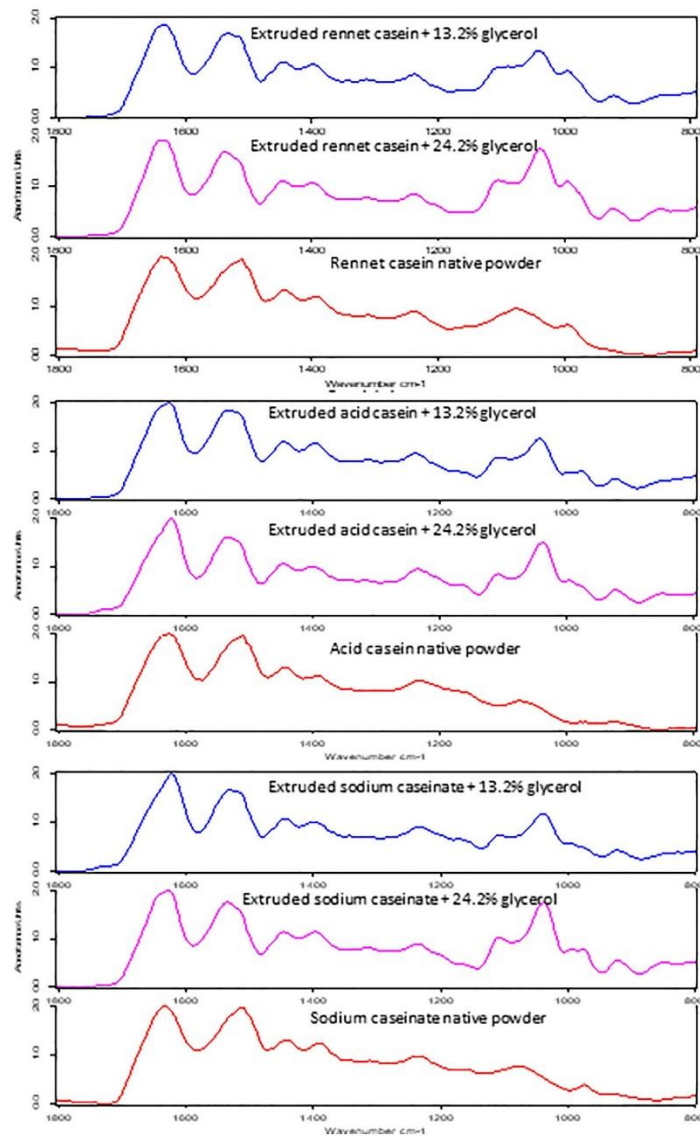


Fig. 2. FTIR spectroscopy of native casein powders and extruded casein sheets.

formulation. Moreover, water absorption kinetic is an important characteristic of polymers aimed for food packaging. Water contact angle is changing over time since all materials are hydrophilic and water sensitive, indicating that water droplet swell over time and that interactions are implied between film surface and water drop (Kokoszka, Debeaufort, Lenart, & Voilley, 2010a). The decrease of contact angle observed over time could also be attributed to a local change of material with an hydration by absorption and swelling

layer by layer of casein which will increase plasticization of films by water and increase absorption. Therefore, sorption kinetic was determined for this kind of hydrophilic hydrocolloid films and is presented in Fig. 4. Generally, contact angle measurements are much lower for hydrocolloid film than those obtained for hydrophobic materials as low-density polyethylene film (93.9–100.2°) or Plexiglas (91.5°) (Galus & Kadzińska, 2016b). Casein based materials have hydrophilic character in comparison to synthetic material but

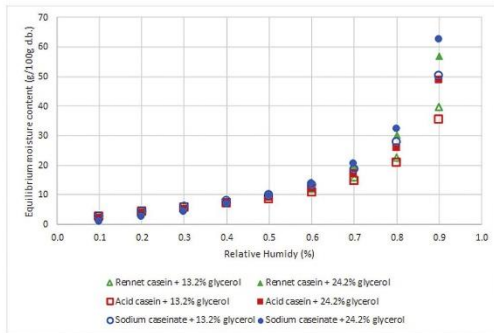
Please cite this article in press as: Chevalier, E., et al., Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, *Food Hydrocolloids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>



**Table 3**

Values of water sensitive properties represented by moisture content (n = 4), solubility (n = 4), swelling index (n = 4) and water vapor permeability (n = 3).

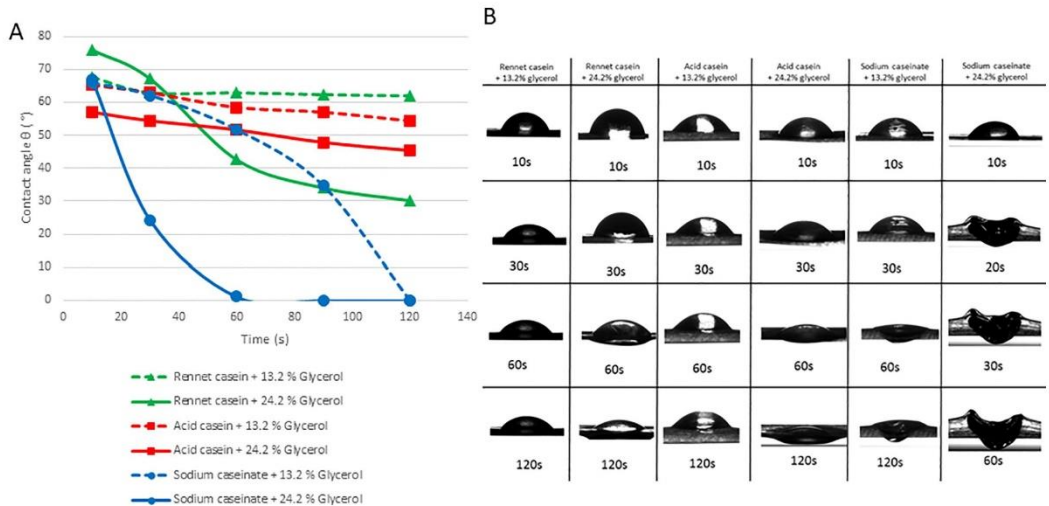
Composition	Moisture content (%)	Solubility in water (%)	Swelling index in water (%)	Water vapor permeability (10 <sup>12</sup> × g.m/Pa.s.m <sup>2</sup> )
Rennet casein + 13.2% Glycerol	8.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	16.9 ± 0.8 <sup>d</sup>	101.5 ± 22.7 <sup>ab</sup>	5.4 ± 1.0 <sup>b</sup>
Rennet casein + 24.2% Glycerol	14.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	27.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	128.3 ± 27.9 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
Acid casein + 13.2% Glycerol	6.5 ± 0.6 <sup>d</sup>	14.0 ± 1.9 <sup>e</sup>	70.5 ± 6.4 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.5 <sup>b</sup>
Acid casein + 24.2% Glycerol	14.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	24.1 ± 0.3 <sup>c</sup>	97.6 ± 7.4 <sup>ab</sup>	10.9 ± 0.2 <sup>a</sup>
Sodium caseinate + 13.2% Glycerol	9.3 ± 0.3 <sup>c</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	/	9.4 ± 1.9 <sup>a</sup>
Sodium caseinate + 24.2% Glycerol	19.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	/	10.3 ± 2.6 <sup>a</sup>



**Fig. 3.** Adsorption isotherms at 23 °C of casein based films plasticized with different glycerol concentration (13.2% or 24.2% (w/w)).

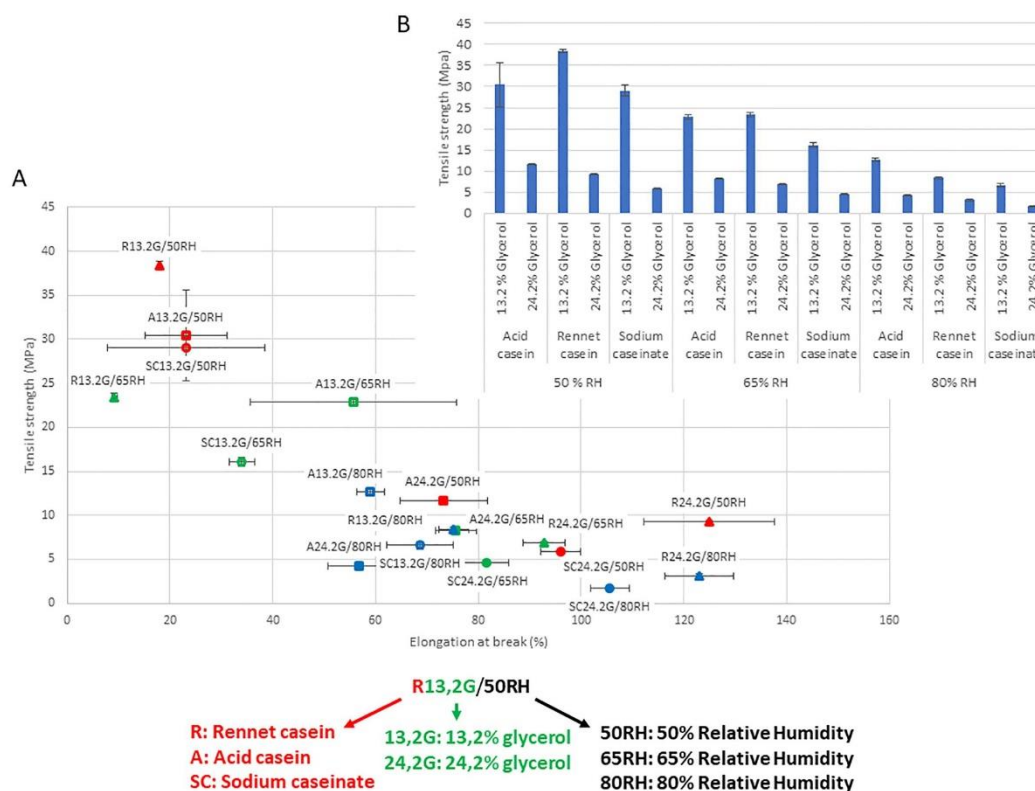
possess a more hydrophobic surface property than many protein films in the literature (except for sodium caseinate films). For example, Galus et al. found a contact angle <37.4° for whey protein films and Kokoszka et al. found a contact angle <32.3° for soy protein isolate-based films (Galus & Kadzińska, 2016b; Kokoszka et al., 2010b). On Fig. 4A, sorption kinetic curves showed results in accordance with previously experiments, where plasticizer

amount and casein source have an important role in water sensitivity of films. Indeed, caseinate are highly sensitive to water and even water soluble. In sodium caseinate case, water droplet will pass through the film and pierced it through after 60 s for caseinate and 13.2% gly but only after 20 s with 24.2% glycerol (Fig. 4B). Concerning insoluble casein films, rennet and acid casein have similar surface properties up to 60 s (contact angle between 57° and 76°). After 60 s, surface properties and sorption kinetic between both type of caseins and films with different glycerol amount differ significantly. Films containing higher concentration of glycerol (highly hydrophilic substance) have been proved earlier to be more sensitive to water molecules and material will absorb and swell water molecules quickly and decrease in the water contact angle measured was observed (Fig. 4B). Rennet casein film with 24.2% glycerol looks very water sensitive at the surface with the highest decrease over time (76°–30°) and this sensitivity was also observed at high a<sub>w</sub> on sorption kinetic analyses. It could be assumed that glycerol when added at high concentration is more located at the surface for rennet casein film than for acid casein film to explain different behaviour of acid and rennet casein films in sorption but no difference in water immersion tests (solubility and swelling). Acid casein films absorb less water molecule over time because of the absence of colloidal calcium phosphate after extraction of casein with acids. However, rennet casein film with low plasticizer amount have also a more hydrophobic surface which could be explain by the lack of κ-casein tail hydrolysed by



**Fig. 4.** Water contact angles of casein based films plasticized with 13.2 or 24.2% of glycerol over time. A: Sorption kinetic of water droplet on film surface over 120 s (mean value of triplicates). B: Pictures of water droplet evolution over time and film swelling or degradation.

Please cite this article in press as: Chevalier, E., et al., Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, *Food Hydrocolloids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>



**Fig. 5.** Mechanical properties of the different extruded casein based sheets conditioned at 50% relative humidity (RH), 65% RH or 80% RH and 30 °C (n = 5). A: represented as tensile strength as function of elongation at break and B: represented as tensile strength as function of relative humidity, casein source and glycerol concentration.

chymosine. Indeed,  $\kappa$ -casein tail (glycomacropeptide) is more hydrophilic and bring casein micelle stability in milk by steric repulsion. It could be assumed that more hydrophobic casein zones are present on the rennet casein film surface to explain its higher value for water surface contact angle (at low glycerol concentration).

### 3.3. Mechanical properties

Fig. 5A shows Tensile Strength (TS) as function of Elongation at Break (EAB) for the 6 different formulations conditioned before testing at 50, 65 and 80% relative humidity and 30 °C. Water sensitivity of casein based sheets could imply modifications of mechanical properties with different relative humidity conditioning. Edible sheets aimed for food packaging applications will encounter different food matrices having different  $a_w$ .

In Fig. 5, sheets with low glycerol amount have higher TS and lower EAB than sheets highly plasticized by glycerol or water. Indeed, sheets with 13.2% of glycerol and conditioned at 50 and 65% RH have a TS between 16 and 38 MPa and an EAB between 9 and 55% in comparison with more plasticized sheets, which have TS between 2 and 13 MPa and an EAB between 56 and 125%. Fig. 5B shows that glycerol and water molecules act as plasticizers and decrease intermolecular interactions and by this way increase free

volume and finally decrease mechanical resistance (Sobral et al., 2001). Besides, the increase in glycerol concentration increases moisture absorption (correlated by water sensitivity testing results previously described), which contribute to the reduction of interactions between caseins. This modification of mechanical properties due to plasticizer effect has been widely reported (Cuq et al., 1997; Gontard et al., 1993; McHugh & Krochta, 1994).

Water is the main parameter before glycerol influencing mechanical properties (see Fig. 5B). Acid casein sheet that have been proved less water sensitive have similar TS and more particularly EAB conditioned at 50, 65 or 80% RH. In the contrary, EAB of more hydrophilic sheets that are sodium caseinate and rennet casein based sheet is greatly increased by higher relative humidity conditioning. Casein based sheets are highly influenced by glycerol amount at 50% RH since TS change from 38; 30 and 29 MPa to 9; 12 and 6 MPa and EAB change from 18; 23 and 23% to 125; 73 and 96% for rennet casein sheet, acid casein sheet and sodium caseinate sheet respectively. Sheets containing 13.2% of glycerol have mechanical properties highly sensitive to moisture in comparison to sheets with high content of glycerol. This may be associated with saturation of casein binding sites by glycerol and water (Godbillot et al., 2006).

Through casein source choice as raw material, glycerol concentration and applied conditions, a wide range of mechanical

Please cite this article in press as: Chevalier, E., et al., Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, *Food Hydrocolloids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>

properties can be obtained from 2 to 38 MPa for tensile strength and from 23 to 125% for elongation at break. This result is particularly interesting to aim at several applications. Indeed, appropriate casein source choice with specific protein properties, as solubility (caseinates) and sensibility to acids or calcium chelating agent (rennet casein), is a novel approach to produce edible sheets based on casein.

#### 4. Conclusions

Sheets were successfully prepared by extrusion process and especially for the first time at our knowledge for acid and rennet casein. Essential characteristics as mechanical and water sensibility were evaluated for potential usage of final sheet as food packaging system. Glycerol concentration, relative humidity condition and casein source have been proved to affect these properties.

A considerable range of properties are available with casein based sheets from water soluble and very water sensitive, sodium caseinate sheets to insoluble and with more hydrophobic surface (sorption kinetic by contact angle measurements), acid casein sheets.

Comparison of water vapor permeability and mechanical properties of hydrocolloid sheets within the literature is difficult due to relative humidity storage conditions for WVP and strain speed or thickness of sheets in case of tensile test since WVP and mechanical properties are dependent on these parameters. However, edible casein sheets reveal general good mechanical properties, appearance quality (transparency) and provide improved moisture barrier compared to other hydrocolloid sheets due to the dry production process.

Protein sheets are highly water sensitive and results presented in this work showed how glycerol emphasized this phenomenon confirmed by significant increase of swelling in water, water vapor permeability and water sorption.

Further research should be focused on improving the wide range of properties available with extruded casein through other type of extracted caseins (CO<sub>2</sub> precipitated casein or micellar casein, which for example will keep colloidal calcium phosphate and κ-casein tail), addition of other plasticizers or blends of biopolymers for example.

#### Acknowledgements

Funding: This work was supported by Region Rhône-Alpes (under ARC Environnement project), Conseil Départemental de l'Ain and Bourg en Bresse Agglomération.

#### References

- Ahmadi, R., Kalbasi-Ashdari, A., Oromiehie, A., Yarmand, M.-S., & Jahandideh, F. (2012). Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk.). *Journal of Food Engineering*, 109(4), 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.11.010>.
- Arrieta, M. P., & Peltzer, M. A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002>.
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., López, J., Garrigós, M., del, C., Valente, A. J. M., et al. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 121, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.015>.
- Avena-Bustillos, R. J., & Krochta, J. M. (1993). Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. *Journal of Food Science*, 58(4), 904–907. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09388.x>.
- Aydt, T., Weller, C., & Testin, R. (1991). Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. *Biological Systems Engineering: Papers and Publications*. Retrieved from <http://digitalcommons.unl.edu/biosysengfacpub/195>.
- Banerjee, R., & Chen, H. (1995). Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 78(8), 1673–1683. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76792-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76792-3).
- Barone, J. R., Schmidt, W. F., & Gregoire, N. T. (2006). Extrusion of feather keratin. *Journal of Applied Polymer Science*, 100(2), 1432–1442. <https://doi.org/10.1002/app.23501>.
- Belyamani, L., Prochazka, F., Assezat, G., & Debeaufort, F. (2014). Mechanical and barrier properties of extruded film made from sodium and calcium caseinates. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.07.003>.
- Chick, J., & Ustunol, Z. (1998). Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*, 63(6), 1024–1027. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15846.x>.
- Colak, B. Y., Gouanve, F., Degraeve, P., Espuche, E., & Prochazka, F. (2015). Study of the influences of film processing conditions and glycerol amount on the water sorption and gas barrier properties of novel sodium caseinate films. *Journal of Membrane Science*, 478, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.12.027>.
- Colak, B. Y., Peynichou, P., Galland, S., Oulahal, N., Assezat, G., Prochazka, F., et al. (2015). Active biodegradable sodium caseinate films manufactured by blown-film extrusion: Effect of thermo-mechanical processing parameters and formulation on lysozyme stability. *Industrial Crops and Products*, 72, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.047>.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.-L., & Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 622–626. <https://doi.org/10.1021/jf960352i>.
- Dang, K. M., & Yoksan, R. (2016). Morphological characteristics and barrier properties of thermoplastic starch/chitosan blown film. *Carbohydrate Polymers*, 150, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.113>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.010>.
- Farhan, A., & Hani, N. M. (2017). Characterization of edible packaging films based on semi-refined kappa-carrageenan plasticized with glycerol and sorbitol. *Food Hydrocolloids*, 64, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.034>.
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2016a). Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.013>.
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2016b). Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.013>.
- Godbillot, L., Dole, P., Joly, C., Rogé, B., & Mathlouthi, M. (2006). Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chemistry*, 96(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.054>.
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.-L. (1992). Edible wheat gluten Films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>.
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.-L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58(1), 206–211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb03246.x>.
- Guan, Y., Liu, X., Zhang, Y., & Yao, K. (1998). Study of phase behavior on chitosan/viscose rayon blend film. *Journal of Applied Polymer Science*, 67(12), 1965–1972. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19980321\)67:12<1965::AID-APP2>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980321)67:12<1965::AID-APP2>3.0.CO;2-L).
- Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., & de la Caba, K. (2010). Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.039>.
- Hernandez-Izquierdo, V. m., & Krochta, J. m (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation—a review. *Journal of Food Science*, 73(2), R30–R39. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x>.
- Hernandez-Izquierdo, V. m., Reid, D. s., McHugh, T. h., De J. Berrios, J., & Krochta, J. m (2008). Thermal transitions and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures. *Journal of Food Science*, 73(4), E169–E175. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00735.x>.
- Horne, D. S., & Banks, J. M. (2004). Rennet-induced coagulation of milk. In P. L. H. M. Patrick F. Fox, Timothy M. Cogan, & Timothy P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 1, pp. 47–70). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80062-9](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80062-9).
- Jangchud, A., & Chinnan, M. S. (1999). Properties of peanut protein Film: Sorption isotherm and plasticizer effect. *LWT - Food Science and Technology*, 32(2), 89–94. <https://doi.org/10.1006/food.1998.0498>.
- Jouki, M., Khazaei, N., Ghasemlou, M., & HadiNezhad, M. (2013). Effect of glycerol concentration on edible film production from cross seed carbohydrate gum. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.077>.
- Kasprzak, M., & Rzedzicki, Z. (2007). Effect of bath temperature and soaking time on the dynamics of water holding capacity of everlasting pea-wheat extrudates. *International Agrophysics*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=Dj2012039793>.
- Kinsella, J. E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3), 197–262. <https://doi.org/10.1080/10408398409527401>.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A., & Voilley, A. (2010a). Liquid and vapour water transfer through whey protein/lipid emulsion films. *Journal of the Science*

Please cite this article in press as: Chevalier, E., et al., Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration, *Food Hydrocolloids* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>

- of Food and Agriculture, 90(10), 1673–1680. <https://doi.org/10.1002/jfsa.4001>.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A., & Voilley, A. (2010b). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, 20(1), 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.008>.
- Krishna, M., Nindo, C. I., & Min, S. C. (2012). Development of fish gelatin edible films using extrusion and compression molding. *Journal of Food Engineering*, 108(2), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.002>.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.003>.
- Krochta, J. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings. In *Protein-based films and coatings*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420031980.ch1>.
- Lai, H.-M., & Padua, G. W. (1997). Properties and microstructure of plasticized zein films. *Cereal Chemistry*, 74(6), 771–775. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1997.74.6.771>.
- Mariette, F., Tellier, C., Brule, G., & Marchal, P. (1993). Multinuclear NMR study of the pH dependent water state in skim milk and caseinate solutions. *Journal of Dairy Research*, 60(2), 175–188. <https://doi.org/10.1017/S0022029900027497>.
- McHUGH, T. H., Avena-Bustillos, R., & Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb09387.x>.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Sorbitol- vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 841–845. <https://doi.org/10.1021/jf00040a001>.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2005). Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: Effect of the background. *Food Quality and Preference*, 16(5), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.09.003>.
- Pavlat, A. E., & Orts, W. (2009). Edible films and Coatings: Why, what, and how? In K. C. Huber, & M. E. Embuscado (Eds.), *Edible films and coatings for food applications* (pp. 1–23). New York: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1).
- Pereira, R. N., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Effects of electric fields on protein unfolding and Aggregation: Influence on edible films formation. *Biomacromolecules*, 11(11), 2912–2918. <https://doi.org/10.1021/bm100681a>.
- Razavi, S. M. A., Mohammad Amini, A., & Zahedi, Y. (2015). Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. *Food Hydrocolloids*, 43, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.028>.
- Rouilly, A., Mériaux, A., Geneau, C., Silvestre, F., & Rigal, L. (2006). Film extrusion of sunflower protein isolate. *Polymer Engineering & Science*, 46(11), 1635–1640. <https://doi.org/10.1002/pen.20634>.
- Shen, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.003>.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 423–432. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3).
- Stinco, C., Fernández-Vázquez, R., Meléndez-Martínez, A., Heredia, F., Mejías, E., & Vicario, I. (2012). Influence of different backgrounds on the instrumental color specification of orange juices. In J. Caivano, & M. del Pilar (Eds.), *Color in food* (pp. 143–152). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11878-18>.
- Swaisgood, H. E. (1993). Review and update of casein chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3054–3061. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77645-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77645-6).
- Ullsten, N. H., Cho, S.-W., Spencer, G., Gällstedt, M., Johansson, E., & Hedenqvist, M. S. (2009). Properties of extruded vital wheat gluten sheets with sodium hydroxide and salicylic acid. *Biomacromolecules*, 10(3), 479–488. <https://doi.org/10.1021/bm800691h>.
- Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>.
- Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73(8), 1965–1979. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3).
- Wang, Y., & Padua, G. W. (2003). Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288(11), 886–893. <https://doi.org/10.1002/mame.200300069>.
- Wu, J., Zhong, F., Li, Y., Shoemaker, C. F., & Xia, W. (2013). Preparation and characterization of pullulan–chitosan and pullulan–carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.002>.
- Zarzycki, P., Kasprzak, M., Rzedzicki, Z., Sobota, A., Wirkijowska, A., & Sykut-Domańska, E. (2015). Effect of blend moisture and extrusion temperature on physical properties of everlasting pea-wheat extrudates. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6663–6670. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1754-y>.
- Zhang, J., Mungara, P., & Jane, J. (2001). Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer*, 42(6), 2569–2578. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00624-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00624-8).

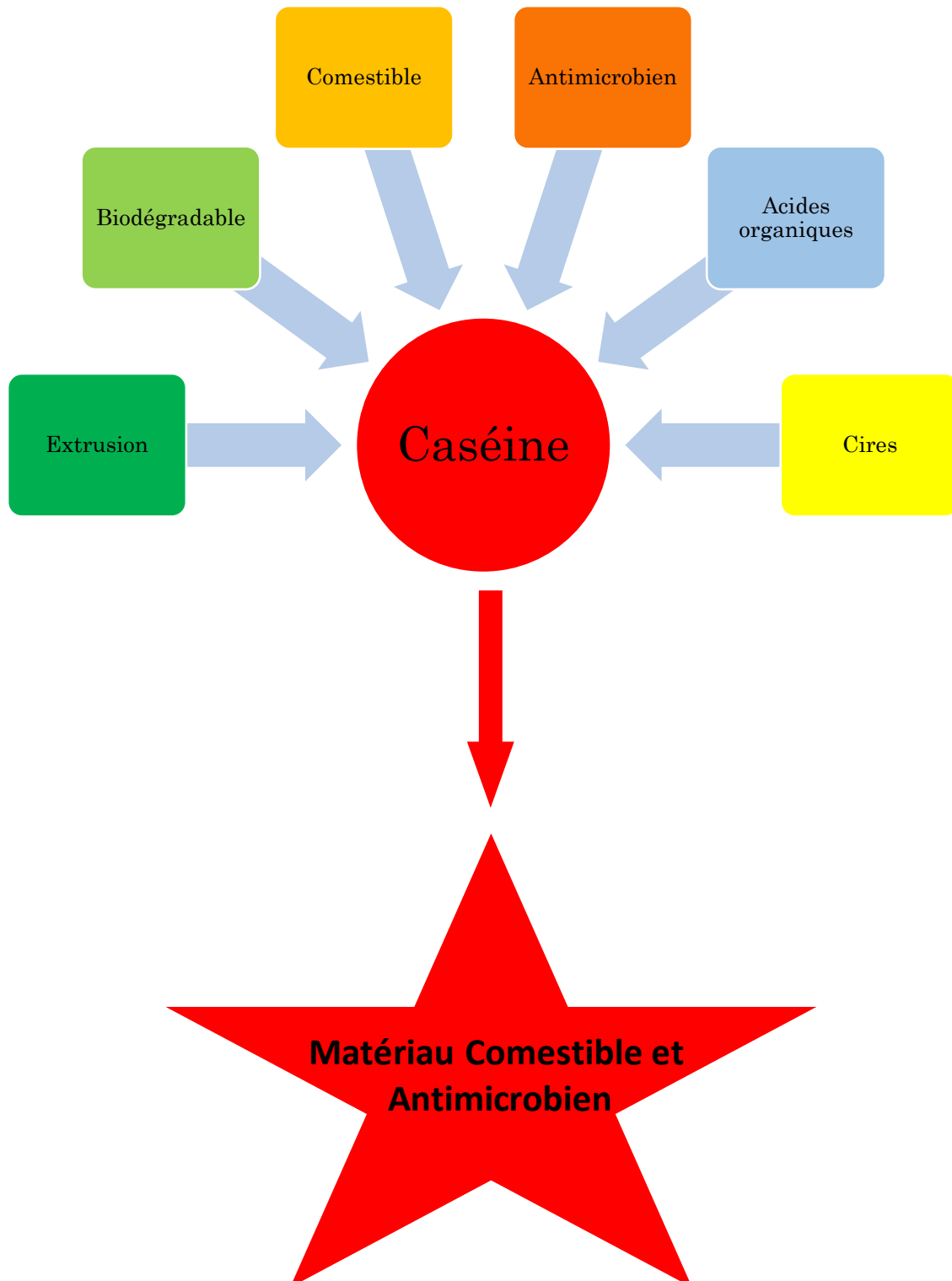
## Résumé :

Une triple attente socio-économique dans les domaines du **développement durable** (réduction des matières synthétiques non biodégradables), des **solutions naturelles de conservation des aliments** (tendance du « clean label » par la protection des denrées par des emballages actifs et intelligents évitant des additifs à outrance dans les aliments) et de la **sécurité alimentaire** (sécurité microbiologique et traçabilité) est à l'origine du développement de nouveaux matériaux à la fois **biodégradables, comestibles et fonctionnalisés**. Cette recherche commencée quelques décennies plus tôt est freinée par un mode de production difficilement industrialisable (**voie solvant**). Cependant, depuis quelques années des procédés applicables à l'échelle industrielle sont développées (**voie fondue/extrusion**).

Dans le travail présenté ici, la technologie d'extrusion baxis a été appliquée avec succès sur différentes matières premières protéiques : **la caséine acide, la caséine présure et le caséinate de sodium**. Extraites toutes trois du lait de vache, ces caséines montrent des caractéristiques différentes qui affectent les propriétés du matériau (**mécaniques, sensibilité aux molécules d'eau**). La fonctionnalisation de la matrice par l'ajout d'**acides organiques** offre un potentiel antimicrobien intéressant contre *Escherichia coli*. Une complexation supplémentaire du matériau par incorporation de molécules hydrophobes telles que des **cires (cires d'abeille, de candelilla et de carnauba)** permet d'élargir une fois de plus l'éventail des propriétés disponibles pour ces matériaux composites, comme l'amélioration de la propriété barrière à la vapeur d'eau apportée par la cire d'abeille. La sensibilité aux molécules d'eau de ce type de matériau étant un critère à considérer à chaque étape de développement et de compréhension des interactions inter-ingrédients (protéine, plastifiant, cires, composés antimicrobiens).

Ce manuscrit expose le potentiel de développement de matériaux à base de caséine, biodégradables, comestibles et antimicrobiens, qu'il s'agit d'appliquer en emballage agroalimentaire tout comme dans bien d'autres secteurs.

Mots clés :



## Abstract:

Development of innovative **biodegradable, edible and functionalized** material comes from a triple socio-economic expectation in the field of **sustainable development** (decrease in synthetic non-biodegradable polymers), of **natural solutions for food preservation** (trend of “clean label” by food protection through active and smart packaging to avoid over-use of food additives) and of **food safety** (microbiological safety and traceability). Development in that field, started few decades ago is slowed down by production process (**wet process**), which is not an easy scale up process. However, a few years ago industrial process technique as **extrusion** started developing.

In the present work, the twin-screw extrusion process was successfully applied to produce polymer based on protein raw material: **acid casein, rennet casein and sodium caseinate**. Extracted from cow milk, these three caseins own different characteristics, which affect material properties (**mechanical, water sensitive properties**). Matrix functionalization through **organic acid** addition bring an interesting antimicrobial response against *Escherichia coli*. Blending hydrophobic molecules as **waxes (beeswax, candelilla wax and carnauba wax)** creates a complex composite material which increases the range of available properties as improved water vapor barrier allowed by beeswax addition. Water sensitive properties are key points to consider at each step of material development and to understand relationships between the different ingredients (protein, plasticizer, waxes, antimicrobial agents).

This manuscript shows the feasibility in the development of casein based material as biodegradable, edible and antimicrobial material, to apply and use in the food packaging industry or other industries.

Keywords:

