



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN  
MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

DENIS BRAULT

FORMATION D'UN FILM BIODÉGRADABLE DE CASÉINATE DE  
CALCIUM OU DE SODIUM PAR IRRADIATION GAMMA

AOÛT 1994

Où le monde cesse d'être la scène de leurs  
espérances personnelles et de leurs désirs  
où nous faisons face tel que des hommes  
libres, admirant, demandant et observant;  
alors nous entrons dans le réalisme de  
l'Art et de la Science.

Albert Einstein

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	IX
SOMMAIRE.....	XII
1.0 INTRODUCTION.....	1
2.0 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
2.1 PROBLÉMATIQUE ENVIRONNEMENTALE .....	2
2.2 FORMATION DE POLYMÈRES BIODÉGRADABLES.....	4
2.2.1 Mécanismes de polymérisation et de stabilisation.....	4
2.2.2 Les films à base de polysaccharides.....	7
2.2.3 Les films à base de lipides et de cires.....	8
2.2.3.1 Les monoglycérides.....	8
2.2.3.2 Les cires naturelles.....	9
2.2.3.3 Les agents de surface.....	9
2.2.4 Les films protéiques.....	10
2.2.4.1 Les protéines du lactosérum.....	10
2.2.4.2 Les protéines de soja.....	11
2.2.4.3 Le gluten.....	12
2.2.4.4 La zéine.....	12
2.2.4.5 La caséine.....	13
2.2.5 Les films composites.....	14
2.2.6 Sélection de substrats pour la formation d'un film.....	16
2.3 LA CASÉINE ET LES CASÉINATES.....	17
2.4 LE PROCESSUS DE POLYMÉRISATION.....	18
2.4.1 Les mécanismes réactionnels.....	18
2.4.2 Interactions des acides aminés avec les radicaux libres.....	21
2.5 L'INFLUENCE D'AGENTS PLASTIFIANTS.....	24
2.5.1 Interaction protéine-polyalcool.....	25
2.5.2 Mécanisme d'action du glycérol.....	26
2.6 L'INFLUENCE DES TAMPONS .....	28

2.7	LA BIODÉGRADABILITÉ.....	29
2.7.1	Susceptibilité à la protéolyse.....	30
2.7.2	Biodégradation par <i>Pseudomonas</i> .....	31
2.8	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	32
3.0	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	36
3.1	PRÉPARATION DES SOLUTIONS PROTÉIQUES.....	36
3.2	IRRADIATION DES SOLUTIONS PROTÉIQUES.....	38
3.3	FORMATION DU FILM.....	39
3.4	PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES.....	42
3.4.1	La force de rupture et la déformation à la rupture.....	43
3.4.2	La viscoélasticité.....	43
3.5	DOSAGES PAR FLUOROMÉTRIE.....	46
3.5.1	Dosage de bityrosine.....	48
3.5.2	Dosage de tryptophane.....	48
3.6	VÉRIFICATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ.....	49
3.7	ANALYSES STATISTIQUES.....	51
4.0	RÉSULTATS.....	52
4.1	OBSERVATIONS ET ASPECTS VISUELS DES FILMS.....	52
4.2	COMPARAISON DES TROIS PROTÉINES.....	54
4.2.1	La force à la rupture.....	55
4.2.2	La déformation à la rupture.....	60
4.2.3	Taux de formation de bityrosine.....	64
4.2.4	Dosage de tryptophane.....	68
4.2.5	Sélection de la protéine.....	72
4.3	L'EFFET DU GLYCÉROL SUR LA CASÉINATE DE CALCIUM 73	
4.3.1	La force à la rupture.....	74
4.3.2	La déformation à la rupture.....	79
4.3.3	La viscoélasticité.....	84
4.3.4	Taux de formation de bityrosine.....	87
4.3.5	Dosage de tryptophane.....	92
4.4	LA BIODÉGRADABILITÉ.....	97
5.0	DISCUSSION.....	106
5.1	ANALYSE DES RÉSULTATS POUR LES TROIS ALANATES.....	106

5.2 INFLUENCE DU GLYCÉROL .....	109
5.2.1 Analyse des résultats avec 5,0% de protéines.....	109
5.2.2 Analyse des résultats avec 7,5% de protéines.....	111
5.2.3 Comparaison entre les deux concentrations de protéines.....	112
5.2.4 Dosage de tryptophane en présence de glycérol.....	115
5.3 LA BIODÉGRADABILITÉ .....	117
5.4 POURSUITE DE FUTURS TRAVAUX .....	118
6.0 CONCLUSION .....	121
REMERCIEMENTS .....	122
RÉFÉRENCES .....	124

## LISTE DES TABLEAUX

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

<u>Tableau 3.1:</u> Composition des trois caséiantes (alanates) utilisées dans ce travail de recherche.....	37
---	----

### **RÉSULTATS**

<u>Tableau 4.1:</u> Variation de l'épaisseur des films selon leur composition en protéines avec ou sans glycérol sur l'ensemble des doses d'irradiation. ....	54
---	----

<u>Tableau 4.2:</u> Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines. ....	57
--	----

<u>Tableau 4.3:</u> Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines. ....	58
--	----

<u>Tableau 4.4:</u> Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines. ....	61
---	----

<u>Tableau 4.5:</u> Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines. ....	62
---	----

<u>Tableau 4.6:</u> Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines. ....	66
--	----

**Tableau 4.7:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines. ....66

**Tableau 4.8:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines. ....69

**Tableau 4.9:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines. ....70

**Tableau 4.10:** Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P. ....76

**Tableau 4.11:** Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P. ....77

**Tableau 4.12:** Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P. ....81

**Tableau 4.13:** Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P. ....82

**Tableau 4.14:** Coefficients de relaxation en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....86

**Tableau 4.15:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P. ....89

**Tableau 4.16:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P. ....90

**Tableau 4.17:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P. ....94

**Tableau 4.18:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P. ....95

**Tableau 4.19:** Résultats des dénombrements de l'essai #1 de *Pseudomonas fragi* en présence et/ou en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et de 2,5% de glycérol, irradié à 20kGy. ....98

**Tableau 4.20:** Résultats des dénombrements de l'essai #2 de *Pseudomonas fragi* en présence et/ou en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et de 2,5% de glycérol, irradié à 20kGy. ....101

**Tableau 4.21:** Résultats des dénombrements de l'essai #3 de *Pseudomonas fragi* en présence et/ou en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et de 2,5% de glycérol, irradié à 20kGy. ....104

## LISTE DES FIGURES

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure 2.1: Radiolyse de l'eau et mécanisme réactionnel de l'électron solvaté avec le milieu. ....19
- Figure 2.2: Mécanisme réactionnel de l'électron solvaté et du radical  $\cdot\text{H}$  avec l'oxygène du milieu. ....20
- Figure 2.3: Mécanisme réactionnel et formation de la bityrosine. ....22

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Figure 3.1: Schéma du montage utilisé pour la fabrication des films. ....41
- Figure 3.2: Texturomètre Voland utilisé lors de l'expérimentation. ....44
- Figure 3.3: Courbe de relaxation et équation pour le calcul du coefficient de relaxation. ....45

### RÉSULTATS

- Figure 4.1: Rapport F/E (rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film) en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380; et ce, pour des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....59
- Figure 4.2: Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....63

**Figure 4.3:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....67

**Figure 4.4:** Oxydation du tryptophane en fonction de la dose d'irradiation. ....68

**Figure 4.5:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....71

**Figure 4.6:** Rapport F/E (rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film) en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....78

**Figure 4.7:** Déformation en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....83

**Figure 4.8:** La viscoélasticité en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....87

**Figure 4.9:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....91

**Figure 4.10:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. ....96

**Figure 4.11:** Essai #1 de la croissance de *Pseudomonas fragi* en présence et en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy. ....99

**Figure 4.12:** Essai #2 de la croissance de *Pseudomonas fragi* en présence et en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy.....102

**Figure 4.13:** Essai #3 de la croissance de *Pseudomonas fragi* en présence et en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy. ....105

## SOMMAIRE

L'emballage et même le suremballage des produits de consommation est une pratique courante dans les pays industrialisés. Comme ces emballages sont formés essentiellement de polymères non-biodégradables, ils causent actuellement des problèmes environnementaux. Ces problèmes environnementaux sont retrouvés non seulement dans les pays industrialisés mais aussi dans les pays en voie de développement. Cette situation a favorisé le développement de différents films, plus écologiques, à partir d'éléments biodégradables à base de polysaccharides, de protéines et/ou de lipides.

Dans cette étude, nous proposons d'examiner la possibilité de mettre au point un film protéique biodégradable formé à partir d'un sel de la caséine. D'origine laitière, la caséine est abondante et pourrait même être récupérée des laits invendus. Le processus de polymérisation est induit par irradiation gamma. En effet, l'interaction de radicaux hydroxyl avec les tyrosines présentes dans la protéine crée une liaison covalente (bityrosine). L'ajout d'agent plastifiant (glycérol) est indispensable afin de produire un film plus souple et moins friable. La présence de glycérol n'inhibe pas la formation de bityrosine. Elle protège la protéine de la dénaturation causée par l'irradiation, augmente le pouvoir déformant et diminue la résistance à la rupture du film.

Les essais de biodégradabilité, conduits dans nos laboratoires, ont démontré que le film produit par irradiation gamma est accessible aux attaques enzymatiques de *Pseudomonas fragi*.

## 1.0 INTRODUCTION

Les matériaux de plastique sont très présents dans notre environnement. On les retrouve un peu partout et ils ont considérablement contribué à améliorer le bien-être de l'homme. Les raisons justifiant leurs utilisations industrielles et domestiques sont que les plastiques constituent des matériaux légers, résistants, chimiquement inertes et économiques à produire.

L'étendue et l'utilité que procurent les matériaux de plastique sont quasi incalculables. Malgré leurs bienfaits, ils causent aujourd'hui un grave problème de pollution environnementale, qu'on ne peut plus se permettre d'ignorer. Le recyclage ou la réutilisation de certains composés de plastique n'améliorent que partiellement la situation; d'où l'intérêt de développer des films partiellement ou entièrement biodégradables.

Ce travail de recherche s'est orienté vers la production d'un film protéique. Par la suite, une évaluation de certaines propriétés inhérentes de ce film a été étudié et finalement, une vérification de sa biodégradabilité a été observée.

## **2.0 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

La présente section de ce travail portera sur les principes fondamentaux du processus de polymérisation et sur les procédures d'évaluation de la biodégradabilité d'un film. En premier lieu, une revue justifiant le choix de la protéine sera effectuée. La polymérisation sera développée de même que la biodégradabilité. Enfin, l'hypothèse et les objectifs de ce projet de recherche seront présentés.

### **2.1 PROBLÉMATIQUE ENVIRONNEMENTALE**

Présentement, les consommateurs exigent une plus grande qualité et une prolongation de la durée de conservation de leurs produits alimentaires. Parallèlement, ils demandent une réduction de la quantité des matériaux d'emballages utilisés. Ces exigences ont contribué à faire croître l'intérêt de la recherche sur les emballages comestibles, c'est-à-dire mangeable par l'homme. Les films comestibles fournissent des solutions potentielles aux problèmes de barrière à l'eau, à l'oxygène (O<sub>2</sub>), au dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et à la flore bactérienne totale.

Le plastique représente l'une des principales composantes utilisées pour l'emballage de nos produits de consommation. En 1992, selon le plan vert du Canada, les emballages représentaient environ 30% des déchets solides des municipalités canadiennes. Comme les

emballages et autres plastiques sont fondamentalement résistants aux attaques des bactéries présentes dans la nature, l'enfouissement souterrain et le déversement dans les océans ne sont plus des méthodes écologiquement acceptables pour se débarrasser de nos déchets de plastique. Alors, on doit s'orienter vers le recyclage, l'incinération, le compostage et la biodégradation. Suite à la sensibilisation des autorités fédérales face à ce problème, un protocole national sur l'emballage a été signé en avril 1990 qui vise à réduire de 50% les déchets provenant des emballages d'ici l'an 2000 (Ministère d'approvisionnement et services Canada).

Depuis quelques années, la population est davantage sensibilisée aux problèmes de pollution par les plastiques. Ceci a permis de développer des films de plastique à base d'amidon qui sont actuellement sur le marché (Gage, 1990). La présence d'amidon contribue à faciliter l'attaque microbienne via les systèmes enzymatiques. Le résultat ultime recherché par l'ajout d'amidon est la perte de l'intégrité structurelle qui se traduit par une diminution du poids moléculaire des films de plastique.

Présentement, une recherche active se poursuit afin de produire un film biodégradable qui ne serait pas dommageable pour la nature et qui posséderait les caractéristiques des emballages de plastique. Alors, on doit s'orienter vers un composé qui serait initialement biodégradable, qui offrirait une résistance à la dénaturation

thermique et qui démontrerait certaines propriétés des emballages de plastique.

## **2.2 FORMATION DE POLYMERES BIODÉGRADABLES**

La majorité des films considérés biodégradables sont formés simplement par la solubilisation de composantes dégradables dans un solvant approprié. Jusqu'à maintenant, des recherches ont été entreprises sur les films à base de polysaccharides, de protéines et de lipides seuls ou en combinaison. Habituellement, les films alimentaires sont formés à partir de polymères de haut poids moléculaire afin de fournir une matrice suffisamment résistante et adhérente. Les particularités de la matrice dépendront de la structure chimique du polymère, de la présence d'agents plastifiants et de la façon dont le film est appliqué sur la surface des produits. L'application des films d'enrobage à la surface des produits se fait par trempage, pulvérisation ou extrusion. Les principales propriétés recherchées chez les films d'emballage sont la résistance incluant la déformation, les propriétés de barrières aux gaz et à l'humidité et les possibilités de conditionnement.

### **2.2.1 Mécanismes de polymérisation et de stabilisation**

Un polymère est obtenu par la polymérisation d'un monomère afin de former des chaînes polymériques continues et/ou ramifiées. Dans le cas des composantes de plastique, cette polymérisation est

généralement réalisée soit par la chaleur (thermoplastique) comme pour le poly-iminocarbonate (Li et Kohn, 1989), soit par une composante photosensible aux rayonnements ultra-violets comme pour la formation de l'acrylique et du méthacrylique (Ciardelli *et al.*, 1989). Il est également possible d'obtenir du polyuréthane par irradiation gamma (Shintani et Nakamura, 1991). À plus de 25kGy, l'effet de l'irradiation sur le polymère se limite principalement à la polymérisation intermoléculaire avec peu ou pas de dégradation. La polymérisation protéique peut être également réalisée par des procédés enzymatiques. En effet, des polymères de collagène (Ricard-Blum et Ville, 1988), de caséine- $\alpha_{s1}$  (Motoki *et al.*, 1987) et de fibrine (Kasai *et al.*, 1983) ont été obtenus de cette façon.

La force de cohésion d'un film est reliée à sa structure polymérique et chimique, à la nature du solvant utilisé, à la présence d'agents plastifiants ou d'additifs et aux conditions environnantes durant la formation du film (Kester et Fennema, 1986).

Une relation directe existe entre la cohésion du film et la longueur et la polarité des chaînes du polymère. Une distribution uniforme des groupements polaires le long des chaînes polymériques accroît la cohésion en augmentant la probabilité d'interactions ioniques et de pontages hydrogènes entre les chaînes (Banker, 1966). Généralement, lorsqu'on accroît la structure cohésive d'un film, une baisse de sa flexibilité, de sa porosité et de sa perméabilité au gaz, à la vapeur et aux solutés est observée (Kester et Fennema, 1986). Par

exemple, la stabilité de la structure tertiaire d'une protéine affecte la formation d'un film et les propriétés résultantes du film c'est-à-dire que la flexibilité moléculaire contribue à la formation de films cohésifs (Graham et Phillips, 1980).

Les solvants utilisés pour la formation de films comestibles se limitent à l'eau, l'éthanol ou une combinaison des deux (Kester et Fennema, 1986). Des essais avec de l'ammoniac et de l'acide acétique ont été réalisés mais un problème d'odeur limite leur utilisation. Après son évaporation, l'ammoniac démontre une odeur persistante très marquée sur le produit final (Gontard *et al.*, 1992).

Les agents plastifiants sont habituellement regroupés dans la famille des polyols comme le glycérol, sucrose et autres. Ils peuvent être introduits afin de donner de la flexibilité aux films donc d'améliorer leurs propriétés mécaniques. Le caractère plastifiant est obtenu par une réduction des forces intermoléculaires atténuant ainsi la structure du film et augmentant la mobilité des chaînes du polymère. Toutefois, le relâchement de la structure du film réduit l'habilité du film à agir comme barrière à la diffusion de plusieurs gaz et vapeurs (Gennadios et Weller, 1990; Peyron, 1991).

Les conditions environnementales influencent la cohésion du film. Des températures excessives lors de la période de séchage se traduisent par une évaporation prématurée du solvant. Ces conditions peuvent immobiliser prématurément les chaînes polymériques avant

qu'elles puissent avoir l'opportunité de se regrouper pour former un film continu et cohérent (Banker, 1966). Ceci peut engendrer certains défauts comme des micro-perforations ou une épaisseur non-uniforme qui vont inévitablement accroître la perméabilité du film.

### **2.2.2 Les films à base de polysaccharides**

Une grande diversité de polysaccharides ont été évalués expérimentalement pour leur capacité à former des films. Entre autres, on pense à l'alginate, à la pectine, aux carraghénanes, à l'amidon et aux dérivés cellulosiques. Les polymères de polysaccharides démontrent une excellente imperméabilité à l'O<sub>2</sub>, cependant ils offrent une barrière minimale à l'humidité dû à leur caractère hydrophile. Seuls les films à base de dérivés cellulosiques, présentent une imperméabilité remarquable à l'eau (Kanig et Goodman, 1962; Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991). Le principal inconvénient des polymères à base de polysaccharides est qu'ils démontrent une barrière très limitée aux microorganismes (Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991; Torres et Karel, 1985). Des essais effectués avec du boeuf haché enrobé ont démontré une protection efficace contre l'oxydation mais aucune barrière contre la flore bactérienne de surface (Peyron, 1991).

### **2.2.3 Les films à base de lipides et de cires**

Les films à base de lipides offrent une excellente imperméabilité à l'humidité à cause de leur faible polarité (Feuge, 1955, Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991).

Jusqu'à ce jour, une grande diversité de lipides ont été utilisés pour la confection de films comprenant les monoglycérides, les cires naturelles et les agents de surface.

#### **2.2.3.1 Les monoglycérides**

Une caractéristique des monoglycérides à l'état solide est leur propriété élastique. La majorité des lipides de ce type peuvent s'étendre jusqu'à 120% de leur longueur initiale avant cassure alors que le monostéarate de glycérol acétylé peut s'étendre jusqu'à 800% de sa longueur initiale avant cassure (Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991). C'est donc un produit qui peut s'étirer facilement et qui démontre une résistance face aux contraintes mécaniques. Ces particularités sont intéressantes pour la formation de films d'enrobage.

La perméabilité à la vapeur d'eau des films produits à l'aide de monoglycérides acétylés est grandement inférieure aux films à base de polysaccharides mais elle est quand même supérieure à celle à base de dérivés cellulosiques (Kanig et Goodman, 1962). La résistance

des monoglycérides acétylés au transport de l'humidité est très dépendante du gradient de pression de vapeur d'eau de chaque côté du film (Lovergren et Feuge, 1954). L'enrobage par les films d'acétoglycérides a permis de démontrer que ceux-ci apportaient une certaine protection contre la contamination microbienne de surface (Peyron, 1991)

### **2.2.3.2 Les cires naturelles**

Les cires naturelles sont plus résistantes au transport de l'humidité que tous autres films lipidiques ou non-lipidiques. Par contre, les cires n'adhèrent pas très bien aux surfaces très humides dues à leur caractère très hydrophobe (Kester et Fennema, 1986). Afin d'éviter tout processus de dégradation anaérobie lors de l'enrobage d'un aliment, il est parfois préférable d'ajouter des monoglycérides acétylés aux cires afin d'y apporter de la flexibilité et diminuer ainsi la résistance à la perméabilité de l'eau et des gaz (Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991).

### **2.2.3.3 Les agents de surface**

Les agents de surface ou les lipides tensioactifs réduisent l'activité de l'eau ( $a_w$  qui représente l'eau disponible) à la surface d'un produit alimentaire. Ils ont la propriété de réduire le taux de perte d'humidité au cours de l'entreposage. L' $a_w$  influence les mécanismes de détérioration des produits alimentaires. Un faible  $a_w$  retarde la

croissance microbienne de même que les réactions chimiques et enzymatiques de surface (Kester et Fennema, 1986). Alors, l'enrobage d'aliments avec un agent de surface devrait contribuer à modifier ces modes de détériorations en contrôlant la migration de l'eau à la surface des aliments.

La propriété de réduire l'évaporation est influencée par la structure de l'agent de surface utilisé. Les agents de surface les plus efficaces sont ceux qui possèdent une chaîne de 16 à 18 carbones. La présence d'une double liaison dans la chaîne de carbone diminue fortement les propriétés d'imperméabilisation de l'enrobage (Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991).

#### **2.2.4 Les films protéiques**

Les films protéiques offrent de meilleures propriétés mécaniques mais leurs perméabilités aux gaz et à l'humidité sont variables. Un traitement acide (vers le point isoélectrique) améliore la résistance au transport de l'humidité car ce traitement diminue la mobilité des chaînes de polymères (Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991).

##### **2.2.4.1 Les protéines du lactosérum**

Le lactosérum ( $\alpha$ -lactalbumine et  $\beta$ -lactoglobuline principalement) ou protéines du petit-lait, forme un gel

thermoirréversible, pH dépendant et sensible à la chaleur (Schmidt et Morris, 1984; Vuilleumard *et al.*, 1989). À titre d'exemple, le chauffage des protéines du lactosérum à des températures entre 70 et 85°C et à une concentration supérieure à 5%, forme un gel thermoirréversible. Ce gel se développe par la formation de nouvelles liaisons disulfures intermoléculaires (Vuilleumard *et al.*, 1989). Le processus de gélification des protéines du lactosérum est fortement influencé par le pH du milieu pendant la période de chauffage car un  $\text{pH} \geq 6,5$  diminue les interactions intermoléculaires (Schmidt et Morris, 1984; Xiong, 1992). Des forces ioniques élevées semblent accroître la stabilité protéique probablement par une augmentation du pouvoir d'hydratation (solubilité) des protéines (Xiong, 1992).

#### **2.2.4.2 Les protéines de soja**

Les protéines de soja forment essentiellement un hydrogel et sont très susceptibles à la dénaturation (Schmidt et Morris, 1984). Ces protéines sont composées de 4 sous-unités(2S, 7S, 11S et 15S), de poids moléculaires élevés (300 000 à 600 000) et possèdent des structures quaternaires forts complexes (Delisle, 1984). Généralement, la gélification des protéines de soja est un phénomène induit thermiquement par la préparation d'une solution contenant une concentration d'au moins 7% de protéines et à des températures de 100°C ou plus. Des problèmes techniques ont limité l'utilisation des protéines de soja à des applications de produits laitiers comme le "tofu" et différents fromages (Schmidt et Morris, 1984).

### **2.2.4.3 Le gluten**

Les protéines du gluten, soit la gliadine et la gluténine, originent de la farine de blé. La gliadine est essentiellement hydrophobe et visqueuse alors que la gluténine est hydrophile et élastique. Les caractères élastiques et cohésifs du gluten sont dus, en grande partie, à la présence de ponts disulfures (Gennadios et Weller, 1990). La concentration de gluten de même que le pH des solutions protéiques sont les principaux facteurs affectant les propriétés mécaniques des films de gluten. Alors que le pH et la concentration en éthanol affectent l'opacité, la solubilité et la perméabilité des films à la vapeur d'eau (Gontard *et al.*, 1992). Les films à base de gluten demeurent une voie très prometteuse mais la perméabilité à l'eau limite actuellement son exploitation (Gennadios et Weller, 1990; Gontard *et al.*, 1992).

### **2.2.4.4 La zéine**

La zéine est une protéine isolée du maïs. Elle est soluble dans l'éthanol. Elle forme des films avec de très bonnes propriétés de barrière à la vapeur d'eau mais son étude demeure encore limitée (Kanig et Goodman, 1962; Kester et Fennema, 1986).

#### 2.2.4.5 La caséine

La caséine bovine est une protéine abondante, économique et facilement accessible. La caséine seule représente approximativement 80% des protéines totales du lait de vache (Schmidt et Morris, 1984). Elle peut être isolée du lait écrémé soit par acidification à l'acide minéral, soit par acidification par des cultures bactériennes mixtes (Vuillemand *et al.*, 1989). Le coût d'achat de 454g de caséine entière ou de caséiate se chiffre à moins de 4 dollars (février 93, New Zealand Milk Products, Inc., CA, USA).

C'est une phosphoprotéine à caractère amphiphile qui se lie fortement aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (Schmidt et Morris, 1984; Vuillemand *et al.*, 1989). Dû à leur caractère hydrophile, les films de caséine ne produisent pas une barrière efficace à l'humidité. Par contre, elle peut agir comme agent émulsifiant et créer une émulsion caséine-lipide stable (Avena-Bustillos et Krochta, 1993). Les propriétés de barrières aux gaz et à l'humidité des films à base de caséine peuvent être améliorées par la polymérisation de la protéine avec du calcium ( $\text{Ca}^{+2}$ ) mais aussi en ajustant le pH du milieu au point isoélectrique de la caséine. L'ajustement au point isoélectrique optimise les interactions protéines-protéines, modifie la configuration moléculaire et influencerait les propriétés de transfert de masse (Krochta, 1991 et Avena-Bustillos et Krochta, 1993).

Les protéines laitières, incluant la caséine, demeurent un choix prometteur pour la formation éventuelle de films comestibles afin de répondre aux revendications des environnementalistes sur les emballages (McHugh et Krochta, 1994).

### **2.2.5 Les films composites**

Les films comestibles peuvent être de nature hétérogène c'est-à-dire formés à partir d'un mélange de polysaccharides, de protéines et/ou de lipides. Cette approche permet l'exploitation avantageuse des caractéristiques fonctionnelles de chacune des composantes du film. La préparation de films composites impose une émulsification du matériel lipidique dans une phase aqueuse. Par contre, la technique de préparation de films hydrophobes va influencer ses propriétés de barrière. Un film formé à partir d'une répartition dispersée du matériel hydrophobe offre de faibles propriétés de barrière à la vapeur d'eau, comparativement aux films avec une couche continue (Martin-Polo *et al.*, 1992). Une répartition dispersée est due à la différence de polarité entre le support (exemple: méthylcellulose) et le matériel hydrophobe (technique d'émulsion).

Parfois, une période de chauffage est nécessaire afin de liquéfier les cires ou les lipides utilisés. Ceci peut créer une dénaturation thermique, des modifications structurelles des autres composantes (polysaccharides ou protéines) et selon le cas, l'évaporation d'une partie du solvant (Kester et Fennema, 1986;

Peyron, 1991). Le pH du milieu peut fortement influencer la solubilité d'une ou des composantes du film de même que leur concentration. Alors, le choix des composantes, leurs concentrations et les conditions du milieu sont cruciaux pour la formation du film.

Un exemple de film composite est celui développé par Kamper et Fennema (1984a et b). Leur film est composé d'esther cellulosique et d'un mélange d'acide gras (acides palmitique et stéarique). Le film démontre une perméabilité à la vapeur d'eau comparable aux films non-comestibles de polychlorures de vinyl (PCV) et de polyéthylènes à basse densité (PEBD).

Les films composites protéines-lipides développés par Sian et Ishak (1990) à partir de lait de fève de soja démontrent une dépendance des films au pH du milieu. Les films préparés à pH basique contiennent une plus grande proportion de protéines, de minéraux, d'hydrates de carbone et d'eau et moins de matières grasses que ceux formés à pH acide. Un pH basique cause une augmentation de la capacité émulsifiante des protéines qui tend à disperser les globules de gras dans le lait. Ainsi, les films produits à pH basique, incorporeront moins de matières grasses. À pH acide (inférieur à la région isoélectrique), le contenu en humidité des films est très faible car l'acidification favorise la précipitation des protéines et forme des complexes insolubles (Sian et Ishak, 1990).

Afin de répondre au besoin de réduire les déchets d'emballages, des recherches se poursuivent sur la formation de films de plastique en présence d'amidon. Ce sont des films composites mais non-comestibles. L'ajout d'amidon dans les films de polyéthylène tend à produire une structure poreuse. Comme les liaisons covalentes entre l'amidon et le polyéthylène ne sont pas véritablement formées durant le conditionnement, l'incorporation d'amidon produit des discontinuités dans la matrice du film (Lim *et al.*, 1992). Les petites particules d'amidon produisent moins de discontinuités sévères dans la matrice que les grosses particules.

La présence d'amidon n'est certes pas sans effet sur les propriétés mécaniques des films de polyéthylène. À mesure que le contenu en amidon augmente, la force à l'étirement, le pourcentage d'élongation et la transmission de la lumière diminuent, alors que l'épaisseur du film augmente. La perte des propriétés élastiques est moindre avec de petites particules d'amidon que des grosses (Lim *et al.* 1992).

#### **2.2.6 Sélection de substrats pour la formation d'un film**

Selon les différentes études effectuées jusqu'à présent sur les films comestibles, il semble que les protéines laitières possèdent de bonnes propriétés pour la formation d'un film. Les sels de caséines semblent être un choix judicieux en raison de leur plus grande

solubilité que la caséine native. Une quantité minimale de protéines est nécessaire afin d'obtenir un film qui soit maniable tout en possédant une résistance et une déformation adéquate. Cette source de protéines est de plus, très accessible et peu coûteuse. En raison de ces considérations, nous avons arrêté notre choix sur un extrait de caséinate de calcium pour la formation d'un film protéique.

### **2.3 LA CASÉINE ET LES CASÉINATES**

La caséine bovine se compose de quatre complexes protéiques majeures, soient l' $\alpha_{s1}$  et 2, la  $\beta$  et la  $\kappa$ -caséine. Globalement, une molécule de caséines est constituée d'un noyau essentiellement hydrophobe composé d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -caséine et entouré de  $\kappa$ -caséine en surface (Schmidt et Morris, 1984). La stabilité des micelles est assurée par les  $\kappa$ -caséines et phosphates de calcium colloïdaux retrouvés en périphérie (Schmidt et Morris, 1984). La caséine contient beaucoup de proline distribuée uniformément. Cela lui confère une structure ouverte limitant ainsi la formation d'hélices alpha et de feuillets bêta (Modler, 1985). Cette conformation ouverte démontre une certaine résistance à la dénaturation thermique et offre un accès facile aux attaques enzymatiques (Schmidt et Morris, 1984; Vuillemand *et al.*, 1989, McHugh et Krochta, 1994).

Les caséinates sont obtenues soit par l'acidification à l'acide minéral (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), soit par l'acidification par des cultures mixtes composées de *Streptococcus* sous espèce *lactis* et/ou

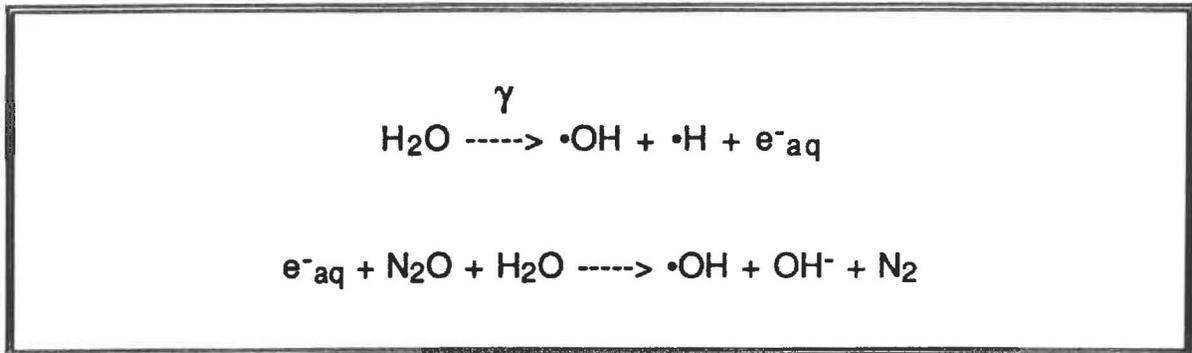
*cremoris*, au point isoélectrique de la caséine (pH de 4,6). La neutralisation des précipités insolubles de caséines acides ou lactiques par des alcalis permet la resolubilisation en sel de sodium, de calcium, de potassium, de magnésium ou d'ammonium (Schmidt et Morris, 1984; Vuilleumard *et al.*, 1989 ; McHugh et Krochta, 1994). Les caséinates solubilisées sont par la suite déshydratées. Les sels de caséines ainsi obtenus sont solubles à des pH supérieurs à 5,5.

## **2.4 LE PROCESSUS DE POLYMÉRISATION**

La polymérisation d'une solution protéique est possible par l'intermédiaire de radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ). Ces radicaux sont formés par la radiolyse de l'eau, induite par la radiation gamma du  $\text{Co}^{60}$  (Fricke et Hart, 1966).

### **2.4.1 Les mécanismes réactionnels**

L'irradiation d'une solution protéique au  $\text{Co}^{60}$  en présence de protoxyde d'azote (100%  $\text{N}_2\text{O}$ ), produit majoritairement plus de radicaux  $\cdot\text{OH}$  grâce à l'interaction de l'électron solvaté avec une molécule de  $\text{N}_2\text{O}$  (voir figure 2.1).



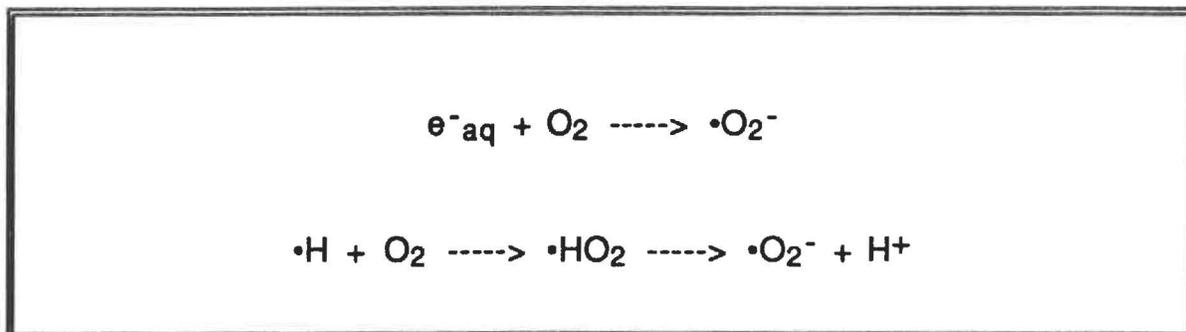
**Figure 2.1:** Radiolyse de l'eau et mécanisme réactionnel de l'électron solvaté avec le milieu (Fricke et Hart, 1966; Adams *et al.*, 1971).

L'irradiation sous 100% de N<sub>2</sub>O produit environ 8% de radical hydrogène ( $\cdot\text{H}$ ) (Adams *et al.*, 1971; Singh et Singh, 1983; Singh et Vadasz, 1983). Or, l'irradiation d'une solution d'albumine sérique bovine (ASB) sous une atmosphère de 100% N<sub>2</sub>O ou sous 100% de N<sub>2</sub> et en présence d'absorbeur radicalaire (par exemple: alcool t-butylique, mannitol, acide urique) a démontré que le radical  $\cdot\text{H}$  n'est pas impliqué dans la formation de liaisons covalentes ou dans le processus de fragmentation (Davies *et al.*, 1987a).

Le N<sub>2</sub>O est un gaz très stable et généralement inerte à la température de la pièce. Sa dissociation commence à plus de 300 degrés Celsius et devient alors un puissant agent oxydant (Merck & Co., Inc., 1960).

L'irradiation en présence d'oxygène (O<sub>2</sub>) produit des ions radicalaires superoxydes ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) soit par l'interaction directe de  $\text{e}^-_{\text{aq}}$

avec une molécule d'O<sub>2</sub>, soit par l'interaction indirecte d'un radical •H et d'une molécule O<sub>2</sub> (voir figure 2.2).



**Figure 2.2:** Mécanisme réactionnel de l'électron solvaté et du radical •H avec l'oxygène du milieu (Fricke et Hart, 1966; Ferradini et Pucheault 1983; Fridovich, 1983).

À pH neutre, le radical hydrodioxyle (•HO<sub>2</sub>) est rapidement déprotoné (pK<sub>a</sub> 4,8) pour former encore plus de radicaux superoxydes (Ferradini et Pucheault, 1983 et Fridovich, 1983).

L'exposition aux radicaux •OH seuls induit une polymérisation avec peu ou pas de fragmentation, alors que l'exposition simultanée aux radicaux •OH + •O<sub>2</sub><sup>-</sup> (+ O<sub>2</sub>) induit, à la fois, une polymérisation et une fragmentation. L'exposition à l'ion radicalaire •O<sub>2</sub><sup>-</sup> seul, n'a aucun effet sur le poids moléculaire (Davies, 1987). Dans un processus de polymérisation, on désire la création de liaisons covalentes et éviter la fragmentation. Alors, l'utilisation unique de radicaux •OH est essentielle pour la formation d'un polymère. Donc, l'irradiation sous atmosphère saturée en N<sub>2</sub>O est primordiale.

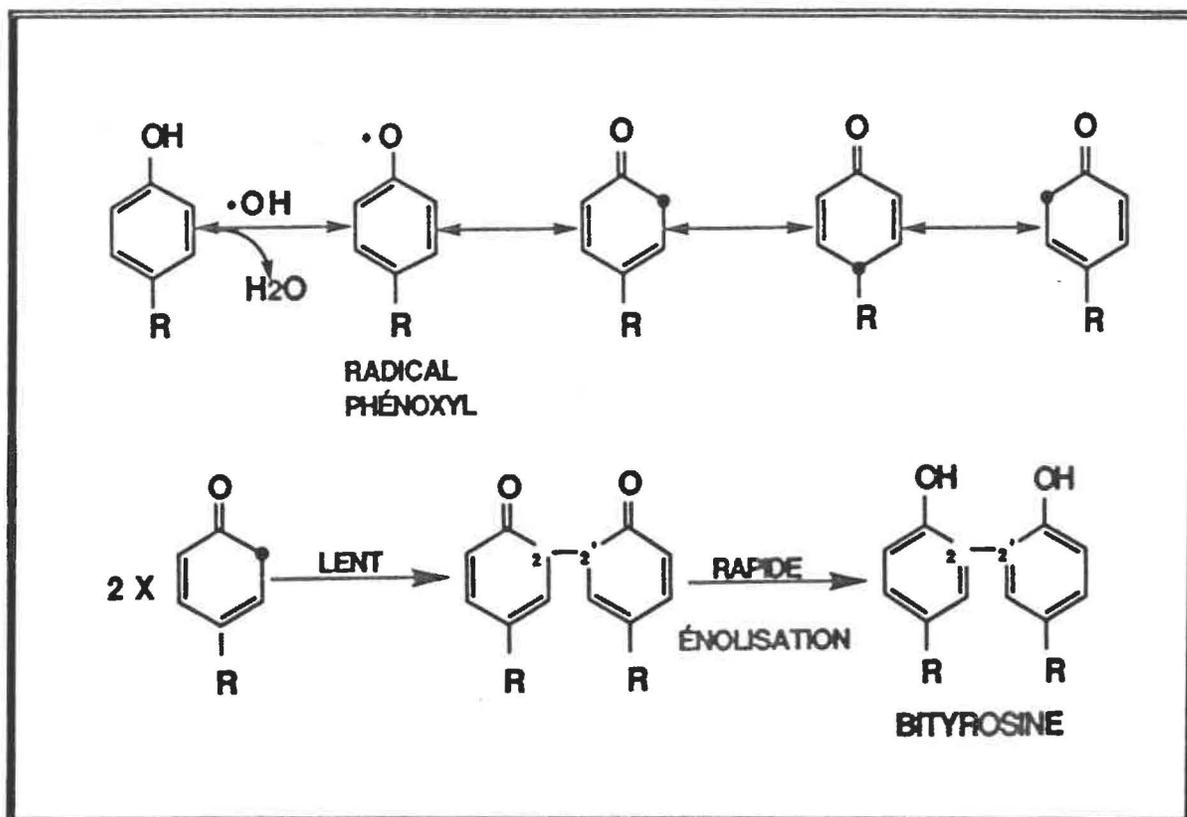
### 2.4.2 Interactions des acides aminés avec les radicaux libres

Certains acides aminés sont plus susceptibles que d'autres à interagir avec les radicaux  $\cdot\text{OH}$ . C'est le cas des molécules de cystéines, d'histidines, de tryptophanes et de tyrosines (Delincée, 1983; Yamamoto, 1977). Les molécules de tyrosines peuvent être formées par l'ajout d'un groupement hydroxyl (OH) sur une molécule de phénylalanine au cours du traitement d'irradiation. Tous les résidus d'acides aminés peuvent interagir avec les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et devenir eux-même des radicaux. Toutefois, dans la majorité des cas, les radicaux d'acides aminés décroissent (perdent leur état radicalaire) sans même avoir interagis avec le milieu (Davies *et al.*, 1987a).

L'exposition de protéines aux radicaux  $\cdot\text{OH}$  sous atmosphère de  $\text{N}_2\text{O}$ , produit, à la fois, la formation d'une nouvelle liaison et une perte de résidus de tryptophane (Davies *et al.*, 1987a). Par ailleurs, cette nouvelle liaison, soit la bityrosine, est de nature covalente et se forme entre deux résidus de tyrosine.

Le radical tyrosyl est formé par la soustraction d'un atome d'hydrogène sur la fonction hydroxyl du résidu tyrosine par le radical  $\cdot\text{OH}$  (voir figure 2.3). Le radical tyrosyl ainsi formé peut réagir avec un autre radical tyrosyl ou avec une molécule de tyrosine, pour former un composé biphenolique stable. Un effet ortho-orienteur est impliqué

dans la formation de nouvelles liaisons biphenoliques, la forme 2,2'-biphénol apparaît comme la principale liaison produite (Prutz, 1983).



**Figure 2.3:** Mécanisme réactionnel et formation de la bityrosine (Prutz, 1983).

Il est ainsi facile de constater que le couplage en position para (4 ou 4') des tyrosyls démontre un encombrement stérique par le résidu R. Alors l'énolisation des quinones, principalement formé dans la réaction de couplage, est limitée quand la position 4 ou 4' est impliquée. La forme phénoxy-phénol 0-2' est à l'état de trace alors que la forme peroxyde (0,0') n'est pas retrouvée (Prutz, 1983).

La formation de bityrosine est davantage une liaison intermoléculaire qu'intramoléculaire et elle représente un important facteur dans le processus de polymérisation des protéines traitées aux radicaux  $\cdot\text{OH}$  (Davies, 1987).

Près de 90% de la polymérisation protéique induite par le radical  $\cdot\text{OH}$  est attribuable à la formation de nouvelles liaisons covalentes intermoléculaires autres que les ponts disulfures. Le 10% restant, représente l'agrégation générée par les interactions non-covalentes et les ponts disulfures (Davies, 1987).

La perte de tryptophane par l'irradiation d'une solution protéique est une conséquence directe. Des études menées en présence d'inhibiteurs radicalaires (mannitol, alcool t-butylique avec ou sans la présence d'azote) ont démontré que le radical  $\cdot\text{OH}$  est le principal agent responsable de la destruction de résidus de tryptophane sous irradiation en présence de  $\text{N}_2\text{O}$  (100%) (Davies *et al.*, 1987a). Les radicaux  $\cdot\text{H}$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$  et  $e^-_{\text{aq}}$  ne sont pas impliqués directement dans un mécanisme de dégradation avec un résidu de tryptophane (Davies *et al.*, 1987a). Le radical  $\cdot\text{O}_2^-$  et l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) peuvent interagir sur les produits initialement transformés par le radical  $\cdot\text{OH}$  résultant ainsi d'un effet d'amplification sur les dommages protéiques, c'est-à-dire, la perte de tryptophane et l'inhibition de la formation de bityrosine (Davies *et al.*, 1987a).

Les phénomènes de polymérisation induit par le radical  $\cdot\text{OH}$  et la fragmentation induite par les radicaux  $\cdot\text{OH} + \cdot\text{O}_2^- (+ \text{O}_2)$  ont été retrouvés sur 16 protéines différentes (Davies, 1987). Les modifications de la structure primaire comme la perte de tryptophane et la formation de bityrosine sont également observées sur ces 16 même protéines (Davies, 1987; Davies *et al.*, 1987a). Alors, il est probable que les effets des radicaux oxygénés sur les structures secondaires et tertiaires observées sur une protéine modèle comme l'ASB, puissent se généraliser à l'ensemble des protéines (Davies et Delsignore, 1987).

## **2.5 L'INFLUENCE D'AGENTS PLASTIFIANTS**

L'ajout d'un polyalcool (sucres ou glycérol) dans un milieu protéique, améliore la stabilité de la protéine et agit comme agent plastifiant lorsqu'il est présent dans un polymère protéique (Lee et Timasheff, 1981). Cet agent plastifiant est introduit à la structure du polymère et peut s'y associer afin de réduire la cohésion dans la structure pour l'étendre, la relâcher et l'adoucir changeant ainsi les propriétés physico-chimiques du polymère (Banker, 1966). Le polyalcool va favoriser l'état natif ou replié de la protéine globulaire plutôt qu'un état dénaturé. Ces molécules génèrent des forces cohésives responsables de l'accroissement des forces de tension sur l'interface d'hydratation de la protéine (Arakawa et Timasheff, 1982; Gekko et Morikawa, 1981).

Certains polyalcools peuvent agir comme des absorbeurs de radicaux  $\bullet\text{OH}$  donc inhiber le processus de polymérisation.

Davies *et al.* (1987a) ont démontré que les modifications de la séquence primaire en acides aminés de l'ASB, sont inhibées à plus de 90% par l'ajout de 1 mM de mannitol (polyalcool) durant l'exposition aux radicaux  $\bullet\text{OH}$  ou  $\bullet\text{OH} + \text{O}_2^-$  ( $+\text{O}_2$ ). Un phénomène similaire est observé lors de l'irradiation de la caséine en présence de lactose (Umemoto *et al.*, 1968). Accroître la concentration de mannitol de 10 à 100 mM n'a qu'un faible effet sur le processus d'inhibition radicalaire (Davies *et al.*, 1987a).

Le mannitol est connu pour être un puissant antioxydant biologique. Il peut donc absorber rapidement les radicaux  $\bullet\text{OH}$ . Par ce fait, il inhibe fortement la production de bityrosine et il protège efficacement contre la perte de tryptophane lors de l'exposition de protéine (ASB) aux radicaux  $\bullet\text{OH}$  (Davies *et al.*, 1987a).

Le glycérol étant considéré comme un polyalcool, une attention particulière devra être portée afin d'évaluer sa capacité antioxydante au moment de l'exposition aux radicaux  $\bullet\text{OH}$ .

### **2.5.1 Interaction protéine-polyalcool**

En général, la majeure partie des groupements hydrophobes se retrouvent isolés à l'intérieur de la protéine globulaire alors que les

groupements hydrophiles sont localisés en surface. Par contre, une grande proportion de la surface protéique est considérée comme étant hydrophobe. Cette surface est occupée par des atomes ou des groupements fonctionnels impropres à la formation de ponts hydrogènes (Bull et Breese, 1968).

Certains résidus non-polaires situés en surface peuvent difficilement migrer à l'intérieur de la protéine dû à la compaction élevée de la structure tridimensionnelle de la protéine (Gekko et Morikawa, 1981). Par conséquent, l'eau et certains cosolvants tel que les composés polyhydriques (sucres, glycérol et autres polyalcools) doivent être exclus des régions non-polaires de la surface protéique. Cette exclusion dépend du caractère hydrophile du composé polyhydrique, c'est-à-dire que plus le composé est hydrophile, plus il sera fortement exclu de la surface hydrophobe. Alors, l'hydratation préférentielle d'une protéine dans une solution aqueuse polyhydrique est le résultat d'un équilibre fragile entre trois forces: soit la répulsion et l'attraction entre la protéine et le composé polyhydrique et l'effet d'encombrement stérique (Gekko et Morikawa, 1981).

### **2.5.2 Mécanisme d'action du glycérol**

Le glycérol induit une stabilisation protéique en diminuant la tension de surface de l'eau entourant les protéines. L'interaction préférentielle d'une protéine dans une solution aqueuse de glycérol est due aux forces de répulsion entre le glycérol (composé à caractère

hydrophile) et les régions non-polaires situées en surface de la protéine (Gekko et Morikawa, 1981).

Gekko et Timasheff (1981) ont démontré que le potentiel chimique (ou le coefficient d'activité) d'une protéine augmente avec l'augmentation de la concentration en glycérol dans le milieu. Une augmentation du potentiel chimique d'un soluté correspond à une diminution de sa solubilité dans ce milieu. Alors, la présence de glycérol dans un milieu aqueux augmenterait l'hydrophobicité de la protéine. Ceci impliquerait des interactions thermodynamiques défavorables entre les protéines et le glycérol (Gekko et Timasheff, 1981). Ainsi les régions non-polaires de la protéine, situées en surface, vont interagir défavorablement avec le solvant eau-glycérol. Ces régions hydrophobes, en surface de la protéine, seront préférentiellement attirées vers l'intérieur, soit vers les régions apolaires. Toutefois, les liaisons covalentes entre les acides-aminés de la protéine engendrent une forte compaction et un encombrement stérique, inhibant ainsi la migration vers l'intérieur de ces régions hydrophobes (Gekko et Timasheff, 1981). Alors, les molécules d'eau et de glycérol seront distribuées à l'extérieur de la protéine conservant ainsi le potentiel chimique des composantes du solvant constant. Le phénomène d'interactions préférentielles des composantes d'un solvant s'exprime donc généralement par des variations du potentiel chimique (Gekko et Timasheff, 1981).

Le glycérol, doit alors, pénétrer à l'intérieur de l'enveloppe d'eau entourant la protéine de telle sorte qu'il occupe une partie intégrante de cette enveloppe solvatée. Ceci implique donc, qu'il doit exister un équilibre fragile entre la répulsion des régions non-polaires, l'attraction des régions polaires situées en surface de la protéine et le phénomène d'attraction entre les molécules d'eau et de glycérol. Alors, les interactions entre le glycérol et la protéine sont essentiellement non-spécifiques. Ces effets sont valides seulement pour de grandes concentrations de glycérol soit de l'ordre de un à quatre molaire (Gekko et Morikawa, 1981).

## **2.6 L'INFLUENCE DES TAMPONS**

Les tampons engendrent des modifications importantes sur le taux de formation de bityrosine et de perte de tryptophane. Les tampons Tris et HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique) démontrent une protection significative contre la perte de tryptophane et la production de bityrosine alors que le tampon carbonate favorise la perte de tryptophane et augmente la production de bityrosine. Cette augmentation reflète davantage l'implication du carbonate lors des dosages plutôt qu'une réelle production de bityrosine (Davies *et al.*, 1987a). Le tampon phosphate est celui qui présente le plus de similarité avec l'eau mais il faut considérer une contamination possible du fer dans tous les sels de phosphate. La présence de fer peut faussement démontrer une

production de bityrosine lors des dosages (Davies *et al.*, 1987a et Davies et Delsignore, 1987).

Comme l'exposition aux radicaux  $\cdot\text{OH}$  d'une solution d'ASB sans tampon ne démontre pas de variation de pH (Davies *et al.*, 1987a), la présence de tampon phosphate n'est pas justifiée aux risques d'être confronté au problème de contamination par le fer.

## 2.7 LA BIODÉGRADABILITÉ

Tous les emballages de plastiques commerciaux ne sont pas biodégradables parce qu'ils ont des poids moléculaires trop élevés et leurs structures sont trop rigides pour être attaquées par les microorganismes. Le polyéthylène linéaire est le seul emballage de plastique possédant un potentiel pour la biodégradation lorsque son poids moléculaire est drastiquement réduit par la photodégradation (Klemchuk, 1990).

La biodégradation est un processus par lequel les bactéries, moisissures, levures et leurs enzymes consomment une substance comme source de nourriture de telle sorte que la forme originale de cette substance disparaît (Klemchuk, 1990). Sous conditions appropriées, un processus de biodégradation de deux à trois ans est une période raisonnable pour l'assimilation et la disparition complète du produit (Klemchuk, 1990).

Des essais faits avec des moisissures ont démontré que seuls les polyesters aliphatiques et les polyuréthanes aliphatiques sont biodégradables sous 85% d'humidité relative à 28-30°C. Toutefois, ces polymères ne sont pas, jusqu'à maintenant, commercialisés à grande échelle comme emballage (Klemchuk, 1990).

Des recherches sur la biodégradabilité des films de polyéthylène en présence d'amidon, avec des boues activées, ont été entreprises par l'équipe de Ndon (Ndon *et al.*, 1992). Leurs travaux ont permis de démontrer que la dégradation du carbone provenant de l'amidon présent dans le plastique est faible comparativement à la conversion du carbone provenant de l'amidon pur. Le taux de dégradation et l'étendu du retrait des molécules de carbone sont plus élevés sous des conditions aérobiques que sous des conditions anaérobiques. L'étude de la distribution des poids moléculaires des plastiques indique aucune dégradation du polyéthylène.

### **2.7.1 Susceptibilité à la protéolyse**

Davies *et al.* (1987; 1987b) ont démontré que lorsque l'ASB était traitée avec des radicaux  $\cdot\text{OH}$ , celle-ci devenait plus susceptible à la protéolyse par les enzymes cellulaires. Selon les mêmes auteurs, le simple processus de dénaturation (dépliement ou augmentation de l'hydrophobicité) peut expliquer la forte augmentation de la susceptibilité à la protéolyse. Les réactions d'oxydation et de protéolyses semblent être reliées entre elles (Davies, 1987). En effet,

il a été observé qu'*Escherichia coli*, des extraits cellulaires d'erythrocytes humains et de lapins et des réticulocytes de lapins ont tous reconnu et dégradé des protéines modifiées oxydativement. Toutefois, les mécanismes de reconnaissances et de dégradation des protéines modifiées par les enzymes cellulaires sont peu compris (Davies, 1987).

La caséine est un excellent substrat protéique. Sa conformation ouverte lui procure un accès facile à l'attaque enzymatique et ce, avant même son exposition aux radicaux  $\cdot\text{OH}$  (Davies, 1987).

### **2.7.2 Biodégradation par *Pseudomonas***

*Pseudomonas* est reconnue comme étant une espèce bactérienne pouvant synthétiser une quantité d'enzymes très diverses. Étant une bactérie psychrotrophique, elle est responsable de la putréfaction des aliments réfrigérés. Elle peut toutefois décomposer certains produits chimiques comme les pesticides et résister à certains antiseptiques (composé d'ammonium quaternaire) et antibiotiques (Tortora *et al.*, 1989). On la retrouve dans la majorité des sites naturels (eau-sol-air), des produits alimentaires (lait - produits laitiers - oeuf - viandes) et chez certains animaux (Palleroni, 1984). L'espèce *Pseudomonas* est un bâtonnet Gram<sup>-</sup>, chimioorganotrophe, aérobique et mobile avec un ou plusieurs flagelles polaires. Elle peut croître entre 4 et 43°C mais ne tolère pas les milieux acides (Palleroni,

1984). Certaines espèces de *Pseudomonas* sont chimiolithotrophes facultatifs.

La majorité des espèces de *Pseudomonas* dégradent la  $\kappa$ -caséine avant que la population atteigne  $10^4$  UFC/ml. La  $\beta$ -caséine est plus susceptible à la dégradation que l' $\alpha$  par la majorité des espèces. Ce phénomène est toutefois observé lorsque la population bactérienne est supérieure à  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml (Adams *et al.*, 1976).

L'utilisation de *Pseudomonas* pour la dégradation de composantes diverses est très intéressante vue sa résistance à différentes conditions de stress (par exemple: températures, sources de carbone) et sa capacité de synthétiser une importante quantité d'enzymes (Tortora *et al.*, 1989).

## **2.8 HYPOTHESE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE**

Ce projet de recherche a pour objectif de concevoir un film protéique biodégradable. Pour ce faire, nous étudierons les phénomènes d'interaction et de polymérisation engendrés par l'irradiation gamma. Nous évaluerons de plus, les conséquences de ces phénomènes en mesurant les différentes propriétés mécaniques de ce film.

Dues aux propriétés fonctionnelles des caséinates, celles-ci permettent la formation rapide et simple de films protéiques. Le

glycérol agit comme agent plastifiant afin d'ajouter de la souplesse et faciliter la manipulation du film. Nous posons comme hypothèse que le procédé de polymérisation par irradiation devrait améliorer les propriétés mécaniques du film tout en assurant le processus de polymérisation par l'intermédiaire de radicaux hydroxyls. L'irradiation d'un mélange caséinate-glycérol-eau permettra l'obtention d'un film protéique avec de bonnes propriétés d'élasticité, de résistance et de déformation.

Cette étude est originale puisqu'aucune recherche n'a été effectuée précédemment sur le développement et le comportement d'un film de caséinate de calcium engendré par l'irradiation gamma et en présence d'un agent plastifiant.

Les objectifs visés pour ce projet de recherche sont:

- 1- Vérifier l'effet de l'irradiation sur les propriétés physico-chimiques des films protéiques obtenus pour des doses variant entre 0 et 40kGy. Trois protéines seront étudiées soient deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) et une caséinate de calcium (alanate 380) à deux concentrations (5,0%P/P et 7,5%P/P).
- 2- Étudier l'effet de l'ajout de glycérol (0%P/P; 2,5%P/P et 5,0%P/P) sur les propriétés physico-chimiques des films protéiques (alanate 380) au cours de l'irradiation et aux deux concentrations protéiques.

L'ajout de glycérol sera étudié sur la ou les sources protéiques sélectionnées pour leur capacité à former un film.

3- Vérifier la biodégradabilité d'un film par *Pseudomonas fragi*. Ce film est composé de 5,0%P/P de caséinate de calcium avec 2,5% de glycérol irradié à 20kGy.

Les caractéristiques physico-chimiques évaluées sont les taux de formation de bityrosine et de perte de tryptophane. Alors que les propriétés rhéologiques mesurées sont la force de rupture, la déformation à la rupture et la viscoélasticité.

Les moyens pour atteindre ces objectifs sont:

1- Les taux de formation de bityrosine et de perte de tryptophane seront évalués par fluorescence selon une méthode similaire au groupe de recherche de Davies (1987, 1987a). La bityrosine est mesurée aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 305nm et 415nm respectivement. Alors que le tryptophane est mesuré aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 255nm et 351nm respectivement.

2- les propriétés rhéologiques (rupture, déformation et viscoélasticité) seront déterminées à l'aide d'un texturomètre Voland selon la méthode du groupe de recherche de Gontard (1992). La force de rupture est évaluée en utilisant un poinçon de 2mm de diamètre,

pénétrant à une vitesse de 1,0mm/sec; et ce, jusqu'à la rupture du film. La déformation à la rupture est mesurée sur le même tracé que celui obtenu pour la force de rupture. La viscoélasticité est évaluée dans les mêmes conditions que celles pour la mesure de la force de rupture à l'exception que le poinçon s'immobilise et maintient sa position pendant plus d'une minute suite à une déformation de 3mm.

3- La biodégradabilité sera vérifiée par une seule espèce bactérienne, soit *Pseudomonas fragi*. 27363. Trois milieux différents seront utilisés pour vérifier la biodégradabilité du film. Dans le premier milieu, un échantillon de film est ajouté à de l'eau physiologique. Dans le deuxième milieu, *Pseudomonas fragi*. est inoculée à de l'eau physiologique. Finalement, pour le troisième milieu, un échantillon de film et *Pseudomonas fragi*. sont ajoutés à de l'eau physiologique.

### **3.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Une description explicite du matériel et des différentes techniques utilisées sera présentée dans cette partie. En premier lieu, il sera discuté de la préparation nécessaire pour l'élaboration du film suivi des différentes méthodes utilisées pour mesurer les propriétés physico-chimiques du film.

#### **3.1 PRÉPARATION DES SOLUTIONS PROTÉIQUES**

Dans ce projet de recherche, trois caséinates (voir composition au tableau 3.1) ont été initialement utilisées, soit deux caséinates de sodium (alanate-110 et 180) et une caséinate de calcium (alanate-380, New Zealand Milk Products, Inc., Ca, USA). Le contenu en protéines est certifié supérieur à 91,0% et cette pureté a été vérifiée au laboratoire (LECO, FP-428, MI, USA). Elle est de 94,099%, 94,526% et 93,575% pour les alanates 110, 180 et 380 respectivement. Ces résultats en contenu d'azote total seront retenus pour le calcul des concentrations en protéines (%P/P) au moment de la formulation des différentes compositions des solutions.

**Tableau 3.1:** Composition des trois caséiantes (alanates) utilisées dans ce travail de recherche.

ÉLÉMENTS	ALANATE 110	ALANATE 180	ALANATE 380
PROTÉINES (N x 6.38)%	91.1	91.1	91.8
MINÉRAUX (%)	3.6	3.5	3.8
HUMIDITÉ (%)	4.1	4.0	3.9
MATIERES GRASSES (%)	1.1	1.1	0.7
LACTOSE (%)	0.1	0.1	0.1
pH (5% À 20 °C)	6.6	6.6	7.0

Les valeurs des différentes composantes des trois caséiantes proviennent des bulletins de produits fournis par la compagnie New Zealand Milk Products, Inc., Ca, USA.

Avant la période d'irradiation, les caséiantes sont solubilisées dans l'eau distillée préalablement filtrée par osmose inverse. La solubilisation est faite continuellement sous agitation magnétique et sans apport de chaleur. Deux concentrations sont utilisées soient 5,0% et 7,5%P/P de protéines. Une concentration inférieure à 5% génère des films d'épaisseurs inadéquates à la manipulation alors qu'une concentration supérieure à 7,5%, produit des films trop épais.

Selon la composition du milieu, une quantité de glycérol (pureté  $\geq 95\%$ ; A & C, Montréal, Canada) peut être ajoutée à des concentrations

de 1,0%, 2,5% et 5,0%P/P. Une concentration de glycérol supérieure à 5,0%P/P produit des films à l'état gel, donc difficile à manipuler adéquatement.

Après solubilisation complète des protéines, un vide de 15 minutes, sous agitation magnétique, est appliqué; suivi immédiatement d'un barbotage au N<sub>2</sub>O (LINDE, Union Carbide, Toronto, Canada) pendant une seconde période de 15 minutes sous agitation. Après l'étape de gazage, la solution est transférée dans des éprouvettes à bouchons vissables, sous flux de N<sub>2</sub>O. Les éprouvettes sont scellées à la parafine pour être ensuite irradiées.

### **3.2 IRRADIATION DES SOLUTIONS PROTÉIQUES**

L'irradiation est effectuée dans un irradiateur au Co<sup>60</sup> de type Gammacell 220 (NORDION INTERNATIONALE INC., localisé au Centre d'Irradiation du Canada (C.I.C.), Laval, Canada) à un débit de dose moyen de 2,18kGy/h pour des doses d'irradiation de 4, 8, 12, 15, 20, 30 et 40kGy.

Pour l'irradiation, les éprouvettes sont placées dans un béccher de verre qui lui est positionné au centre de la chambre d'irradiation. De cette façon, les éprouvettes se retrouvent dans la zone de 100% ± 5% de la dose selon les courbes d'isodoses de l'irradiateur Gammacell 220.

Après chaque période d'irradiation, une attente de 20 à 30 minutes à la noirceur est allouée afin que les réactions radicalaires les plus longues soient complétées et éviter aussi une photodécomposition des biphénols (Lehrer et Fasman, 1967; Prutz, 1983).

### 3.3 FORMATION DU FILM

Avant et après chaque traitement d'irradiation, le pH (pH-mètre Corning, PS 15) et le degré Brix des solutions (réfractomètre Fisher, 13-946-70c, no 4754, Montréal, CANADA) sont vérifiés afin d'évaluer rapidement tout changement au cours de l'irradiation.

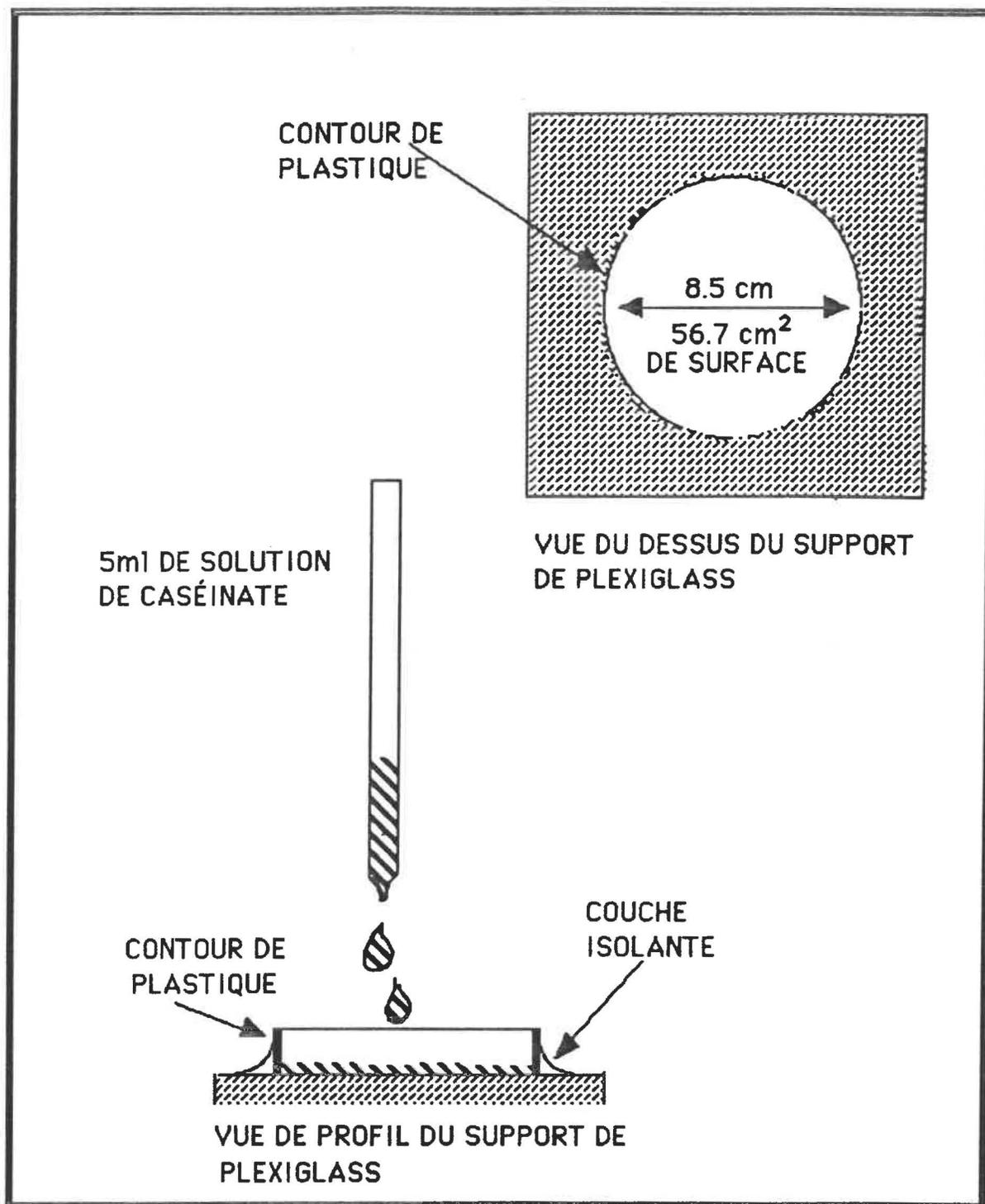
La mesure du pH permet de s'assurer la constance du pH des solutions; et ce, avant et après chaque période d'irradiation. Le réfractomètre permet d'évaluer la quantité de solides solubles présents dans les solutions. Sa mesure permet de voir toutes variations de la quantité de solides solubilisés avant et après irradiation.

Une homogénéisation des solutions par inversions successives est effectuée avant toutes les prises de résultats de façon à empêcher la formation d'un dépôt protéique.

Après vérification du pH et du degré Brix, cinq millilitres (5ml) de la solution protéique est pipetée et déposée uniformément dans un

support de polyméthacrylate (plexiglass). Une attention particulière est apportée afin d'éviter la formation de bulles d'air. Le support a un diamètre interne de 8,5cm donnant une surface de 56,7cm<sup>2</sup> (voir figure 3.1). Par la suite, le support est positionné le plus possible à niveau. Une période de séchage de 12 à 14 heures (soit toute la nuit) à la température de la pièce, est allouée afin d'obtenir le film. Cette méthode de formation de film est une adaptation de celle des équipes de recherche de Gontard (1992) et de Krochta (1991).

Après le temps de séchage, le film ainsi formé est retiré de son support et son épaisseur est déterminé à l'aide d'un appareil de mesure "Digimatic Indicator" (Mitutoyo, Japon).



**Figure 3.1:** Schéma du montage utilisé pour la fabrication des films.

### **3.4 PROPRIÉTÉS MÉCANIQUES**

Tous les films ainsi produits sont coupés afin d'obtenir un échantillon de 4,0cm de diamètre. Par la suite, les échantillons sont humidifiés et équilibrés pendant 48 heures, à 25°C, dans un dessiccateur contenant une solution saturée de bromure de sodium (Gontard *et al.*, 1992). Cette manipulation assure une atmosphère de 56% d'humidité relative (Ganzer et Rebenfeld, 1987) et ce taux d'humidité a été vérifié. Les échantillons humidifiés sont ensuite solidement immobilisés entre deux plaques de plexiglass exposant une surface de 3,2cm de diamètre pour la mesure des propriétés mécaniques.

Pour tous les films expérimentés, deux propriétés mécaniques seront déterminées, soit la force de rupture et la déformation à la rupture. Pour certains films contenant du glycérol, une troisième propriété mécanique sera évaluée, soit la viscoélasticité. Ces trois propriétés sont mesurées à l'aide d'un texturomètre Volland (Stevens-LFRA Texture Analyser, modèle TA-1000, N.Y., USA) relié à une imprimante (Texture Technologies Corp., modèle L 6512, N.Y., USA). Un poinçon de deux millimètres (2mm) de diamètre est utilisé pour toutes les mesures (voir figure 3.2). Quelques essais ont été faits avec un poinçon de 3mm de diamètre et les lectures dépassaient la limite maximale de détection du texturomètre. Le calcul des résultats est toujours en fonction de la vitesse de descente du poinçon et de la vitesse de déroulement du papier de l'imprimante. Avant chaque

utilisation, le texturomètre est calibré contre un standard de masse (100 à 1000g) et la vitesse de l'imprimante est vérifiée en fonction du temps.

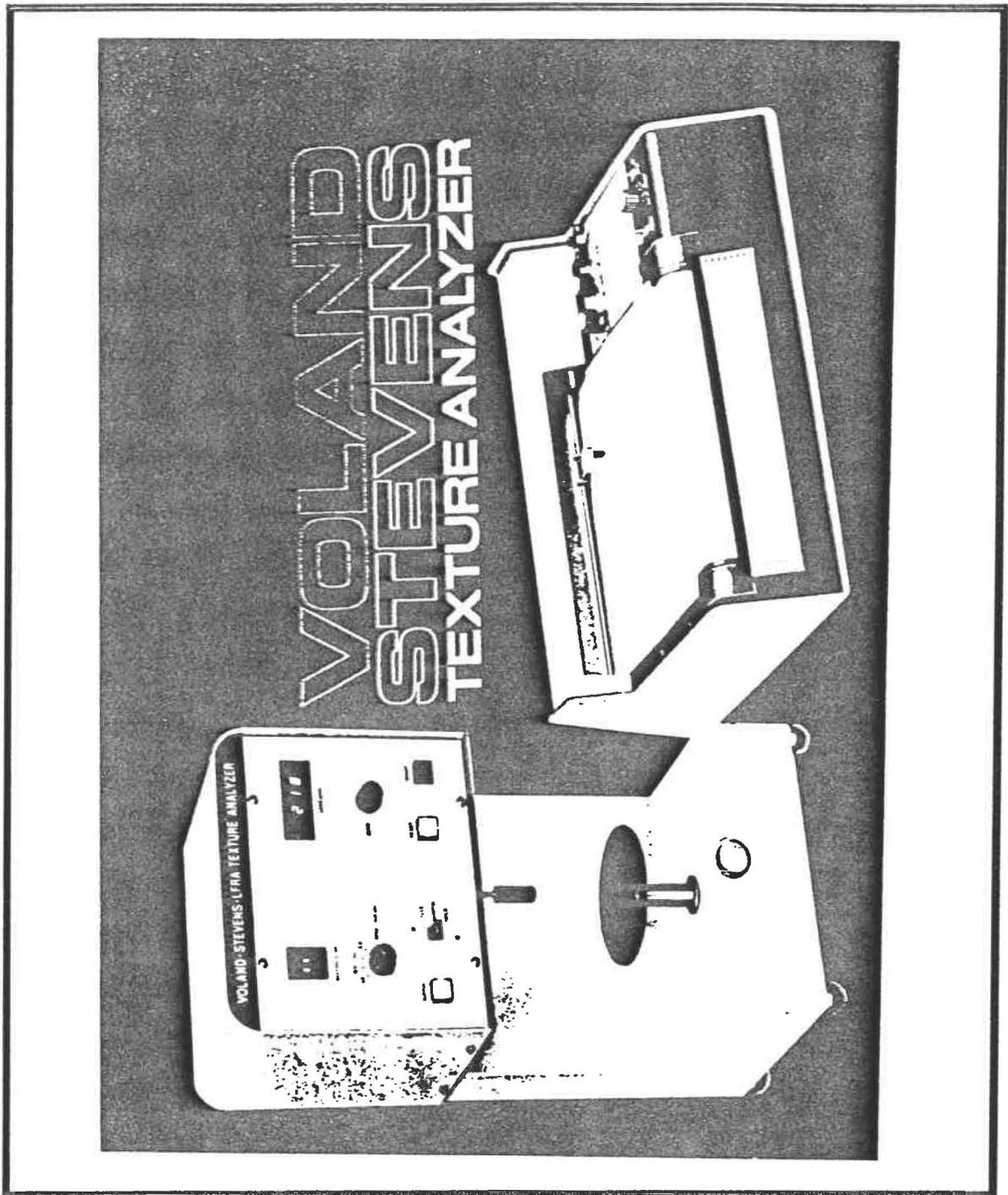
Pour les trois propriétés mécaniques, les tests ont été réalisés en triplicata. La moyenne obtenue, de même que sa déviation standard, ont été portées en graphique.

#### **3.4.1 La force de rupture et la déformation à la rupture**

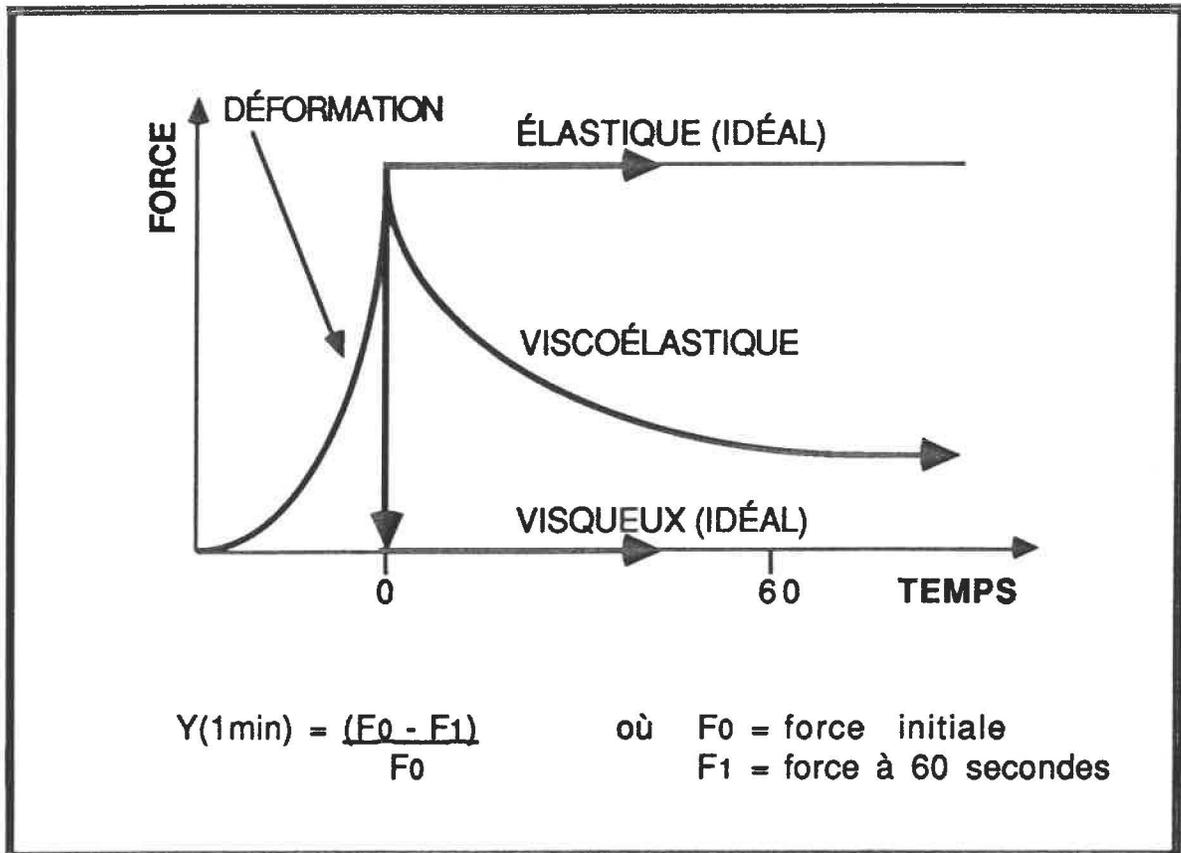
La force et la déformation à la rupture sont calculées simultanément pour tous les échantillons. La vitesse de descente du poinçon est 1,0mm/s et celle de déroulement du papier de l'imprimante est de 50cm/min. La poussée du poinçon est enregistrée en gramme et convertie en unité de force (N).

#### **3.4.2 La viscoélasticité**

La viscoélasticité d'un film est évaluée par la courbe de relaxation obtenue suite à l'application d'une force maintenue par le poinçon sur le film. La vitesse de descente du poinçon est de 1,0mm/s et celle de déroulement du papier de l'imprimante est de 10cm/min. Dans le cas présent, la déformation est de trois millimètres (3mm) et les forces mesurées aux temps 0 et 60 secondes sont retenues pour le calcul du coefficient de relaxation  $Y(1\text{min})$  (Peleg, 1979) selon l'équation définie à la figure 3.3.



**Figure 3.2:** Texturomètre Voland utilisé lors de l'expérimentation (Stevens-LFRA Texture Analyser, modèle TA-1000, N.Y., USA).



**Figure 3.3:** Courbe de relaxation et équation pour le calcul du coefficient de relaxation (Peleg, 1979).

Conformément à cette équation, le coefficient de relaxation  $Y(1\text{min})$  varie entre 1 et 0. Un film à caractère élastique démontrera un rapport  $Y(1\text{min})$  faible car les forces initiale et finale seraient alors, quasi identiques.

Durant la relaxation, l'énergie est dissipée créant ainsi des perturbations internes irréversibles. Une tension continuellement décroissante est requise pour maintenir l'échantillon dans son état déformé (Gontard *et al.*, 1992).

### 3.5 DOSAGES PAR FLUOROMÉTRIE

Une fraction de la solution protéique irradiée est conservée liquide afin de mesurer les taux de formation de bityrosine et de perte de tryptophane. Dans tous les cas, les dosages sont effectués à l'intérieur des 24 heures suivant la période d'irradiation.

Avant d'effectuer les dosages, une dilution 1/100 est réalisée avec un tampon HEPES (A & C, Montréal, Canada) 20 mM, pH 7,0 (Davies *et al.*, 1987a), afin d'éviter une saturation de l'appareil.

Les taux de formation de bityrosine et de perte de tryptophane sont suivis par fluorescence (Davies *et al.*, 1987a) à l'aide d'un spectrofluoromètre (Spectrofluorometer 2070, Varian, CA, USA). Le spectrofluoromètre est muni d'une lampe au xénon (75W) et la capacité de la cellule est de 15 $\mu$ l. Les détecteurs sont des photomultiplicateurs pour l'excitation et l'émission et le seuil de détectabilité est de 0,03ppb de sulfate de quinine dans une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M (valeurs rapportées par Varian). Le spectrofluoromètre est relié à un HPLC (Liquid Chromatograph: VISTA 5500, Varian, CA, USA) qui lui, est raccordé à un système d'auto-injection (Auto Sampler 9090, Varian, CA, USA). L'ensemble de ce système est en communication permanente avec un terminal informatique (COMPAQ/Deskpro 486/33M) qui permet l'acquisition et le traitement de données (Varian Star Workstation, Copyright 1989-1992, Varian Associates, Inc., CA,USA).

Lors des dosages, aucune colonne à séparation n'est utilisée mais seulement un débit fixe d'un millilitre par minute (1 ml/min). Le volume d'injection est de 90 $\mu$ l et une torsade de 100 $\mu$ l est utilisée pour recevoir l'injection. L'acquisition de données est d'une durée fixe de 90 secondes. L'évaluation des taux de formation de bityrosine ou de perte de tryptophane s'obtient par le calcul de l'aire sous la courbe en unité de surface arbitraire.

Comme les dosages sont purement qualitatifs, nous nous sommes concentrés principalement sur la stabilité et la capacité reproductrice de l'appareil. Ainsi, plusieurs séries de dosages sur les trois caséinates utilisées et sur une solution de tryptophane (Sigma, Mississauga, CANADA) ont été faites aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission du tryptophane. Pour trois concentrations différentes, les résultats ont démontré un coefficient de variation inférieur à 4% entre les dosages et une variation égale ou inférieure à 8,5% entre les trois concentrations pour une même caséinate. La variation entre les concentrations serait principalement justifiée par les manipulations prédosages.

Des essais ont démontré qu'autant le tampon HEPES (20mM, pH 7,0), le glycérol (2,5%) ou un mélange des deux ne génèrent pas de signaux caractéristiques, véritablement supérieurs au bruit de fond, pour les différentes longueurs d'onde utilisées et ce, pour des solutions irradiées et non-irradiées.

Pour toutes les différentes compositions des solutions, les taux de formation de bityrosine et de perte de tryptophane ont été mesurés en triplicata. La moyenne, de même que sa déviation standard, ont été portées en graphique.

### **3.5.1 Dosage de bityrosine**

Le taux de formation de bityrosine est mesurée aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 305nm et 415nm ( $\pm 5$ nm) respectivement. Ces longueurs d'onde ont été déterminées à l'aide d'une solution de tyrosine (50ppm) irradié (Sigma, Mississauga, CANADA). Le gain de l'appareil est ajusté à 1 et un facteur d'atténuation de 4 est appliqué. Comme nous n'avons pas trouvé de standards commerciaux de bityrosine, nos résultats ne pourront être interprétés que de façon qualitative.

### **3.5.2 Dosage de tryptophane**

Le taux de perte de tryptophane est suivi aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 255nm et 351nm ( $\pm 5$ nm) respectivement. Ces longueurs d'onde ont été établies à l'aide d'une solution de tryptophane (50ppm) irradiée. Le gain de l'appareil est de 1 et un facteur d'atténuation de 32 est appliqué.

L'oxydation d'une solution de résidus de tryptophanes par les radicaux  $\cdot\text{OH}$  est directement relié à la perte d'intensité du signal de fluorescence lors de son dosage (Davies *et al.*, 1987a).

Comme le dosage par fluorescence est beaucoup plus complexe avec des protéines qu'avec un seul acide aminé (Davies *et al.*, 1987a), nous n'avons pas tenté de convertir l'intensité de fluorescence en quantité de résidus tryptophane, mais seulement constater expérimentalement, si on observerait une perte du signal.

### 3.6 VÉRIFICATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ

La biodégradabilité a été vérifié par une *Pseudomonas fragi* car c'est une espèce bactérienne très utilisée en laboratoire mais aussi, parce que la souche *Pseudomonas* est reconnue comme étant une bactérie pouvant faire la synthèse une quantité très diverses d'enzymes (Tortora, G.J. *et al.*, 1989). Les principales protéases synthétisées pour la biodégradation de la caséine sont des métalloprotéases et des sérine protéases (Alichanidis et Andrews, 1977; Davies, 1987; Davies *et al.*, 1987b).

Pour chacun des trois essais fait en triplicata, trois milieux différents ont été préparés, soit:

- 1- échantillon de film + 0,85%-NaCl (témoin négatif)
- 2- *P. fragi* + 0,85%-NaCl (témoin)
- 3- échantillon de film + *P. fragi* + 0,85%-NaCl

Chaque milieu contient 99ml d'eau avec 0,85%P/V de NaCl (Anachemia, Montréal, Canada) et selon le cas, 1ml d'inoculum ou un échantillon de film ou encore, les deux sont ajoutés. Les milieux sont incubés à  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  et sont continuellement sous agitation ( $140 \pm 5\text{rpm}$ ).

Un seul type de film a été choisi dans cette section. Il est composé de 5,0%P/P de caséinate de calcium avec 2,5%P/P de glycérol et irradié à 20kGy. Les échantillons sont préparés selon les méthodes décrites dans les sections 2,1 à 2,3. Une dose d'irradiation de 20kGy est considérée comme une dose de stérilisation. Naturellement, une précaution particulière au maintien de la stérilité est appliquée.

L'inoculation des milieux se fait à partir d'une culture-mère dont le temps d'incubation est de 16 à 18 heures. Préalablement, la culture-mère a été inoculée à deux reprises dans un bouillon nutritif (Nutrient Broth, Difco Laboratories, Détroit, USA) afin d'adapter la souche et la recueillir en phase de croissance exponentielle.

Un millilitre (1ml) de la culture-mère ainsi obtenue est prélevée et diluée jusqu'à un facteur de  $1/10^4$  avec une solution saline (0,85%-NaCl). Trois centrifugations successives sont faites à

3000rpm pour 10 minutes, à 4°C. Après chaque centrifugation, neuf des dix millilitres sont retirés et remplacés par de l'eau physiologique, puis homogénéisés au vortex. L'inoculation des milieux se fait après la troisième centrifugation et dissolution. De par ces manipulations et dilutions, les dénombrements initiaux des milieux sont approximativement de 100UFC/ml.

Le dénombrement bactérien se fait en duplicata sur milieu "Trypsic Soya Agar" (TSA, Difco Laboratories, Détroit, USA). La méthode de dénombrement suivie est celle conseillée par la Direction Générale de la Protection de la Santé (DGPS; Santé et bien-être social Canada, 1979). L'inoculum est déposé en surface des gélose par étalement. L'incubation se fait à 23°C ±2 °C et les décomptes bactériens sont vérifiés à 24 et 48 heures après la mise en plaque. Les décomptes se situant entre 30 et 300 ont été retenus.

### **3.7 ANALYSES STATISTIQUES**

Les résultats obtenus sont analysés statistiquement par l'analyse de variance et test de comparaison multiple de DUNCAN avec un  $P \leq 0,05$ . Alors que l'analyse statistique de STUDENT est utilisée seulement lors de l'analyse de variance et test de comparaison par paire avec un  $P \leq 0,05$  (Snedecor et Cochran, 1978).

## **4.0 RÉSULTATS**

Cette section sera divisé en trois grandes parties. Dans la première partie, les résultats d'une série d'expériences seront présentés sur l'évaluation du comportement des trois caséinates utilisées en fonction de la dose d'irradiation. Après discussion de l'ensemble de ces résultats, une sélection d'une des trois caséinates sera faite pour la suite de l'expérimentation. Dans la deuxième partie, une seconde série d'expériences sera traitée sur le comportement de la caséinate choisie en présence de glycérol et en fonction de la dose d'irradiation donnée. Finalement, dans la troisième partie, les mesures de la biodégradabilité seront présentées.

### **4.1 OBSERVATIONS ET ASPECTS VISUELS DES FILMS**

Avant d'élaborer sur les résultats, il serait souhaitable de situer le lecteur sur l'aspect physique et visuel des films. À première vue, les films non irradiés sont transparents et incolores de même que les films de caséinates, sans glycérol, irradiés de 4 à 12kGy. Par contre, en absence d'un agent plastifiant, la friabilité de ces films est tellement grande que leur manipulation est impossible sans les abîmer. Ces observations s'appliquent pour les deux concentrations de protéines utilisées (5,0%P/P et 7,5%P/P).

Par contre, l'irradiation cause un jaunissement des films formés en présence de glycérol et ce taux de jaunissement semble être

proportionnel à la dose d'irradiation reçue. La présence de glycérol tend à créer une certaine opacité et elle semble être proportionnelle au contenu en glycérol. Alors que pour une même concentration de glycérol, le contenu en protéines affecte l'aspect du film pour une même dose d'irradiation. À 2,5%P/P ou 5,0%P/P de glycérol, les films produits avec 7,5%P/P de protéines sont plus transparents que ceux produits avec 5,0%P/P. Donc le ratio glycérol/protéine semble être un facteur influant sur l'opacité des films.

Selon le contenu en protéines et en glycérol, l'épaisseur varie de 27 à 64  $\mu\text{m}$  avec une variation égale ou inférieure à 8% (voir tableau 4.1). Un film d'enrobage doit être le plus mince possible et de préférence son épaisseur doit être égale ou inférieure à 50  $\mu\text{m}$ . Un film comestible avec une épaisseur trop élevée risquerait de nuire aux propriétés sensorielles du produit emballé ou de ses composantes.

Naturellement, le contenu en glycérol modifie la texture du film et avec une concentration de 5,0%P/P, sa manipulation exige plus de délicatesse. Quelque soit la composition ou la dose d'irradiation donnée, aucun film, une fois formé, n'a dégagé d'odeur perceptible.

**Tableau 4.1:** Variation de l'épaisseur des films selon leur composition en protéines avec ou sans glycérol sur l'ensemble des doses d'irradiation.

%P/P ALANATE/ %P/P GLYCÉROL	ÉPAISSEUR ( $\mu\text{m}$ )	DOSE (kGy)
5,0%-110/0%	27 $\pm$ 2	0 à 12
5,0%-180/0%	27 $\pm$ 2	0 à 12
5,0%-380/0%	28 $\pm$ 2	0 à 12
7,5%-110/0%	44 $\pm$ 2	0 à 12
7,5%-180/0%	42 $\pm$ 2	0 à 12
7,5%-380/0%	41 $\pm$ 2	0 à 12
5,0%-380/1,0%	32 $\pm$ 2	0 à 12
5,0%-380/2,5%	38 $\pm$ 3	0 à 40
5,0%-380/5,0%	44 $\pm$ 2	0 à 40
7,5%-380/2,5%	62 $\pm$ 5	0 à 20
7,5%-380/5,0%	64 $\pm$ 5	0 à 40

L'expression 5,0%-110/0% signifie 5,0%P/P de la protéine 110 avec 0%P/P de glycérol.

#### **4.2 COMPARAISON DES TROIS PROTÉINES**

Dans cette première partie, une comparaison de deux propriétés mécaniques et des caractéristiques de fluorescence ont été observées dans le but de sélectionner une des trois caséinates pour la poursuite des expériences.

En premier lieu, la force à la rupture en fonction de la dose d'irradiation sera discutée; suivi de la déformation à la rupture en fonction de la dose et finalement, les dosages par fluorescence selon la dose reçue, seront présentés. Pour ces trois points de comparaisons, deux concentrations de protéines ont été étudiées en absence d'agent plastifiant.

#### **4.2.1 La force à la rupture**

Comme il existe une relation directe entre la force de rupture et l'épaisseur du film, nous avons décidé de calculer le rapport de l'un sur l'autre. Ceci a été fait afin d'éviter d'éventuelles variations de force dues simplement à des variations de l'épaisseur. Ce rapport est représenté par le symbole  $F/E$  et exprimé en  $N/\mu m$ .

À une concentration de 5,0%P/P, le rapport  $F/E$  varie de 14.7 à 17.4 pour les trois caséinates et pour l'ensemble des doses d'irradiation. Il n'y a pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) pour le rapport  $F/E$ , en fonction de la dose d'irradiation, entre les trois caséinates à cette concentration. Une seule exception pour la dose de 12kGy où il existe un écart significatif ( $P \leq 0,05$ ) entre les caséinates de sodium (alanate 180) et de calcium (alanate 380) (voir tableau 4.2 et figure 4.1). Par contre, sans être clairement démarquée, la caséinate de calcium (alanate 380) démontre un rapport  $F/E$  supérieur aux deux caséinates de sodium pour les doses d'irradiation de 4, 8 et 12kGy (voir tableau 4.2).

Pour la concentration de 7,5%, le rapport F/E varie de 14.2 à 17.4 pour les trois caséinates et pour l'ensemble des doses d'irradiation. À cette concentration, la caséinate de calcium (alanate 380) a un rapport F/E significativement supérieur ( $P \leq 0,05$ ) aux deux autres caséinates de sodium (alanates 110 et 180) lors de l'irradiation entre 4 et 12kGy (voir tableau 4.3 et figure 4.1). À 0kGy, il n'y a pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) entre les caséinates de sodium (alanate 110) et de calcium (alanate 380). Alors, les films formés à partir de caséinate de calcium (alanate 380) exigent une force plus grande pour se rompre comparativement à ceux produits à partir des deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) (voir tableau 4.3).

Pour les trois caséinates, il n'y a pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) pour le rapport F/E entre les deux concentrations de protéines utilisées (5,0% et 7,5%) et ce, en fonction des doses d'irradiation (0 à 12kGy). Seules exceptions pour la caséinate de sodium (alanate 110) à 12kGy et la caséinate de calcium (alanate 380) à 8kGy où la différence est considérée significative ( $P \leq 0,05$ ).

Donc, l'irradiation de la caséinate de calcium (alanate 380) à une concentration de 7,5% de protéines, crée un film plus résistant à la rupture que les deux autres protéines. Alors qu'à une concentration de 5,0%, il n'y a pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) entre les trois caséinates.

**Tableau 4.2:** Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines.

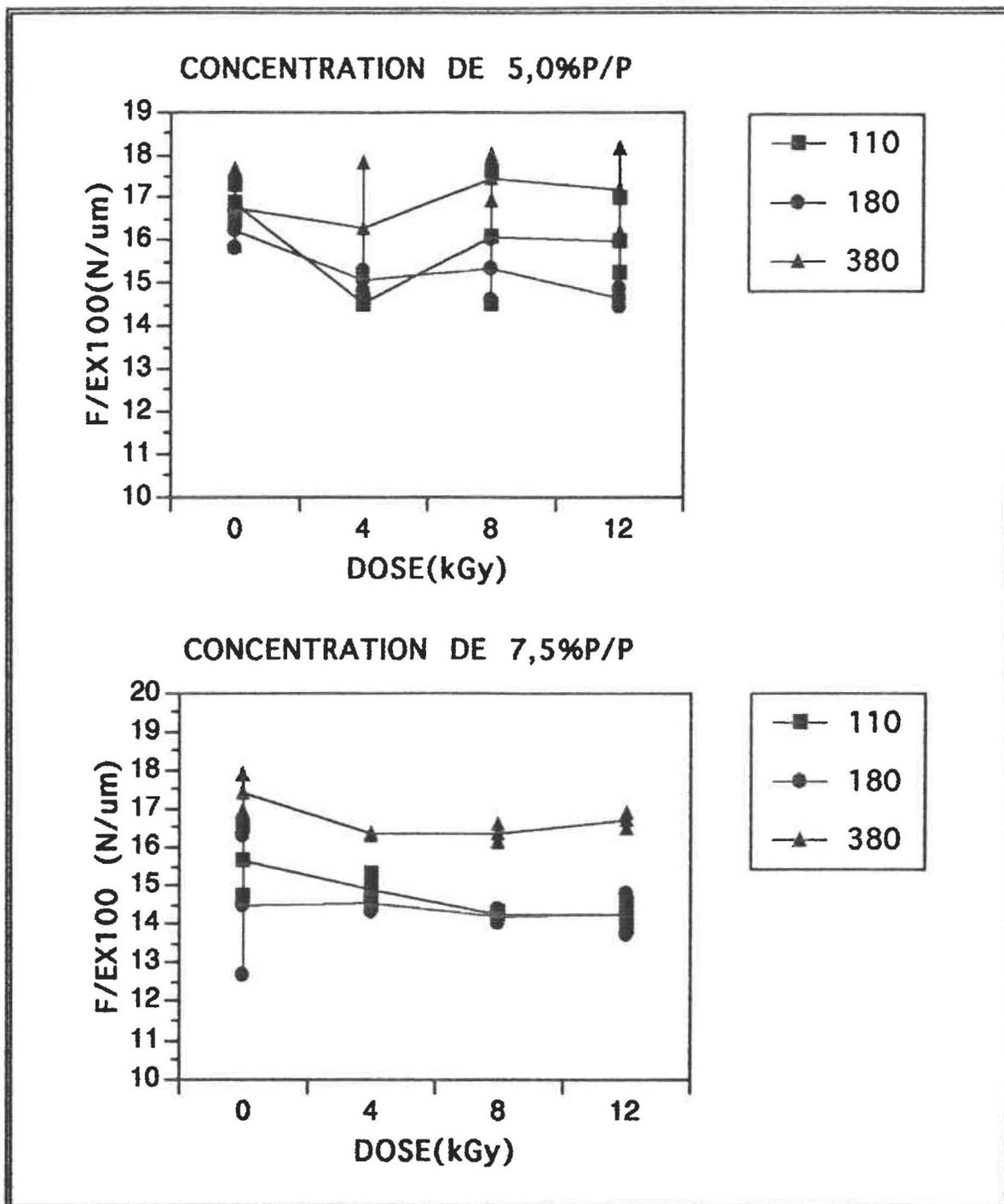
DOSE(kGy)	F/Ex100(N/μm) ALANATE-110	F/Ex100(N/μm) ALANATE-180	F/Ex100(N/μm) ALANATE-380
0	16.9 ± 0.4 <sup>1,a</sup>	16.2 ± 0.4 <sup>3,a</sup>	16.8 ± 0.9 <sup>5,a</sup>
4	14.6 ± 0.1 <sup>2,b</sup>	15.0 ± 0.3 <sup>4,b</sup>	16.3 ± 1.5 <sup>5,b</sup>
8	16.0 ± 1.6 <sup>1,2,c</sup>	15.3 ± 0.7 <sup>4,c</sup>	17.4 ± 0.5 <sup>5,c</sup>
12	16.0 ± 0.8 <sup>1,2,de</sup>	14.7 ± 0.2 <sup>4,d</sup>	17.2 ± 1.0 <sup>5,e</sup>

Le terme F/E exprime le rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.3:** Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines.

DOSE(kGy)	F/Ex100(N/μm) ALANATE-110	F/Ex100(N/μm) ALANATE-180	F/Ex100(N/μm) ALANATE-380
0	15.6 ± 0.9 <sup>1,ab</sup>	14.5 ± 1.8 <sup>3,a</sup>	17.4 ± 0.4 <sup>4,b</sup>
4	14.9 ± 0.4 <sup>1,2,c</sup>	14.5 ± 0.2 <sup>3,c</sup>	16.4 ± 0.0 <sup>5,d</sup>
8	14.3 ± 0.0 <sup>2,e</sup>	14.2 ± 0.2 <sup>3,e</sup>	16.3 ± 0.2 <sup>5,f</sup>
12	14.2 ± 0.3 <sup>2,g</sup>	14.3 ± 0.5 <sup>3,g</sup>	16.7 ± 0.2 <sup>5,h</sup>

Le terme F/E exprime le rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).



**Figure 4.1:** Rapport F/E (rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film) en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380; et ce, pour des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

#### 4.2.2 La déformation à la rupture

À une concentration de 5,0%P/P, la déformation est d'environ  $2,3\text{mm} \pm 0,1\text{mm}$  pour les trois caséinates et pour toutes les doses d'irradiation. Il n'y a pas de variations considérées significatives ( $P > 0,05$ ) pour les trois caséinates en fonction des doses d'irradiation à l'exception de la caséinate de calcium entre les doses de 4 et 12kGy (voir tableau 4.4). À 7,5%P/P de protéines la déformation est d'environ  $2,6\text{mm} \pm 0,2\text{mm}$  pour l'ensemble des trois caséinates et des doses d'irradiation. Pour une même dose d'irradiation, il n'y a pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) entre les trois caséinates. Par contre, pour les caséinates de sodium (alanate 110) et de calcium (alanate 380), il existe un écart significatif ( $P \leq 0,05$ ) entre les doses de 0 et 12kGy (voir tableau 4.5).

Pour les deux concentrations utilisées, il n'existe pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) entre les trois caséinates pour la capacité déformante en fonction des doses d'irradiation (voir figure 4.2). La déformation est supérieure de quelques dixièmes de millimètres pour une concentration de 7,5% comparativement à 5,0% mais cet écart n'est pas considéré significatif ( $P > 0,05$ ) (voir tableaux 4.4 et 4.5).

**Tableau 4.4:** Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines.

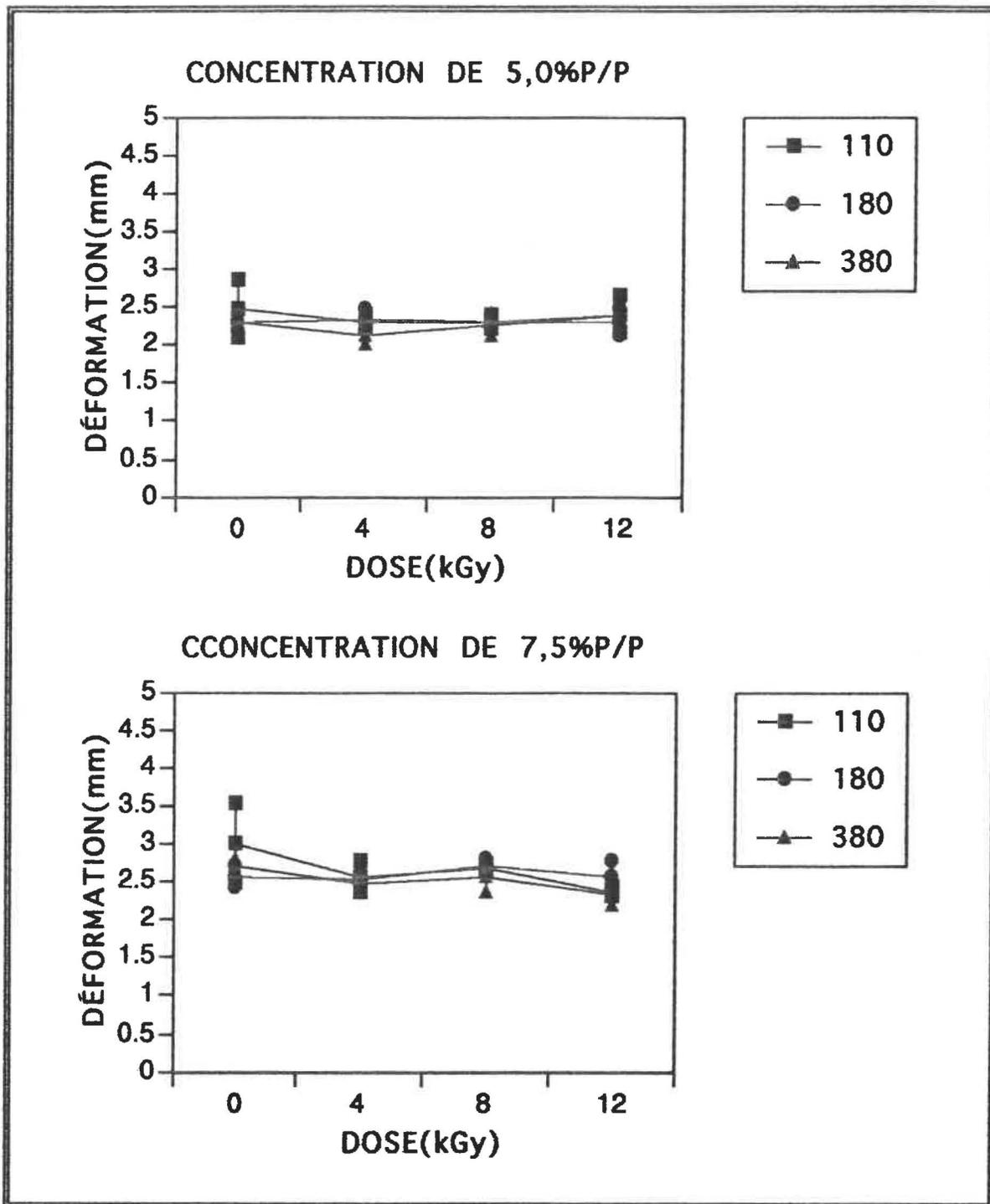
DOSE (kGy)	DÉFORMATION (mm) ALANATE-110	DÉFORMATION (mm) ALANATE-180	DÉFORMATION (mm) ALANATE-380
0	2.4 ± 0.2 <sup>1,a</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>2,a</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>3,4,a</sup>
4	2.3 ± 0.1 <sup>1,b</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>2,b</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>3,b</sup>
8	2.3 ± 0.1 <sup>1,c</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>2,c</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>3,4,c</sup>
12	2.4 ± 0.3 <sup>1,d</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>2,d</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>4,d</sup>

Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.5:** Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines.

DOSE (kGy)	DÉFORMATION (mm) ALANATE-110	DÉFORMATION (mm) ALANATE-180	DÉFORMATION (mm) ALANATE-380
0	3.0 ± 0.5 <sup>1,a</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>3,a</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>4,a</sup>
4	2.6 ± 0.2 <sup>1,2,b</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>3,b</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>4,5,b</sup>
8	2.7 ± 0.1 <sup>1,2,c</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>3,c</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>4,5,c</sup>
12	2.4 ± 0.1 <sup>2,d</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>3,d</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>5,d</sup>

Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).



**Figure 4.2:** Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

La viscoélasticité n'a pas été évaluée pour ces films car la déformation appliquée pour mesurer ce paramètre est de trois millimètres (3mm) et selon la figure 4.2, la déformation à la rupture est inférieure à cette valeur.

#### **4.2.3 Taux de formation de bityrosine**

Le taux réel de formation de bityrosine produit par l'irradiation est mesuré en soustrayant la valeur moyenne obtenue à 0kGy de celles obtenues aux différentes doses d'irradiation. En effet, un signal de fluorescence est perçue à 0kGy. La présence initiale de bityrosine ou la contribution de d'autres composantes avoisinantes peuvent provoquer ce signal de fluorescence. Cette contribution est la conséquence de dosages protéiques avec ces multiples groupements fonctionnels à proximité les uns des autres.

On observe une augmentation de formation de bityrosine avec une augmentation de la dose d'irradiation pour les trois caséinates et ce, pour les deux concentrations utilisées.

À une concentration de 5,0%, le taux de formation de bityrosine est significativement supérieur ( $P \leq 0,05$ ) pour la caséinate de calcium (alanate 380) comparativement aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) pour les doses de 4, 8 et 12kGy (voir tableau 4.6). De plus, à 12kGy, la seconde caséinate de sodium (alanate

180) a produit significativement plus ( $P \leq 0,05$ ) de bityrosine que la première (alanate 110).

Pour la concentration de 7,5%, la caséinate de sodium (alanate 110) a produit significativement plus ( $P \leq 0,05$ ) de bityrosine que les caséinates de sodium (alanate 180) et de calcium (alanate 380) et ce, aux doses de 4 et 12kGy (voir tableau 4.6 et figure 4.3). Alors qu'à 8kGy, aucune différence jugée significative ( $P > 0,05$ ) n'a été perçue entre les trois caséinates (voir tableau 4.7).

Il existe une différence significative ( $P \leq 0,05$ ) entre les deux concentrations de protéines mais cette différence n'est pas démontrée pour toutes les doses d'irradiation. En effet, la première caséinate de sodium (alanate 110) a produit significativement ( $P \leq 0,05$ ) plus de bityrosine à la concentration de 7,5% pour la dose de 12kGy qu'à la concentration de 5,0%. Alors que la seconde caséinate de sodium (alanate 180) a produit significativement ( $P \leq 0,05$ ) plus de bityrosine à la concentration de 5,0% pour les doses de 4 et 8kGy qu'à la concentration de 7,5%. Finalement, la caséinate de calcium (alanate 380) a produit significativement ( $P \leq 0,05$ ) plus de bityrosine à la concentration de 5,0% pour les doses de 4, 8 et 12kGy comparativement à la concentration de 7,5% (voir tableau 4.6 et 4.7).

**Tableau 4.6:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines.

DOSE(kGy)	ALANATE-110	ALANATE-180	ALANATE-380
4	19354 ± 1142 <sup>1,a</sup>	20730 ± 762 <sup>4,a</sup>	28552 ± 1621 <sup>7,b</sup>
8	41071 ± 453 <sup>2,c</sup>	39651 ± 2095 <sup>5,c</sup>	66803 ± 2391 <sup>8,d</sup>
12	62999 ± 659 <sup>3,e</sup>	66271 ± 1287 <sup>6,f</sup>	82504 ± 1650 <sup>9,g</sup>

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.7:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines.

DOSE(kGy)	ALANATE-110	ALANATE-180	ALANATE-380
4	24429 ± 1307 <sup>1,a</sup>	17067 ± 547 <sup>4,b</sup>	17192 ± 707 <sup>7,b</sup>
8	38741 ± 599 <sup>2,c</sup>	35287 ± 1893 <sup>5,c</sup>	39344 ± 687 <sup>8,c</sup>
12	69305 ± 795 <sup>3,d</sup>	64735 ± 769 <sup>6,e</sup>	61076 ± 607 <sup>9,f</sup>

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

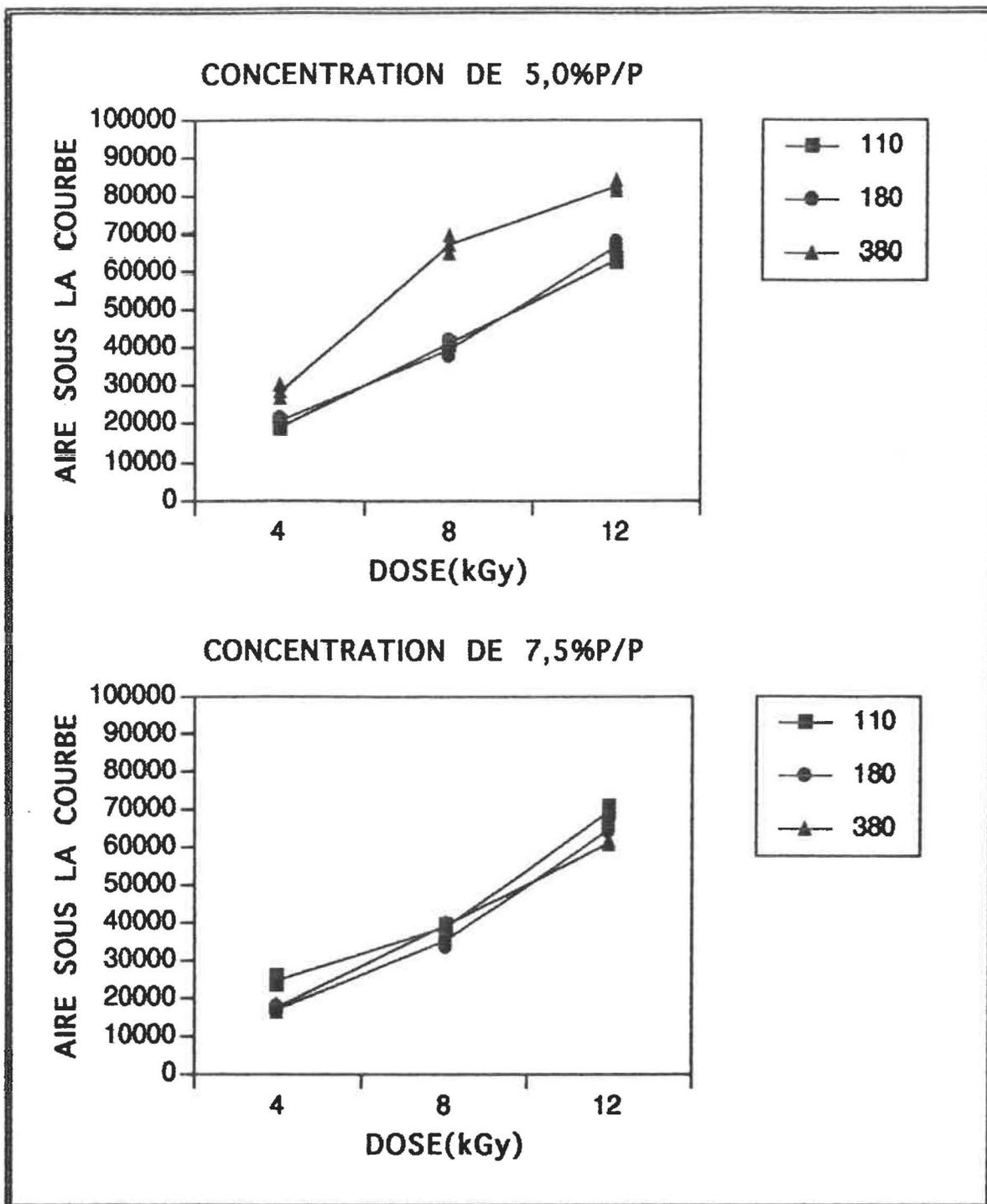


Figure 4.3: Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

#### 4.2.4 Dosage de tryptophane

L'oxydation d'une solution de résidus de tryptophane par les radicaux  $\cdot\text{OH}$  est directement relié à la perte d'intensité du signal de fluorescence. La figure 4.4 démontre l'influence de l'irradiation sur une solution de 500PPM de tryptophane.

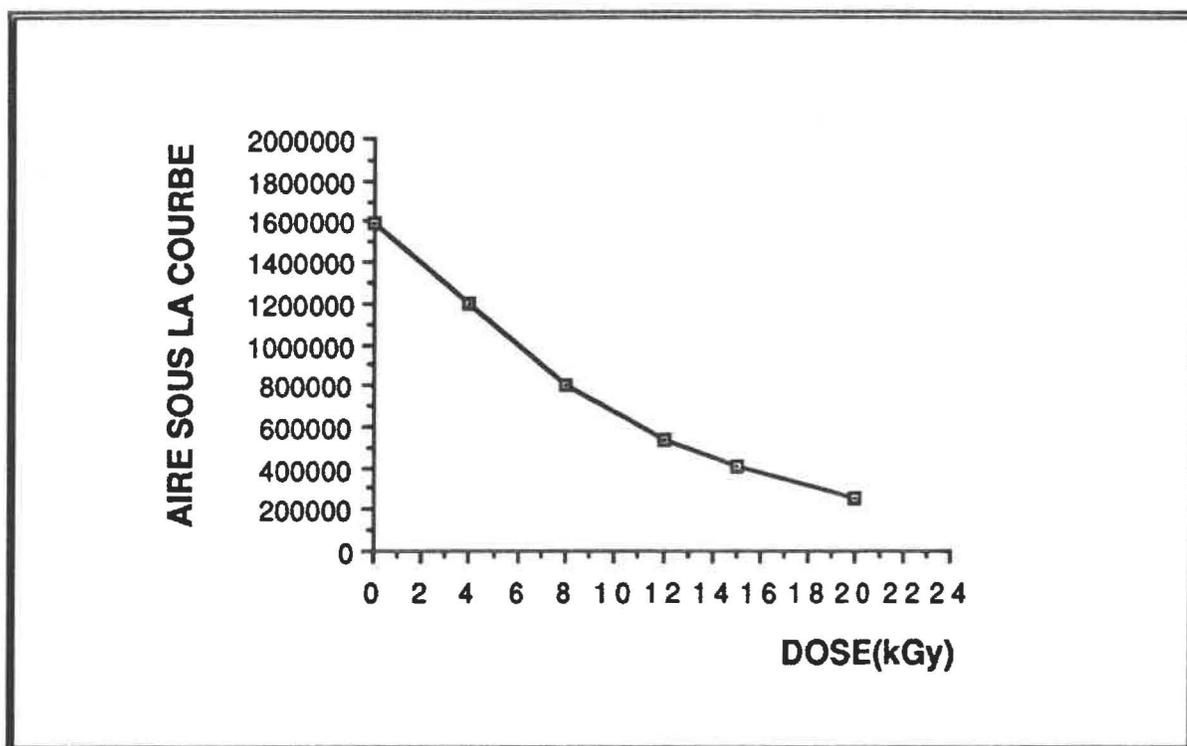


Figure 4.4: Oxydation du tryptophane en fonction de la dose d'irradiation.

Il n'y a pas de perte régulière et continue du signal en fonction de la dose d'irradiation lors des dosages des caséinates. Même si parfois une différence significative ( $P \leq 0,05$ ) est perçue entre les doses d'irradiation pour les trois caséinates, dans aucun cas, il n'y a

une baisse continue du signal. Cet état est perçu pour deux concentrations (voir tableaux 4.8 et 4.9 et figure 4.4).

**Tableau 4.8:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 5,0%P/P de protéines.

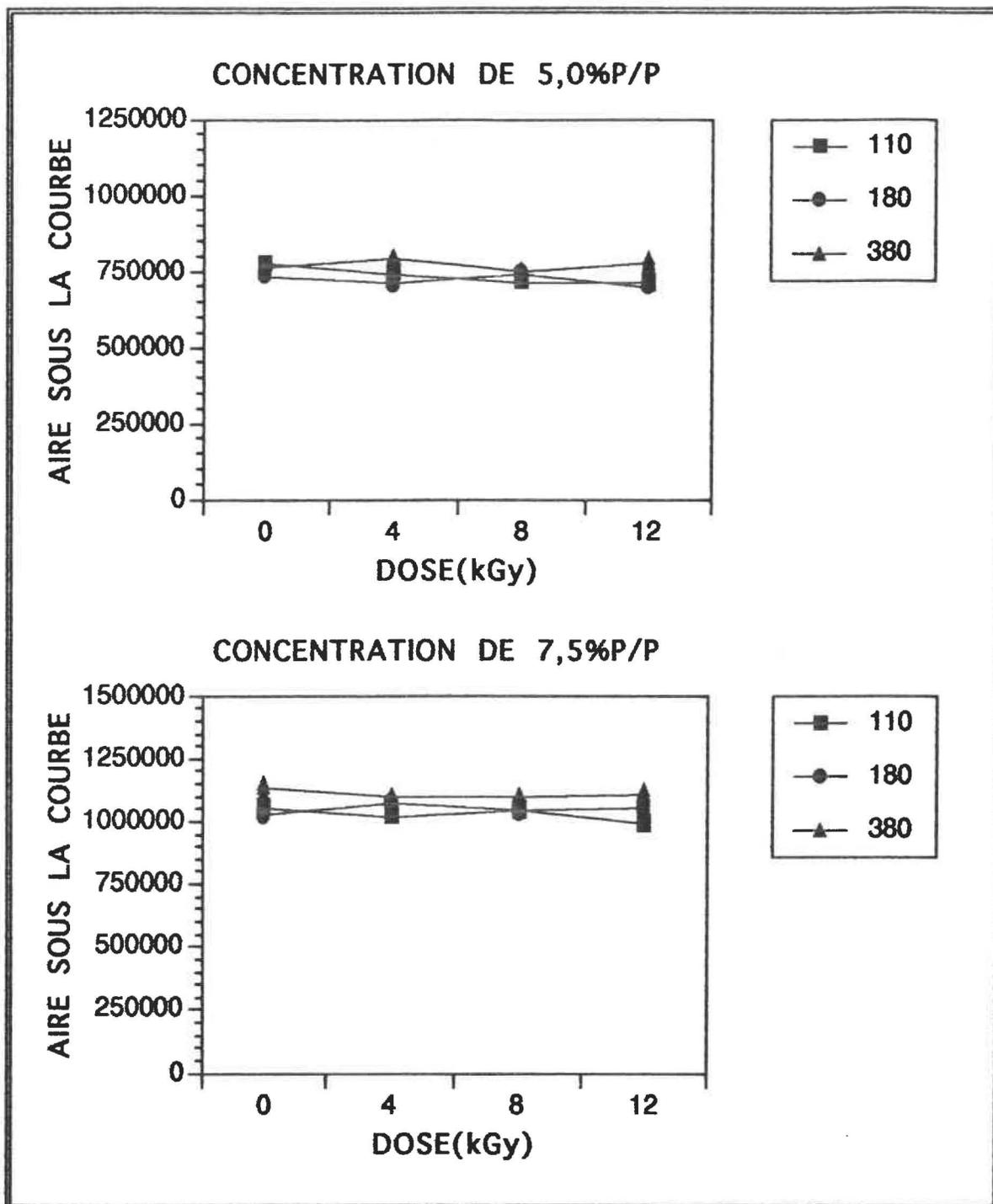
DOSE(kGy)	ALANATE-110	ALANATE-180	ALANATE-380
0	775511 ± 30471 <sup>1,a</sup>	733889 ± 32225 <sup>5,b</sup>	764770 ± 26938 <sup>8,c</sup>
4	742878 ± 35702 <sup>2,d</sup>	712041 ± 98166 <sup>6,e</sup>	793769 ± 16779 <sup>9,f</sup>
8	710587 ± 21223 <sup>3,g</sup>	741933 ± 26155 <sup>5,h</sup>	749959 ± 814910 <sup>10,h</sup>
12	712735 ± 76793 <sup>3,i</sup>	695793 ± 8417 <sup>7,j</sup>	778002 ± 10064 <sup>11,k</sup>

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.9:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à une concentration de 7,5%P/P de protéines.

DOSE(kGy)	ALANATE-110	ALANATE-180	ALANATE-380
0	1056499 ± 52311,a	1022490 ± 87655,b	1128405 ± 220518,c
4	1021131 ± 81832,d	1074262 ± 50766,e	1101364 ± 33659,f
8	1042411 ± 85183,g	1040796 ± 147925,7,g	1100961 ± 47139,h
12	988217 ± 75634,i	1054722 ± 137286,7,j	1108578 ± 140588,9,k

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).



**Figure 4.5:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue pour les alanates 110, 180 et 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

#### 4.2.5 Sélection de la protéine

Le comportement physico-chimique des solutions de protéines au cours du traitement à l'irradiation nous a permis de sélectionner l'extrait protéique le plus adéquat pour la fabrication d'un film. Pour ce faire, nous avons étudié: 1- les paramètres rhéologiques soit: la résistance jusqu'à la rupture et la déformation à la rupture 2- les paramètres chimiques soit: les taux de formation de bityrosine et de perte de tryptophane.

Les résultats obtenus pour le rapport F/E de la caséinate de calcium (alanate 380), à une concentration de 5,0%, sont légèrement supérieurs aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) pour les doses de 4, 8 et 12kGy. Par contre, à une concentration de 7,5%, le rapport F/E de la caséinate de calcium (alanate 380) est significativement supérieur ( $P \leq 0,05$ ) aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) à 4, 8 et 12kGy (voir tableaux 4.2 et 4.3 et figure 4.1).

Les résultats des mesures de la formation de bityrosine ont montrés qu'à une concentration de 5,0%, la caséinate de calcium (alanate 380) a démontré une production de bityrosine significativement supérieure ( $P \leq 0,05$ ) aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180); et ce, à 4, 8 et 12 kGy. Alors qu'à la concentration de 7,5%, la première caséinate de sodium (alanate 110) a produit significativement plus ( $P \leq 0,05$ ) de bityrosine aux doses de

4 et 12kGy. Alors qu'à 8kGy, les trois caséinates ont produit une quantité équivalente de bityrosine (voir tableaux 4.6 et 4.7 et figure 4.3).

Au cours de l'irradiation des solutions protéiques, l'observation des solutions nous a permis de constater que la viscosité des caséinates de sodium (alanates 110 et 180) augmente avec la dose d'irradiation. Cet état est perceptible au moment des manipulations lorsque les solutions sont traitées à 8 et 12kGy. À l'opposé, la viscosité de la caséinate de calcium (alanate 380) est quasi inchangée en fonction des doses d'irradiation.

Selon les tableaux 4.4 et 4.5 et la figure 4.2, les films protéiques formés sans agent plastifiant possèdent une faible capacité de déformation. Alors, la présence d'un agent plastifiant devient ainsi indispensable pour l'obtention d'un film avec un pouvoir déformant plus adéquat.

Alors, en accord avec les résultats précédents, nous avons choisi la caséinate de calcium (alanate 380) pour poursuivre les essais avec un agent plastifiant, soit le glycérol.

#### **4.3 L'EFFET DU GLYCÉROL SUR LA CASÉINATE DE CALCIUM**

Dans cette deuxième partie, l'influence du glycérol comme agent plastifiant a été étudiée. Pour se faire, les trois propriétés

mécaniques et les dosages de fluorescence ont été évalués pour fin de comparaison.

Sous certaines conditions de traitements, il est parfois difficile et voir même impossible d'obtenir des films. En autres, les films formés avec 5,0% de protéines et 5,0% de glycérol sans traitement radiatif.

#### **4.3.1 La force à la rupture**

La figure 4.5 et les tableaux 4.10 et 4.11 montrent que pour les concentrations de 5,0% et de 7,5%, le rapport F/E diminue avec l'augmentation du contenu en glycérol. Alors, une force moindre est nécessaire pour rompre le film lorsque le contenu en glycérol augmente.

À une concentration de 5,0% de protéines avec 0% de glycérol, le rapport F/E demeure élevé et stable (16.3 à 17.4) en fonction de la dose d'irradiation. À 1,0% de glycérol, le rapport varie entre 11.8 et 13.9 pour les doses de 0 à 12kGy et ces deux valeurs extrêmes sont considérées significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ) entre elles. Par contre, le rapport F/E augmente significativement ( $P \leq 0,05$ ) à 15 et 20kGy pour se situer 16.3 et 17.2 respectivement. À une concentration de 2,5% de glycérol, le rapport F/E croît significativement ( $P \leq 0,05$ ) avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Il passe de 5.6 à 12.1 et un maximum est atteint à la dose de 30kGy. Pour la concentration de

5,0% de glycérol, le rapport F/E augmente aussi significativement ( $P \leq 0,05$ ) en fonction de la dose d'irradiation. Il croît de 2.7 à 4.5 et atteint également son maximum à 30kGy. (voir tableau 4.10 et figure 4.5). Dans ces conditions, l'irradiation contribue à créer un film plus résistant.

Pour une concentration de 7,5% de protéines avec 0% ou 2,5% de glycérol, il y a peu de variation du rapport F/E pour les doses variant entre 0 à 12kGy. En effet, le rapport varie de 16.3 à 17.4 et de 10.4 à 11.2 pour 0% et 2,5% de glycérol respectivement. Par contre, à 2,5% de glycérol, le rapport F/E subi une hausse mais non significative ( $P > 0,05$ ) pour les doses de 15 et 20kGy. À 5,0% de glycérol, le rapport F/E augmente significativement ( $P \leq 0,05$ ) avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Il passe de 4.3 à 6.3 avec un maximum à 30kGy (voir tableau 4.11 et figure 4.5).

À une concentration de 5,0% de protéines, le rapport F/E diminue significativement ( $P \leq 0,05$ ) avec l'ajout de glycérol quelque soit sa concentration (1,0%, 2,5% et 5,0%) et ce, pour toutes les doses d'irradiation expérimentées. En présence de 7,5% de protéines, le même phénomène est observé pour les doses entre 0 et 20kGy.

À 5,0% de glycérol, on observe une hausse significative ( $P \leq 0,05$ ) de F/E avec l'augmentation du contenu en protéines et ce, pour toutes les doses d'irradiation. À 2,5% de glycérol, on observe le même phénomène sauf pour les échantillons traités à 15kGy.

**Tableau 4.10:** Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P.

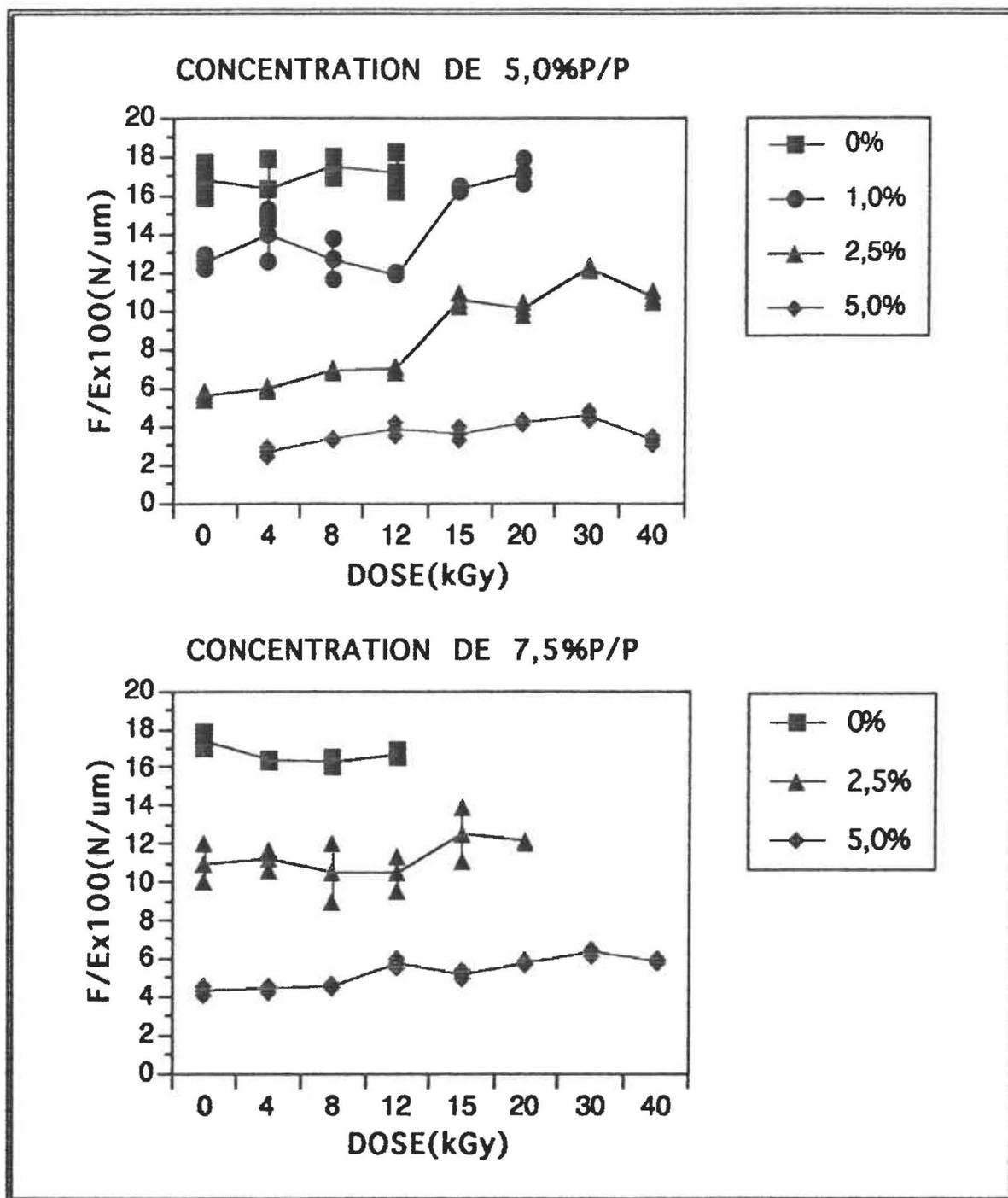
DOSE (kGy)	F/Ex100 (N/μm) 5,0%/0%	F/Ex100 (N/μm) 5,0%/1,0%	F/Ex100 (N/μm) 5,0%/2,5%	F/Ex100 (N/μm) 5,0%/5,0%
0	16.8 ± 0.91,a	12.5 ± 0.32,3,b	5.6 ± 0.25,c	-
4	16.3 ± 1.51,d	13.9 ± 1.33,e	5.9 ± 0.15,f	2.7 ± 0.210,g
8	17.4 ± 0.51,h	12.6 ± 1.12,3,i	6.9 ± 0.16,j	3.3 ± 0.111,12,k
12	17.2 ± 1.01,l	11.8 ± 0.12,m	7.0 ± 0,26,n	3.8 ± 0.411,13,o
15	-	16.3 ± 0.14,p	10.5 ± 0.47,q	3.6 ± 0.311,12,13,r
20	-	17.2 ± 0.64,s	10.1 ± 0.48,t	4.0 ± 0.313,u
30	-	-	12.1 ± 0.19,v	4.5 ± 0.314,w
40	-	-	10.7 ± 0.37,x	3.2 ± 0.312,y

Le terme F/E exprime le rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film. L'expression 5,0%/1,0% signifie 5,0% de protéines avec 1,0% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.11:** Rapport F/E en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P.

DOSE(kGy)	F/Ex100 (N/μm) 7,5%/0%	F/Ex100 (N/μm) 7,5%/2,5%	F/Ex100 (N/μm) 7,5%/5,0%
0	17.4 ± 0.4 <sup>1,a</sup>	11.0 ± 1.0 <sup>3,b</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>4,c</sup>
4	16.4 ± 0.0 <sup>2,d</sup>	11.2 ± 0.5 <sup>3,e</sup>	4.4 ± 0.2 <sup>4,f</sup>
8	16.3 ± 0.2 <sup>2,g</sup>	10.4 ± 1.5 <sup>3,h</sup>	4.6 ± 0.1 <sup>4,i</sup>
12	16.7 ± 0.2 <sup>2,j</sup>	10.5 ± 0.9 <sup>3,k</sup>	5.8 ± 0.2 <sup>5,l</sup>
15	-	12.5 ± 1.4 <sup>3,m</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>6,n</sup>
20	-	12.1 ± 0.1 <sup>3,o</sup>	5.7 ± 0.1 <sup>5,p</sup>
30	-	-	6.3 ± 0.1 <sup>7</sup>
40	-	-	5.9 ± 0.2 <sup>5</sup>

Le terme F/E exprime le rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film. L'expression 7,5%/2,5% signifie 7,5% de protéines avec 2,5% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).



**Figure 4.6:** Rapport F/E (rapport de la force de la rupture versus l'épaisseur du film) en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

### 4.3.2 La déformation à la rupture

Selon la figure 4.6 et les tableaux 4.12 et 4.13, la présence de glycérol augmente fortement le pouvoir déformant des films.

À 5,0% de protéines, la dose d'irradiation et l'ajout de 1,0% de glycérol n'apportent pas de changements importants au pouvoir déformant des films comparativement en absence de glycérol. La déformation varie de 2.2mm à 2.4mm et de 2.6mm à 2.9mm pour 0% et 1,0% de glycérol respectivement. Alors qu'à 2,5% et 5,0% de glycérol, la capacité déformante croît significativement ( $P \leq 0,05$ ) avec l'augmentation de la dose d'irradiation. La déformation varie de 5.7mm à 7.4mm pour 2,5% de glycérol et de 7.6mm à 10.8mm pour 5,0% de glycérol. Un maximum est atteint entre 20 et 30kGy pour ces deux concentrations de glycérol (voir tableau 4.12 et figure 4.7). Donc, l'irradiation contribue à améliorer le pouvoir déformant des films. La différence entre la déformation et les trois concentrations de glycérol est considérée significative ( $P \leq 0,05$ ) à toutes les doses d'irradiation.

Pour une concentration de 7,5% de protéines, la présence de 2,5% de glycérol n'apporte pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) dans la déformation en fonction des doses d'irradiation (0 à 20kGy). La déformation varie de 3.8mm à 4.2mm entre les doses de 0 et 20kGy. Par contre, la différence de déformation entre 0% et 2,5% de glycérol est considérée significative ( $P \leq 0,05$ ) pour les doses de 0 à 12kGy.

Avec l'ajout de 5,0% de glycérol, la déformation est significativement plus élevée ( $P \leq 0,05$ ) qu'en présence de 2,5% ou en absence de glycérol. Les valeurs de déformation varient de 7.7mm à 11.6mm en fonction des doses d'irradiation avec une valeur maximale vers 15 à 20kGy (voir tableau 4.13 et figure 4.7).

À 2,5% de glycérol, la déformation à 5,0% de protéines est significativement supérieure ( $P \leq 0,05$ ) qu'à 7,5% de protéines pour les doses de 0 à 20kGy (voir tableaux 4.12 et 4.13).

Pour une concentration de 5,0% de glycérol, il y a une différence significative ( $P \leq 0,05$ ) de la déformation entre les deux concentrations de protéines. La déformation est supérieure à 7,5% de protéines comparativement à 5,0% pour les doses de 4, 8, 15, 20 et 40kGy. Elle est significativement supérieure ( $P \leq 0,05$ ) aux doses de 8, 15 et 40kGy. À 12 et 30kGy, la déformation à 7,5% de protéines est inférieure à celle obtenue à 5,0% (voir tableaux 4.12 et 4.13). Cependant, cette différence est significativement inférieure ( $P \leq 0,05$ ) seulement à 12kGy.

Donc, la déformation en fonction de la dose est plus élevée en présence de 5,0% de glycérol et ce, pour les deux concentrations de protéines. L'effet de la dose d'irradiation sur la déformation est plus marquée en présence de 7,5% de protéines et 5,0% de glycérol. En présence de 2,5% de glycérol et 5,0% de protéines, la déformation

subit une légère hausse en fonction de la dose mais celle-ci est considérée significative ( $P \leq 0,05$ ).

**Tableau 4.12:** Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P.

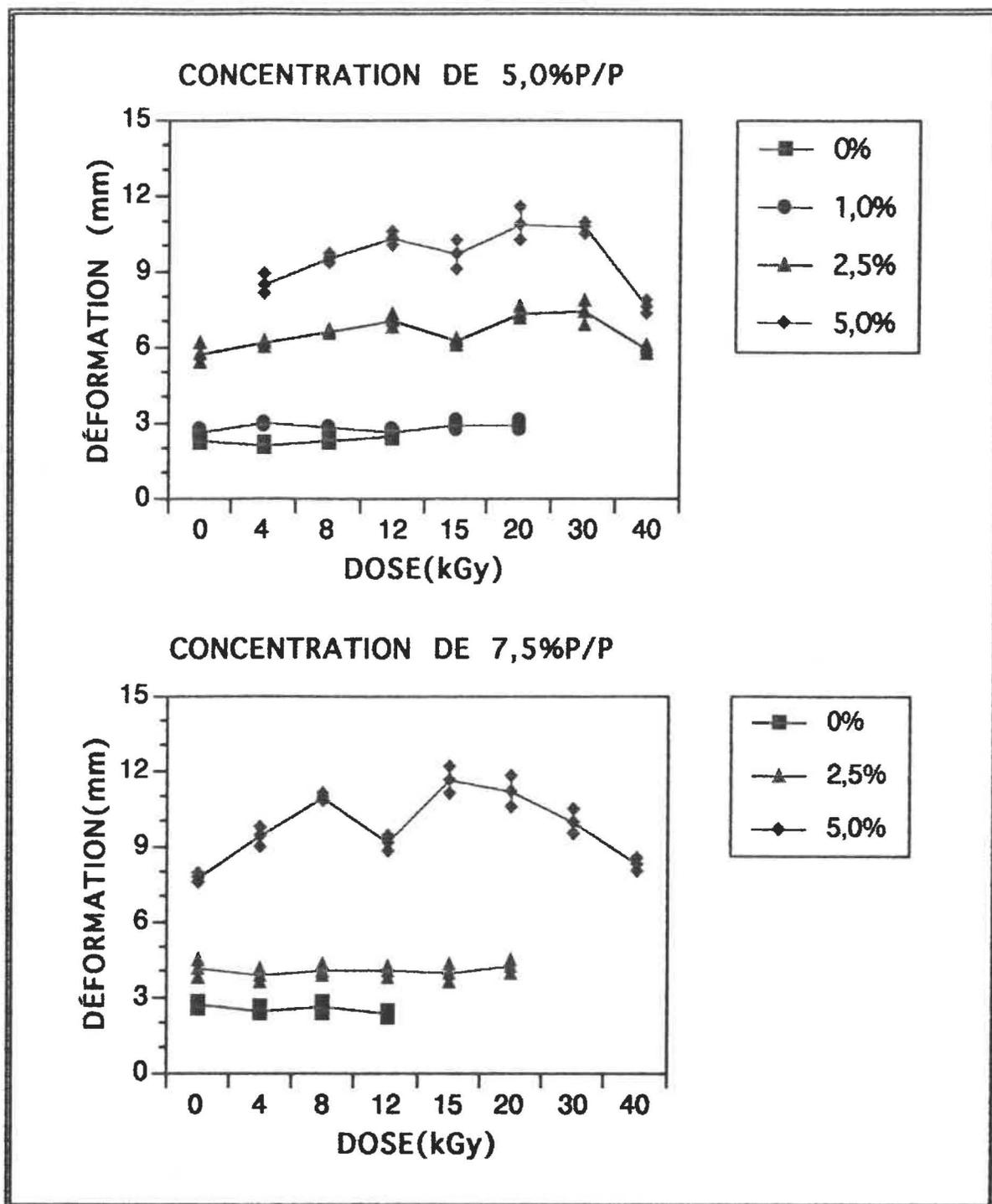
DOSE (kGy)	DÉFORMATION (mm) 5,0%/0%	DÉFORMATION (mm) 5,0%/1,0%	DÉFORMATION (mm) 5,0%/2,5%	DÉFORMATION (mm) 5,0%/5,0%
0	2.3 ± 0.1 <sup>1,2,a</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>3,a</sup>	5.7 ± 0.4 <sup>6,b</sup>	-
4	2.2 ± 0.1 <sup>1,c</sup>	2.9 ± 0.1 <sup>4,d</sup>	6.1 ± 0.2 <sup>6,7,e</sup>	8.5 ± 0.4 <sup>10,f</sup>
8	2.3 ± 0.2 <sup>1,2,g</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>3,4,5,h</sup>	6.6 ± 0.1 <sup>7,8,i</sup>	9.5 ± 0.1 <sup>11,j</sup>
12	2.4 ± 0.1 <sup>2,k</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>3,5,k</sup>	7.0 ± 0.3 <sup>8,9,l</sup>	10.3 ± 0.3 <sup>12,13,m</sup>
15	-	2.9 ± 0.2 <sup>4,5,n</sup>	6.2 ± 0.2 <sup>6,7,o</sup>	9.6 ± 0.6 <sup>11,12,p</sup>
20	-	2.9 ± 0.2 <sup>4,q</sup>	7.3 ± 0.3 <sup>9,r</sup>	10.8 ± 0.7 <sup>13,s</sup>
30	-	-	7.4 ± 0.5 <sup>9,t</sup>	10.7 ± 0.2 <sup>13,u</sup>
40	-	-	5.9 ± 0.2 <sup>6,v</sup>	7.6 ± 0.3 <sup>14,w</sup>

L'expression 5,0%/1,0% signifie 5,0% de protéines avec 1,0% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.13:** Déformation à la rupture en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P.

DOSE (kGy)	DÉFORMATION (mm) 7,5%/0%	DÉFORMATION (mm) 7,5%/2,5%	DÉFORMATION (mm) 7,5%/5,0%
0	2.7 ± 0.11, <sup>a</sup>	4.1 ± 0.43, <sup>b</sup>	7.7 ± 0.24, <sup>c</sup>
4	2.5 ± 0.11, <sup>2,d</sup>	3.8 ± 0.33, <sup>e</sup>	9.4 ± 0.55, <sup>6,f</sup>
8	2.6 ± 0.21, <sup>2,g</sup>	4.0 ± 0.33, <sup>h</sup>	11.0 ± 0.17, <sup>i</sup>
12	2.3 ± 0.22, <sup>j</sup>	4.0 ± 0.33, <sup>k</sup>	9.1 ± 0.35, <sup>l</sup>
15	-	3.9 ± 0.43, <sup>m</sup>	11.6 ± 0.67, <sup>n</sup>
20	-	4.2 ± 0.23, <sup>o</sup>	11.2 ± 0.67, <sup>p</sup>
30	-	-	10.0 ± 0.5 <sup>6</sup>
40	-	-	8.3 ± 0.3 <sup>4</sup>

L'expression 7,5%/2,5% signifie 7,5% de protéines avec 2,5% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).



**Figure 4.7:** Déformation en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

### 4.3.3 La viscoélasticité

Une particularité recherchée dans un film est son pouvoir élastique c'est-à-dire un film possédant un faible coefficient de relaxation. Selon les résultats de relaxation, les films irradiés de caséinate de calcium (alanate 380) sont des produits viscoélastiques avec un coefficient de relaxation variant entre 0,57 à 0,69 selon la composition des films (voir tableau 4.14 et figure 4,8).

Seul les films pouvant se déformer à plus de trois millimètres (3,0mm) peuvent être étudiés car la viscoélasticité est mesurée suite à une déformation maintenue de 3,0mm. Dans le cas présent, trois compositions de milieux ont été retenues, soit 5,0% de protéines avec 2,5% et 5,0% de glycérol et 7,5% de protéines avec 5,0% de glycérol.

Pour une concentration de 5,0% de protéines avec 2,5% et 5,0% de glycérol, l'irradiation a tendance à produire un film plus élastique car les coefficients de relaxation diminuent significativement ( $P \leq 0,05$ ) avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Les valeurs de coefficients varient de 0,66 à 0,61 et de 0,63 à 0,57 pour des concentrations de 2,5% et 5,0% de glycérol respectivement. Un coefficient de relaxation minimal est obtenu entre 30 et 40kGy pour ces deux concentrations de glycérol (voir tableau 4.14 et figure 4,8). La différence entre les deux concentrations de glycérol est significative ( $P \leq 0,05$ ) à toutes les doses d'irradiation à l'exception

des doses de 15 et 20kGy. Ainsi, l'addition de 5,0% de glycérol produit un film plus élastique avec un coefficient de relaxation plus faible.

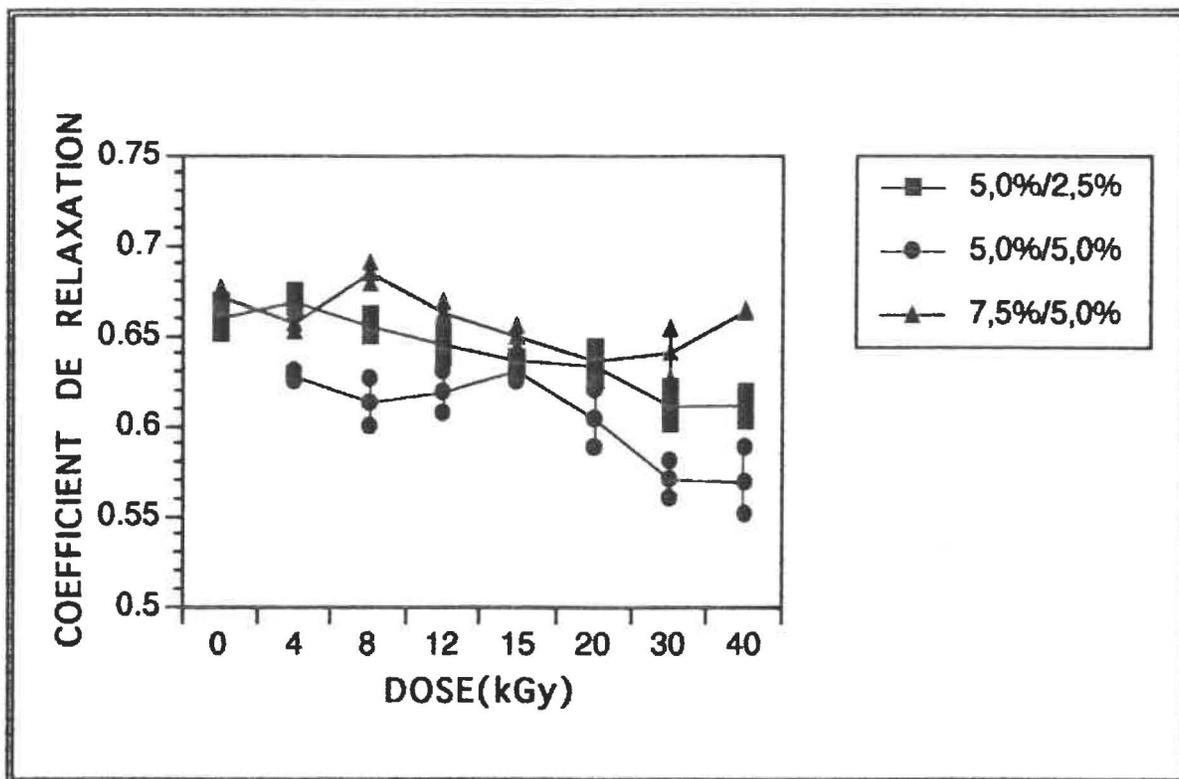
Avec une concentration de 7,5% de protéines et 5,0% de glycérol, l'irradiation tend à abaisser significativement ( $P \leq 0,05$ ) le coefficient de relaxation sauf lorsqu'on irradie à 8kGy où une valeur maximale est atteinte. Les valeurs de coefficients varient de 0.67 à 0.63 en fonction des doses d'irradiation. Alors, l'irradiation contribue à produire un film plus élastique avec une valeur minimale suite à un traitement se situant entre 20 et 40kGy (voir tableau 4.14 et figure 4.8).

À 5,0% de glycérol, les coefficients de relaxation à 5,0% de protéines sont significativement inférieurs ( $P \leq 0,05$ ) à ceux obtenus à 7,5% de protéines et ce, pour toutes les doses d'irradiation.

**Tableau 4.14:** Coefficients de relaxation en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

DOSE(kGy)	5,0%/2,5%	5,0%/5,0%	7,5%/5,0%
0	0.66 ± 0.01 <sup>1,2</sup>	-	0.67 ± 0.01 <sup>10</sup>
4	0.67 ± 0.00 <sup>1,a</sup>	0.63 ± 0.00 <sup>7,b</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>11,12,c</sup>
8	0.66 ± 0.01 <sup>2,3,d</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>7,8,e</sup>	0.69 ± 0.01 <sup>13,f</sup>
12	0.65 ± 0.01 <sup>3,4,g</sup>	0.62 ± 0.01 <sup>7,8,h</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>10,11,i</sup>
15	0.64 ± 0.00 <sup>4,5,j</sup>	0.63 ± 0.01 <sup>7,j</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>12,14,k</sup>
20	0.63 ± 0.01 <sup>5,l</sup>	0.60 ± 0.02 <sup>8,l</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>15,m</sup>
30	0.61 ± 0.01 <sup>6,n</sup>	0.57 ± 0.01 <sup>9,o</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>14,15,p</sup>
40	0.61 ± 0.01 <sup>6,q</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>9,r</sup>	0.63 ± 0.00 <sup>15,s</sup>

L'expression 5,0%/2,5% signifie 5,0% de protéines avec 2,5% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). L'évaluation statistique à 5,0% de glycérol est faite seulement pour une concentration de 5,0% et 7,5% de protéines.



**Figure 4.8:** La viscoélasticité en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P. L'expression 5,0%/2,5% signifie 5,0% de protéines avec 2,5% de glycérol.

#### 4.3.4 Taux de formation de bityrosine

La valeur moyenne obtenue à 0kGy a été soustraite de celles obtenues aux différentes doses d'irradiation dans le but d'obtenir le taux réel de formation de bityrosine.

Le taux de formation de bityrosine croît proportionnellement avec l'augmentation de la dose d'irradiation pour les deux

concentrations de protéines (voir tableaux 4.15 et 4.16 et figure 4.9). Le taux de formation de bityrosine augmente de 23 000 à 350 000 (en unité de surface arbitraire) pour des doses variant de 4 à 40kGy et ce, pour les deux concentrations de protéines.

Pour une concentration de 5,0% de protéines, le taux de formation de bityrosine est significativement supérieur ( $P \leq 0,05$ ) en présence de glycérol (1,0%, 2,5% et 5,0%) comparativement à son absence (0%) pour les doses de 15 et 20kGy (voir tableau 4.15). Alors qu'à 7,5% de protéines, la présence de glycérol (2,5% et 5,0%) augmente significativement ( $P \leq 0,05$ ) le taux de formation de bityrosine pour les doses de 4 à 20kGy (voir tableau 4.16 et figure 4.9). On note de plus, qu'en présence de 2,5% de glycérol, le taux de formation de bityrosine dans l'échantillon de 7,5% de protéines a doublé par rapport à l'échantillon contenant 5,0% de protéines (43513 vs 20503) et lorsque celles-ci est irradiée à 4kGy (voir tableaux 4.15 et 4.16). On note une augmentation d'environ 10% du contenu en bityrosine lorsque les échantillons protéiques (5,0% et 7,5%) sont irradiés à 20kGy en absence et en présence de 2,5% de glycérol. Par contre, il n'y a pas de relation entre le taux de formation de bityrosine et la concentration en protéines en présence de 5,0% de glycérol.

Comme le glycérol seul dans le tampon n'absorbe pas et n'émet pas aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission utilisées, il semble favoriser positivement la formation de bityrosine. Il existe une relation linéaire entre le taux de formation de bityrosine et les

doses d'irradiation pour les différents mélanges protéine-glycérol expérimentés.

**Tableau 4.15:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P.

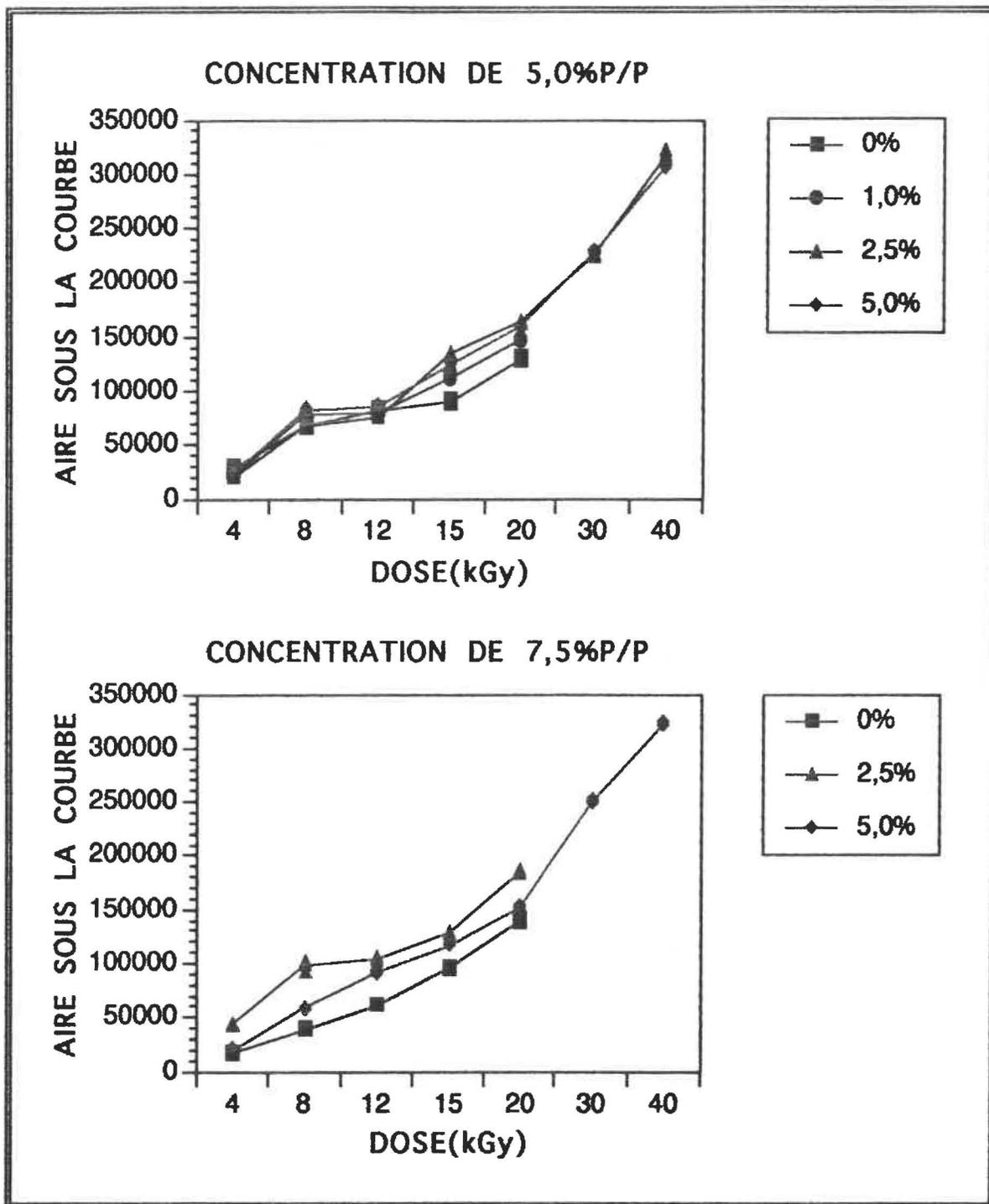
DOSE (kGy)	5,0%/0%	5,0%/1,0%	5,0%/2,5%	5,0%/5,0%
4	28552 ± 1621 <sup>1,a</sup>	21836 ± 1484 <sup>6,bc</sup>	20503 ± 941 <sup>11,b</sup>	23126 ± 1482 <sup>18,c</sup>
8	66803 ± 2391 <sup>2,d</sup>	76436 ± 1006 <sup>7,e</sup>	66439 ± 1805 <sup>12,d</sup>	81304 ± 2395 <sup>19,f</sup>
12	82504 ± 1650 <sup>3,g</sup>	79531 ± 1964 <sup>8,h</sup>	75782 ± 1206 <sup>13,i</sup>	85465 ± 1392 <sup>20,j</sup>
15	89584 ± 1817 <sup>4,k</sup>	113309 ± 2249 <sup>9,l</sup>	134112 ± 1328 <sup>14,m</sup>	125394 ± 1551 <sup>21,n</sup>
20	129044 ± 931 <sup>5,o</sup>	146654 ± 1511 <sup>10,p</sup>	163519 ± 1126 <sup>15,q</sup>	158853 ± 1289 <sup>22,r</sup>
30	-	-	254378 ± 1440 <sup>16,s</sup>	256610 ± 2398 <sup>23,s</sup>
40	-	-	348299 ± 4022 <sup>17,t</sup>	336676 ± 2254 <sup>24,u</sup>

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. L'expression 5,0%/2,5% signifie 5,0% de protéines avec 2,5% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.16:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P.

DOSE(kGy)	7,5%/0%	7,5%/2,5%	7,5%/5,0%
4	17192 ± 16211, <sup>a</sup>	43513 ± 1328 <sup>6</sup> , <sup>b</sup>	20803 ± 928 <sup>11</sup> , <sup>c</sup>
8	39344 ± 6872, <sup>d</sup>	97240 ± 4388 <sup>7</sup> , <sup>e</sup>	57961 ± 897 <sup>12</sup> , <sup>f</sup>
12	61076 ± 607 <sup>3</sup> , <sup>g</sup>	103811 ± 1653 <sup>8</sup> , <sup>h</sup>	92734 ± 1901 <sup>13</sup> , <sup>i</sup>
15	95587 ± 1252 <sup>4</sup> , <sup>j</sup>	128415 ± 1232 <sup>9</sup> , <sup>k</sup>	117110 ± 1398 <sup>14</sup> , <sup>l</sup>
20	139249 ± 1697 <sup>5</sup> , <sup>m</sup>	184986 ± 1581 <sup>10</sup> , <sup>n</sup>	151133 ± 1653 <sup>15</sup> , <sup>o</sup>
30	-	-	290277 ± 1848 <sup>16</sup>
40	-	-	362756 ± 1564 <sup>17</sup>

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. L'expression 7,5%/2,5% signifie 7,5% de protéines avec 2,5% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).



**Figure 4.9:** Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

#### 4.3.5 Dosage de tryptophane

En présence de glycérol, le taux de perte de tryptophane due au traitement à l'irradiation est significatif ( $p \leq 0,05$ ), c'est-à-dire qu'une baisse du signal de fluorescence est perçue avec l'augmentation de la dose d'irradiation (voir tableaux 4.17 et 4.18 et figure 4.10).

À 5,0% de concentration de protéines, la baisse du signal est significative ( $P \leq 0,05$ ) en présence de glycérol (1,0%, 2,5% et 5,0%) comparativement à son absence pour les doses variant de 4 à 20kGy. Le signal varie d'environ 760 000 à 560 000 entre 0 et 20kGy et diminue jusqu'à environ 470 000 pour la dose de 40kGy lorsque les dosages se font sur des milieux en présence de glycérol (1,0%, 2,5% et 5,0%). Toutefois, il n'y a pas de perte régulière et continue du signal en fonction de la dose d'irradiation à 0% de glycérol. Le signal moyen obtenu entre 0 et 20kGy est de 778 000 pour une concentration en protéines de 5,0%. Même si parfois une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) est perçue entre les doses d'irradiation à 0% de glycérol, il n'y a pas de baisse constante du signal. Ainsi, le signal perçu à 0% de glycérol est significativement supérieur ( $p \leq 0,05$ ) à celui perçu en présence de glycérol pour des doses d'irradiation supérieures ou équivalente à 4kGy (voir tableau 4.17 et figure 4.10)

À des doses supérieures ou équivalentes à 15kGy, la présence de glycérol favorise une diminution du signal obtenu dans les solutions à 5,0% de protéines. Cette baisse de signal semble être plus importante

avec l'augmentation du contenu en glycérol. Elle devient cependant significative ( $P \leq 0,05$ ) entre 5,0% et 2,5% de glycérol pour les doses de 30 et 40kGy (voir tableau 4.17 et figure 4.10).

À 7,5% de protéines, la perte du signal en présence de glycérol est significative ( $P \leq 0,05$ ) à 12, 15 et 20kGy en présence de 2,5% et 5,0% de glycérol comparativement à son absence. En présence de glycérol (2,5% ou 5,0%), le signal varie d'environ 1 115 000 à 900 000 entre 0 et 20kGy et diminue jusqu'à 814 000 pour la dose de 40kGy à 5,0% de glycérol. Par contre, en absence de glycérol, il n'y a pas de perte régulière et continue du signal lors de l'irradiation. Un signal moyen de 1 122 000 est obtenu pour les doses d'irradiation de 0 à 20kGy. Ainsi, le signal obtenu en absence de glycérol est significativement supérieur ( $P \leq 0,05$ ) à celui obtenu en sa présence pour les doses d'irradiation supérieures à 8kGy (voir tableau 4.18 et figure 4.10).

Pour une dose d'irradiation équivalente ou supérieures à 12kGy, le signal perçu à 7,5% de protéines est significativement inférieur ( $P \leq 0,05$ ) en présence 5,0% de glycérol que 2,5% de glycérol (voir tableau 4.18 et figure 4.10).

**Tableau 4.17:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 5,0%P/P.

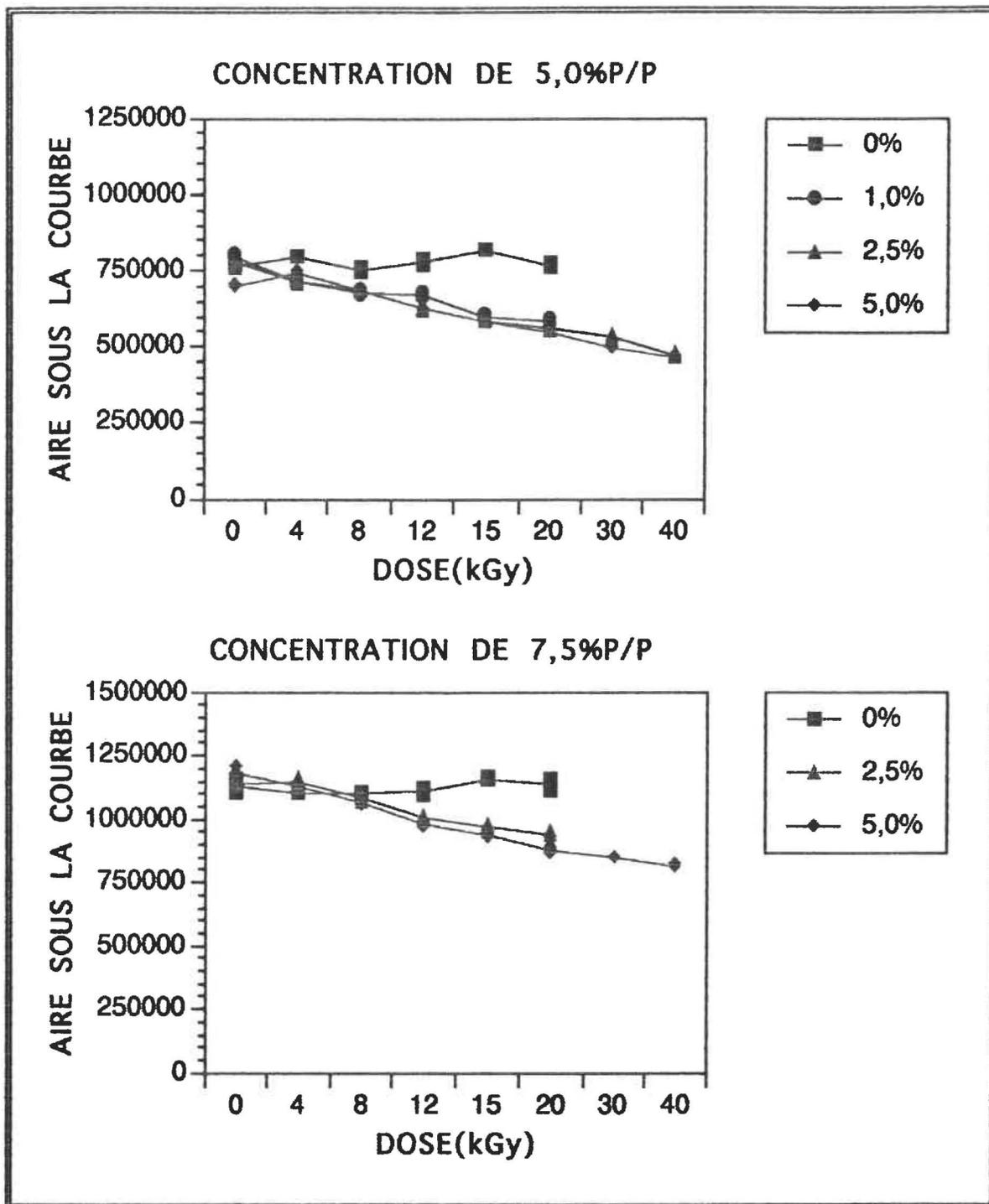
DOSE (kGy)	5,0%/0%	5,0%/1,0%	5,0%/2,5%	5,0%/5,0%
0	764770 ± 26931,a	796315 ± 38946,b	782666 ± 2332610,ab	700887 ± 424518,c
4	793769 ± 16772,d	710132 ± 23617,e	714711 ± 622111,e	739892 ± 1031519,f
8	749959 ± 81493,g	677805 ± 70188,h	686849 ± 374312,h	684373 ± 752120,h
12	778002 ± 100644,i	669722 ± 101828,j	623320 ± 465313,k	623178 ± 216421,k
15	814920 ± 24475,l	585219 ± 28669,m	585219 ± 286614,m	583052 ± 155922,m
20	765954 ± 96121,n	579666 ± 74509,o	561248 ± 1183015,p	546316 ± 332023,p
30	-	-	531297 ± 592816,q	494688 ± 213624,r
40	-	-	471847 ± 494317,s	466259 ± 320825,t

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. L'expression 5,0%/2,5% signifie 5,0% de protéines avec 2,5% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).

**Tableau 4.18:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à une concentration en protéines de 7,5%P/P.

DOSE(kGy)	7,5%/0%	7,5%/2,5%	7,5%/5,0%
0	1128405 ± 220511,a	1140330 ± 125214,ab	1179255 ± 313389,b
4	1101364 ± 33652,c	1146510 ± 204644,d	1131341 ± 869910,d
8	1100961 ± 47132,e	1081601 ± 164865,ef	1070098 ± 1430811,f
12	1108578 ± 140581,2,g	1006871 ± 71536,h	980093 ± 1077012,i
15	1158964 ± 53723,j	972919 ± 53387,k	935709 ± 841713,l
20	1133910 ± 219261,3,m	934142 ± 75918,n	876339 ± 955714,o
30	-	-	847660 ± 346915
40	-	-	814091 ± 1128216

Il n'y a pas d'unité car ces taux sont mesurés par l'aire sous les courbes obtenues. L'expression 7,5%/2,5% signifie 7,5% de protéines avec 2,5% de glycérol. Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ). Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ( $P > 0.05$ ).



**Figure 4.10:** Dosage de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation reçue et du contenu en glycérol pour l'alanate 380 à des concentrations en protéines de 5,0%P/P et 7,5%P/P.

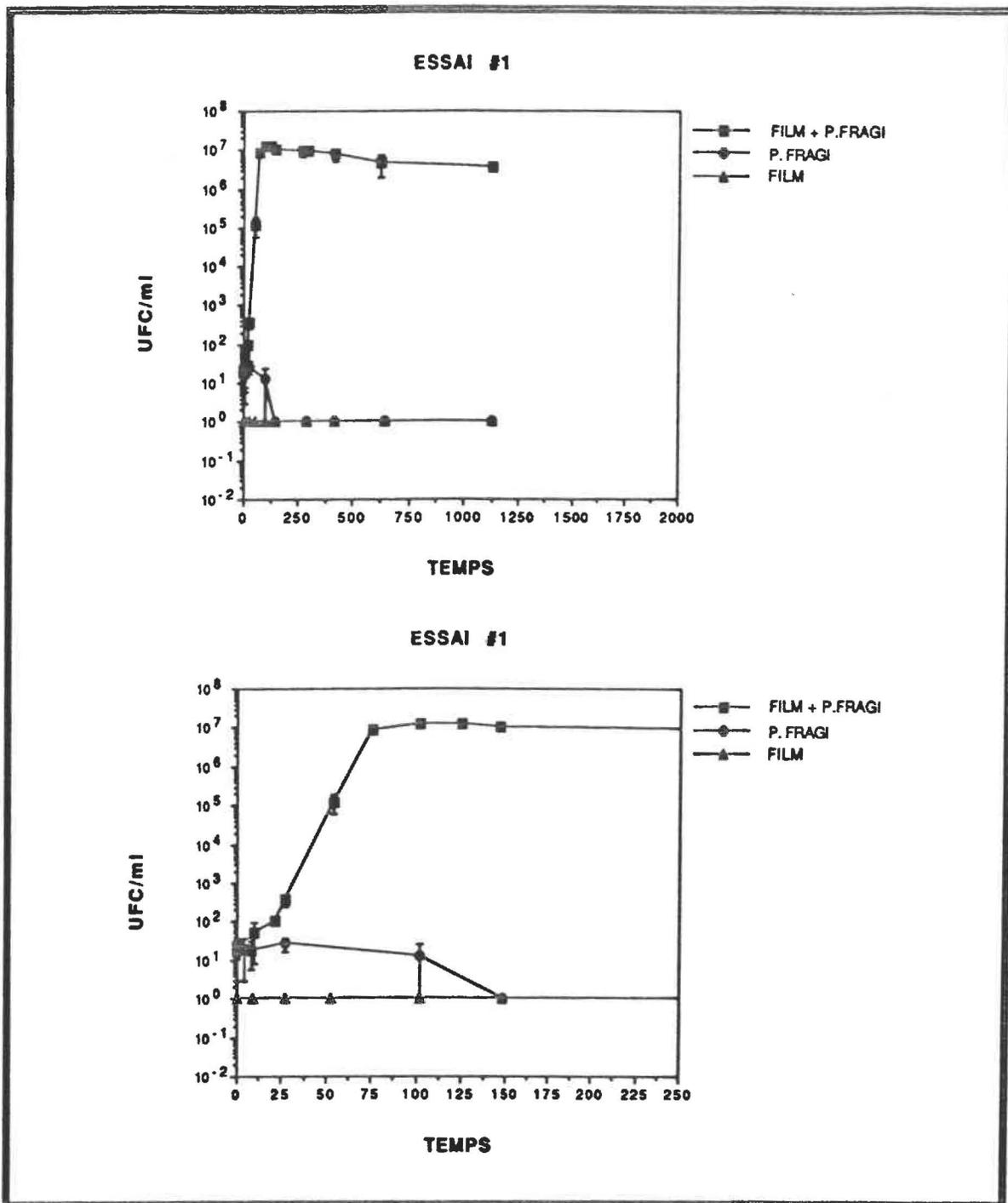
#### 4.4 LA BIODÉGRADABILITÉ

Dans cette section, les résultats de la biodégradabilité d'un type de film seront présentés. Les essais ont été répétés en triplicata et ce, à trois reprises.

Les résultats du premier essai montrent que lorsque *P.fragi* est en contact avec le film, la croissance bactérienne est rapide et un maximum de population (environ  $10^7$ UFC/ml de milieu) est atteint après environ 80 heures d'agitation (voir tableau 4.19 et figure 4.11). La population tend à diminuer très lentement en fonction du temps et celle-ci est restée supérieure à  $10^6$ UFC/ml après 1127 heures d'expérimentation. Par contre, en absence de film, la population est demeurée sensiblement la même à 20UFC/ml pour les 100 premières heures. Par la suite, elle décroît et demeure  $< 5$ UFC/ml jusqu'à la fin. En présence unique de film, la population bactérienne est  $< 5$ UFC/ml du début à la fin de l'expérimentation.

**Tableau 4.19:** Résultats des dénombrements de l'essai #1 de *Pseudomonas fragi* en présence et/ou en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy.

TEMPS (h)	<i>P.fragi</i> AVEC FILM (UFC/ml)	<i>P.fragi</i> SEUL (UFC/ml)	FILM SEUL (UFC/ml)
0	23 ± 12	15 ± 12	< 5
4	20 ± 17	-	-
8	18 ± 12	-	-
9	-	-	< 5
10	53 ± 45	-	-
21	100 ± 18	-	-
27	370 ± 120	27 ± 10	< 5
53	-	-	< 5
54	12x10 <sup>4</sup> ± 61x10 <sup>3</sup>	-	-
76	89x10 <sup>5</sup> ± 18x10 <sup>5</sup>	-	-
102	12x10 <sup>6</sup> ± 24x10 <sup>5</sup>	13 ± 13	< 5
125	12x10 <sup>6</sup> ± 23x10 <sup>5</sup>	-	-
146	10.4x10 <sup>6</sup> ± 16x10 <sup>5</sup>	-	-
148	-	< 5	< 5
267	92x10 <sup>5</sup> ± 27x10 <sup>5</sup>	-	-
287	-	< 5	< 5
293	93x10 <sup>5</sup> ± 22x10 <sup>5</sup>	-	-
413	77x10 <sup>5</sup> ± 24x10 <sup>5</sup>	-	-
414	-	< 5	< 5
624	46x10 <sup>5</sup> ± 26x10 <sup>5</sup>	-	-
646	-	< 5	< 5
1127	36x10 <sup>5</sup> ± 87x10 <sup>4</sup>	< 5	< 5

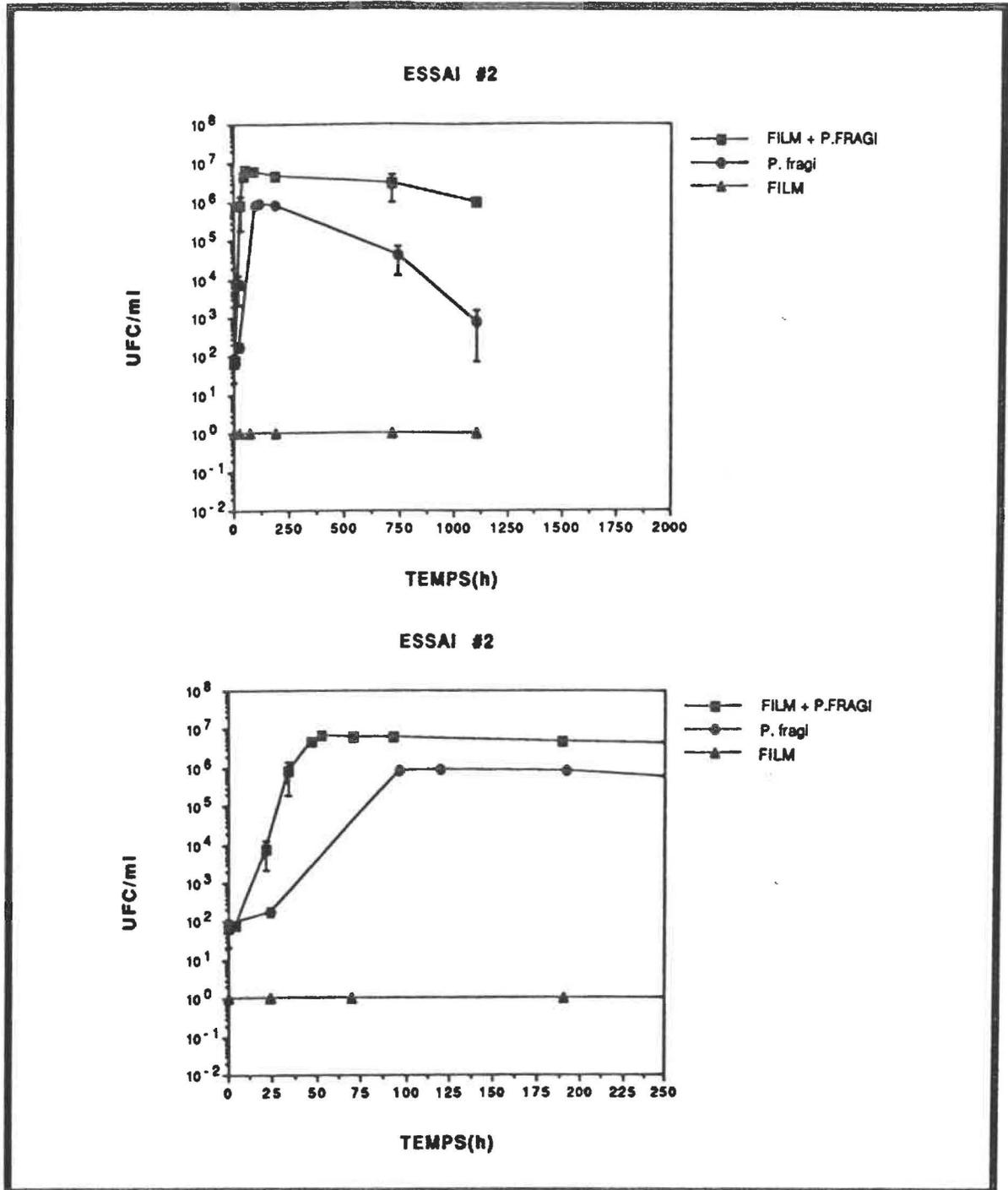


**Figure 4.11:** Essai #1 de la croissance de *Pseudomonas fragi* en présence et en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy. Deuxième graphique avec échelle réduite en abscisse.

Dans le deuxième essai, la croissance bactérienne est rapide en présence du film et un maximum (environ  $10^7$ UFC/ml) est atteint après environ 60 heures d'agitation (voir tableau 4.20 et figure 4.12). La population maximale a été atteinte plus rapidement mais la population initiale était de 70UFC/ml comparativement à 20UFC/ml pour le premier essai. La population ne diminue que très faiblement en fonction du temps et demeure à  $10^6$ UFC/ml après 1102 heures d'agitation. En absence de film, la population initiale (70UFC/ml) augmente après 24 heures d'agitation pour atteindre un maximum d'environ  $10^6$ UFC/ml après une centaine d'heures d'agitation. Par la suite, la population diminue régulièrement en fonction du temps pour atteindre environ de  $10^3$ UFC/ml après 1102 heures (voir tableau 4.20 et figure 4.12). En présence seul de film, le décompte bactérien est  $< 5$  UFC/ml sur toute la durée de l'expérimentation

**Tableau 4.20:** Résultats des dénombrements de l'essai #2 de *Pseudomonas fragi* en présence et/ou en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy.

TEMPS (h)	<i>P.fragi</i> AVEC FILM (UFC/ml)	<i>P.fragi</i> SEUL (UFC/ml)	FILM SEUL (UFC/ml)
0	67 ± 45	87 ± 27	< 5
4	83 ± 22	-	-
21	7400 ± 5300	-	-
24	-	180 ± 44	< 5
34	81x10 <sup>4</sup> ± 62x10 <sup>4</sup>	-	-
47	48x10 <sup>5</sup> ± 12x10 <sup>5</sup>	-	-
53	66x10 <sup>5</sup> ± 67x10 <sup>4</sup>	-	-
70	-	-	< 5
71	62x10 <sup>5</sup> ± 14x10 <sup>5</sup>	-	-
93	64x10 <sup>5</sup> ± 64x10 <sup>4</sup>	-	-
96	-	83x10 <sup>4</sup> ± 14x10 <sup>4</sup>	-
120	-	91x10 <sup>4</sup> ± 13x10 <sup>4</sup>	-
189	47x10 <sup>5</sup> ± 10x10 <sup>5</sup>	-	-
190	-	-	< 5
192	-	80x10 <sup>4</sup> ± 69x10 <sup>3</sup>	
720	31x10 <sup>5</sup> ± 21x10 <sup>5</sup>	-	< 5
746	-	43x10 <sup>3</sup> ± 30x10 <sup>3</sup>	-
1102	99x10 <sup>4</sup> ± 26x10 <sup>4</sup>	800 ± 730	<5



**Figure 4.12:** Essai #2 de la croissance de *Pseudomonas fragi* en présence et en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy. Deuxième graphique avec échelle réduite en abscisse.

Pour le troisième essai, la croissance bactérienne est très rapide en présence de film et est maximale (environ  $10^7$ UFC/ml) après une soixantaine d'heures d'agitation. La population initiale était d'environ 130UFC/ml et le maximum a été atteint dans un délai similaire au deuxième essai. Dans cet essai, la population tend également à diminuer en fonction du temps mais après 1200 heures d'agitation, cette population tend à augmenter légèrement par la suite (voir tableau 4.21 et figure 4.13). En absence de film, la population demeure stable (environ 110UFC/ml) pour la première période de 24 heures et augmente rapidement à  $10^6$ UFC/ml après une centaine d'heures d'agitation. Ensuite, la population diminue d'une unité logarithmique et demeure stable pour l'intervalle de 500 à 1500 heures. Par la suite, la population chute rapidement à 2800UFC/ml après 1779 heures d'agitation (voir figure 4.13). En présence seul de film, la population est  $< 5$  UFC/ml pendant toute la durée de l'expérience.

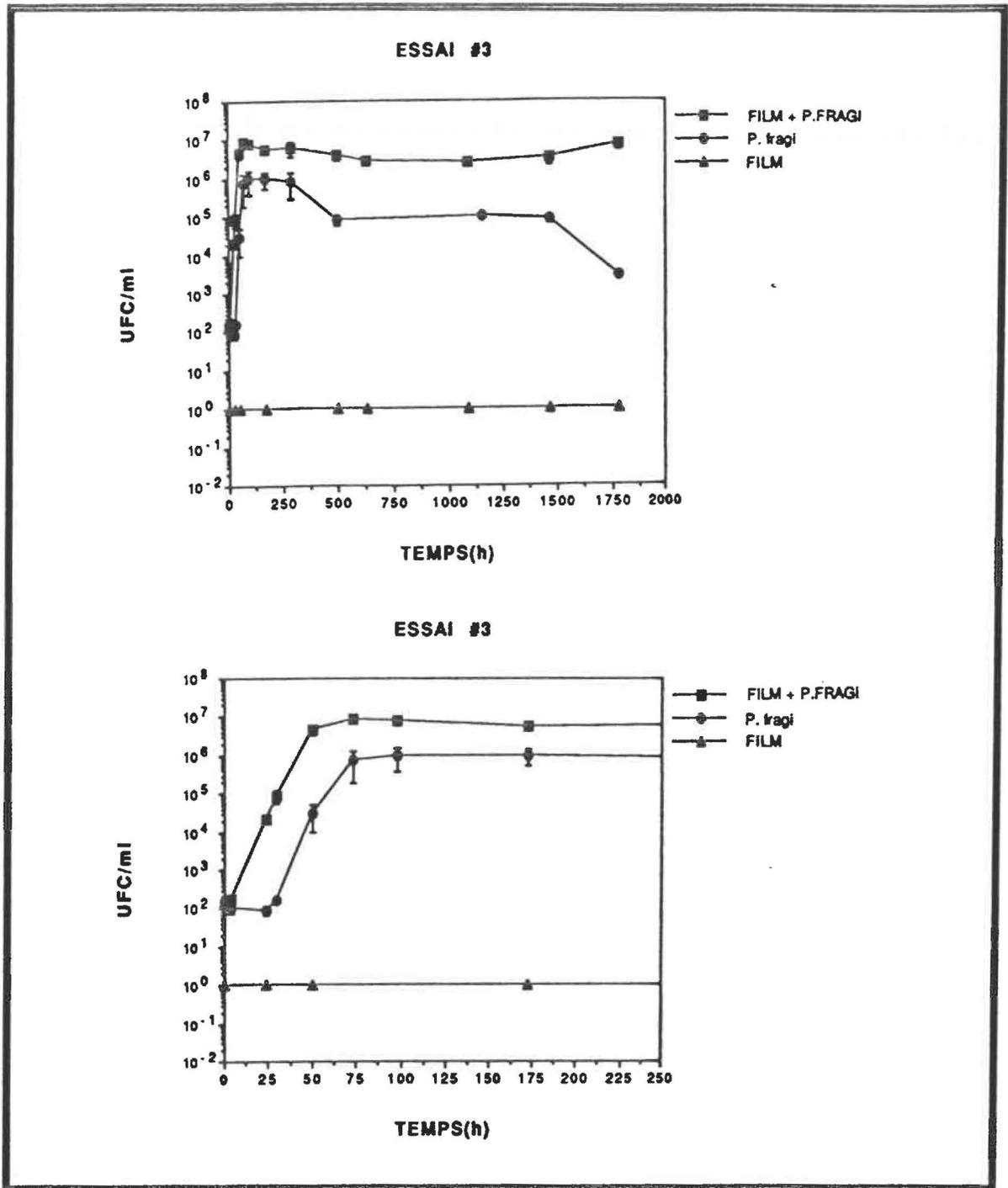
Les expériences de biodégradabilité ont été arrêtées après l'obtention d'une stabilité de la population de *P. fragi* dans les milieux en présence de film et lorsque la population, dans les milieux en absence de film (essais 2 et 3), avait diminué distinctement. Pour les trois essais, le film n'était pas entièrement biodégradé au moment de l'arrêt de l'expérimentation.

Différentes tentatives ont été faites afin de suivre le taux de biodégradation du film par *P. fragi* en fonction du temps par dosage de

l'azote soluble. Dans aucun cas nous avons pu récupérer le film après immersion complète dans les milieux sans en perdre une quantité non-négligeable. En effet, le film tend à se désorganiser une fois immergé dans l'eau, de telle sorte qu'il perd sa structure initiale. Alors, une récupération par filtration et/ou évaporation n'ont pas été efficaces pour isoler le film des milieux lors des essais de biodégradabilité.

**Tableau 4.21:** Résultats des dénombrements de l'essai #3 de *Pseudomonas fragi* en présence et/ou en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy.

TEMPS(h)	<i>P.fragi</i> AVEC FILM (UFC/ml)	<i>P.fragi</i> SEUL (UFC/ml)	FILM SEUL (UFC/ml)
0	130 ± 56	130 ± 39	< 5
4	170 ± 47	103 ± 29	-
24	21x10 <sup>3</sup> ± 2700	88 ± 22	< 5
30	85x10 <sup>3</sup> ± 31x10 <sup>3</sup>	160 ± 18	-
50	47x10 <sup>5</sup> ± 14x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>3</sup> ± 20x10 <sup>3</sup>	< 5
73	87x10 <sup>5</sup> ± 98x10 <sup>4</sup>	75x10 <sup>4</sup> ± 57x10 <sup>4</sup>	-
98	78x10 <sup>5</sup> ± 10x10 <sup>5</sup>	98x10 <sup>4</sup> ± 59x10 <sup>4</sup>	-
173	56x10 <sup>5</sup> ± 85x10 <sup>4</sup>	10x10 <sup>5</sup> ± 45x10 <sup>4</sup>	< 5
291	61x10 <sup>5</sup> ± 25x10 <sup>5</sup>	83x10 <sup>4</sup> ± 55x10 <sup>4</sup>	-
503	38x10 <sup>5</sup> ± 11x10 <sup>5</sup>	82x10 <sup>3</sup> ± 23x10 <sup>3</sup>	< 5
634	29x10 <sup>5</sup> ± 33x10 <sup>4</sup>	-	< 5
1083	26x10 <sup>5</sup> ± 49x10 <sup>4</sup>	-	< 5
1152	-	10x10 <sup>4</sup> ± 16x10 <sup>3</sup>	-
1465	33x10 <sup>5</sup> ± 11x10 <sup>5</sup>	82x10 <sup>3</sup> ± 19x10 <sup>3</sup>	< 5
1779	74x10 <sup>5</sup> ± 21x10 <sup>5</sup>	2800 ± 480	< 5



**Figure 4.13:** Essai #3 de la croissance de *Pseudomonas fragi* en présence et en absence d'un échantillon de film d'alanate 380 composé de 5,0%P/P de protéines et 2,5%P/P de glycérol, irradié à 20kGy. Deuxième graphique avec échelle réduite en abscisse.

## 5.0 DISCUSSION

Dans ce chapitre, une analyse critique de l'ensemble des résultats sera faite. Certaines suggestions seront proposées pour la poursuite de futurs travaux de recherche afin de mieux comprendre et d'améliorer les différentes propriétés de ce film protéique.

### 5.1 ANALYSE DES RÉSULTATS POUR LES TROIS ALANATES

Des trois caséinates utilisées, la caséinate de calcium (alanate 380) a un comportement qui diffère de celui des deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) à l'irradiation. Les différentes mesures des propriétés rhéologiques et physico-chimiques ont démontré que:

La force de rupture (rapport F/E) de la caséinate de calcium (alanate 380) est supérieure comparativement aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180). À 5,0%P/P et 7,5%P/P, la caséinate de calcium (alanate 380) a un rapport F/E supérieur aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) pour les doses de 4, 8 et 12kGy. Toutefois, il n'y a pas de relation directe entre la concentration en protéines et la résistance du film. En effet, pour une concentration de 5,0%P/P, le rapport F/E est supérieur à celui à 7,5%P/P pour les trois caséinates. Seules exceptions pour les deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) irradiées à 4kGy où le rapport est très légèrement inférieur (voir tableaux 4.2 et 4.3). Donc, toutes proportions gardées, un film produit avec une plus grande quantité de

protéines ne forme pas obligatoirement un film plus résistant après irradiation.

À 5,0% de protéines, l'irradiation jusqu'à 12kGy de la seconde caséinate de sodium (alanate 180) engendre une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) du rapport F/E. Ce phénomène est observé pour la première caséinate de sodium (alanate 110) seulement à une dose de 4kGy. L'irradiation jusqu'à 12kGy de la caséinate de calcium (alanate 380) n'a pas d'effet significatif ( $P > 0,05$ ) sur le rapport F/E (voir tableau 4.2).

En absence de glycérol, l'irradiation engendre une diminution significative ( $P \leq 0,05$ ) du rapport F/E pour les caséinates de sodium (alanate 110) et de calcium (alanate 380) à une concentration de 7,5%. Alors que l'irradiation jusqu'à 12kGy n'a pas d'effet significatif ( $P > 0,05$ ) sur le rapport F/E pour la seconde caséinate de sodium (alanate 180) à 7,5% (voir tableau 4.3).

Donc, le fait d'irradier jusqu'à 12kGy ne génère pas de film plus résistant pour ces trois caséinates; et ce, en absence d'agents plastifiants.

À une concentration de 5,0%, la caséinate de calcium (alanate 380) a produit un taux de formation de bityrosine significativement supérieur ( $P \leq 0,05$ ) aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180) lorsque cette caséinate est traitée aux doses de 4, 8 et 12kGy.

Par contre, à 7,5% de protéines, la caséinate de sodium (alanate 110) a formé significativement plus ( $P \leq 0,05$ ) de bityrosine que les caséinates de sodium (alanates 180) et de calcium (alanate 380) et ce, pour les doses de 4 et 12kGy. À 8kGy, les trois caséinates ont formé une proportion similaire de bityrosine (voir tableaux 4.6 et 4.7).

Toutefois, les caséinates de sodium (alanate 180) et de calcium (alanate 380) ont produit significativement plus ( $P \leq 0,05$ ) de bityrosine à une concentration en protéines de 5,0% qu'à 7,5% pour les doses de 4, 8 et 12 kGy. Alors que la caséinate de sodium (alanate 110) a produit plus de bityrosine à 5,0% de protéines qu'à 7,5% pour la dose de 8kGy seulement (voir tableaux 4.6 et 4.7). Alors, serait-il possible que la concentration de 5,0% représenterait une zone où le taux de formation de bityrosine serait maximale et que la concentration de 7,5% représenterait un point de saturation? Une étude beaucoup plus approfondie devrait être faite pour valider cette hypothèse.

La force de cohésion d'un film est, entre autres, reliée à sa structure polymérique et chimique (Kester et Fennema, 1986). Le taux de formation de bityrosine représente un facteur important dans le processus de polymérisation induit par les radicaux hydroxyls (Davies, 1987 et Davies *et al.*, 1987a). Ainsi, à une concentration de 5,0% de protéines, la caséinate de calcium (alanate 380) démontre, à la fois, un rapport F/E et un taux de formation de bityrosine supérieur aux deux caséinates de sodium (alanates 110 et 180). Par contre, une telle

relation n'est pas observée à une concentration de 7,5% de protéines pour les trois caséinates.

Par contre, l'irradiation jusqu'à 12kGy n'a peu ou pas d'effets significatifs ( $P > 0,05$ ) sur la déformation à la rupture des trois caséinates utilisées et ce, pour les deux concentrations expérimentées (voir tableaux 4.4 et 4.5) .

De même, il n'a pas eu de perte régulière et continue de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation lors des dosages par fluorescence. Cette situation est perçue pour les trois caséinates et aux deux concentrations utilisées (voir tableaux 4.8 et 4.9). En absence de glycérol, il est possible que l'irradiation gamma engendre une dénaturation protéique exposant ainsi les poches hydrophobes en surface de la protéine. Alors, la stabilité relative du signal de fluorescence qui est perçue lors du dosage de tryptophane, se justifierait davantage par une plus grande quantité de tryptophane ayant migrée en surface plutôt que la formation de nouveaux résidus par l'irradiation.

## **5.2 INFLUENCE DU GLYCÉROL**

### **5.2.1 Analyse des résultats avec 5,0% de protéines**

Comparativement aux résultats obtenus en absence de glycérol, pour un traitement de 0 à 12kGy, à une concentration de 5,0% de

protéines, la présence de 1,0% de glycérol abaisse significativement ( $P \leq 0,05$ ) la force de rupture; accroît la déformation (environ 0,4mm) et n'affecte pas le taux de formation de bityrosine (voir tableaux 4.10, 4.12 et 4.15). Par contre, pour les doses de 15 et 20kGy, la force de rupture démontre des rapports F/E comparables à ceux obtenus en absence de glycérol pour un traitement de 0 à 12kGy. La déformation est augmentée (environ 0,6mm) par rapport aux résultats obtenus en absence de glycérol pour les doses variant entre 0 et 12kGy (voir tableaux 4.10 et 4.12). Le taux de formation de bityrosine est significativement supérieur ( $P \leq 0,05$ ) comparativement en absence de glycérol pour les doses de 15 et 20kGy (voir tableaux 4.15).

À 2,5% et 5,0% de glycérol avec 5,0% de protéines, le rapport F/E, la déformation, la viscoélasticité et le taux de formation de bityrosine augmentent significativement ( $P \leq 0,05$ ) avec l'augmentation de la dose d'irradiation (voir tableaux 4.10, 4.12, 4.14 et 4.15).

En présence de 2,5% de glycérol, l'irradiation a permis d'accroître le rapport F/E d'un facteur de 2.2 et d'augmenter la déformation d'un facteur 1.3. Alors qu'à 5,0% de glycérol, l'irradiation a permis d'augmenter le rapport F/E d'un facteur 1.6 et la déformation d'un facteur 1.4 (voir tableaux 4.10 et 4.12). La viscoélasticité des films avec 5,0% de glycérol est supérieure à celle avec 2,5%. Toutefois, la manipulation des films avec 5,0% de glycérol demeure beaucoup plus difficile (voir tableau 4.14).

Le fait d'ajouter une plus grande quantité de glycérol (2,5 et 5,0%) dans le milieu, réduit considérablement la résistance du film mais améliore de beaucoup sa capacité déformante.

Le glycérol ne semble pas agir comme inhibiteur radicalaire. De par sa présence, il semble même favoriser la formation de bityrosine selon la dose d'irradiation. En effet, la présence de glycérol (1,0%, 2,5% ou 5,0%) améliore significativement ( $P \leq 0,05$ ) le taux de formation de bityrosine pour des doses d'irradiation équivalentes ou supérieures à 15kGy pour une concentration de 5,0% de protéines (voir tableau 4.15). Par contre, les raisons justifiant l'effet bénéfique que produit la présence de glycérol sur le taux de formation de bityrosine ne sont pas démontrées.

### **5.2.2 Analyse des résultats avec 7,5% de protéines**

En présence de 2,5% de glycérol et de 7,5% de protéines, l'irradiation (0-12kGy) engendre une diminution significativement ( $P \leq 0,05$ ) du rapport F/E, une augmentation significative ( $P \leq 0,05$ ) du pouvoir déformant et du taux de formation de bityrosine comparativement aux résultats obtenus en absence de glycérol (voir tableaux 4.11, 4.13 et 4.16). Toutefois, un traitement radiatif jusqu'à 20kGy n'a pas de conséquences significatives ( $P > 0,05$ ) sur le rapport F/E et la déformation pour les films formés avec 7,5% de protéines et 2,5% de glycérol (voir tableaux 4.11 et 4.13).

Avec 5,0% de glycérol et 7,5% de protéines, le rapport F/E, la déformation, la viscoélasticité et le taux de formation de bityrosine augmentent significativement ( $P \leq 0,05$ ) avec l'augmentation de la dose d'irradiation (voir tableaux 4.11, 4.13, 4.14 et 4.16). En présence de 5,0% de glycérol, l'irradiation a permis d'accroître le rapport F/E et la déformation d'un facteur 1.5 (voir tableaux 4.11 et 4.13).

La présence de glycérol contribue également à réduire largement la résistance du film mais améliore de beaucoup sa déformation.

En présence de 5,0% de protéines, l'ajout de glycérol n'inhibe pas la formation de bityrosine. Bien au contraire, la formation de bityrosine, en fonction des doses d'irradiation (4 à 20kGy), est significativement supérieure ( $P \leq 0,05$ ) (voir tableau 4.16).

### **5.2.3 Comparaison entre les deux concentrations de protéines**

En présence de 2,5% de glycérol, les rapports F/E à 5,0% de protéines sont inférieurs à ceux à 7,5% pour les doses d'irradiation de 0 à 20kGy. Par contre, les déformations à 5,0% de protéines sont significativement supérieures ( $P \leq 0,05$ ) à celles à 7,5% et ce, pour les mêmes traitements (voir tableaux 4.10 à 4.13). À 5,0% de glycérol, les rapports F/E à 5,0% de protéines sont significativement inférieurs ( $p \leq 0,05$ ) à ceux à 7,5% pour des doses variant de 0 à 40kGy. Alors que les déformations à 7,5% de protéines sont supérieures à celles à 5,0%

pour les doses de 4, 8, 15, 20 et 40kGy. À 12 et 30kGy, les déformations à 7,5% de protéines sont inférieures à celles à 5,0% (voir tableaux 4.10 à 4.13). La viscoélasticité des films avec 5,0% de glycérol est significativement supérieure ( $P \leq 0,05$ ) avec 5,0% de protéines qu'à 7,5% (voir tableau 4.14).

L'ajout de 2,5% de glycérol à 7,5% de protéines augmente significativement ( $P \leq 0,05$ ) le taux de formation de bityrosine entre les deux concentrations de protéines à l'exception de la dose de 15kGy. Toutefois, il n'y a pas de relation directe entre la concentration de protéines et la formation de bityrosine. Ainsi, le taux de formation de bityrosine n'est pas proportionnel à la quantité de protéines présentes dans le milieu pour une même dose d'irradiation donnée (voir tableaux 4.15 et 4.16).

Un rapport F/E maximal est obtenu à 30kGy pour les deux concentrations de protéines avec 2,5% et/ou 5,0% de glycérol. La déformation est maximale entre 20 et 30kGy en présence de 5,0% de protéines et 2,5% ou 5,0% de glycérol. Alors qu'à 7,5% de protéines avec 5,0% de glycérol, la déformation est maximale entre 15 et 20kGy. Finalement, la viscoélasticité est maximale entre 30 et 40kGy pour les deux concentrations de protéines avec 2,5% et/ou 5,0% de glycérol (voir tableaux 4.10 à 4.14). Ainsi, une dose d'irradiation entre 20 et 30kGy semble être une région où les propriétés mécaniques expérimentées sont maximales pour ces deux concentrations de protéines et de glycérol.

Le ratio glycérol/protéine semble être un facteur important sur l'influence de l'irradiation sur les propriétés mécaniques et physico-chimique pour les deux concentrations de protéines avec 2,5% ou 5,0% de glycérol. Ainsi, un ratio de 0,5 (2,5% de glycérol/5,0% de protéines) démontre la plus forte augmentation du rapport F/E en fonction des doses d'irradiation alors que la plus faible est perçue pour un ratio de 0,33 (2,5% de glycérol/7,5% de protéines). Le plus fort pouvoir de déformation au cours de l'irradiation est perçue pour un ratio de 0,67 (5,0% de glycérol/7,5% de protéines) et le plus faible est obtenu pour un ratio de 0,33. Finalement, la progression obtenue pour la viscoélasticité est sensiblement la même pour les ratios de 0,5; 0,67 et 1,0. Alors, les ratios glycérol/protéine situés entre 0,5 et 0,67 semblent démontrer les plus fortes variations des propriétés rhéologiques à l'irradiation.

Donc, un traitement radiatif est bénéfique pour la résistance du film, son pouvoir déformant et la formation de bityrosine pour les deux concentrations de protéines avec 2,5% ou 5,0% de glycérol. Lors du processus de polymérisation, toutes les chaînes polymériques sont interconnectées et regroupées en un gigantesque réseau. Si le nombre de points de contact n'est pas trop élevé, le réseau démontre alors un pouvoir élastique appréciable. Cette déformation réversible serait due à la présence d'embranchements flexibles (Wunderlich, 1981). Ainsi, une période d'irradiation ou une quantité inadéquate de glycérol affecterait concrètement la structure du réseau protéique qui, inévitablement, altérerait les propriétés rhéologiques du film.

#### 5.2.4 Dosage de tryptophane en présence de glycérol

L'oxydation d'une solution de tryptophane par les radicaux hydroxyls est directement relié à la perte d'intensité du signal de fluorescence (Davies *et al.*, 1987a et voir figure 4.4, section 4.2.4).

En absence de glycérol, il n'y a pas de perte de tryptophane lors des dosages des solutions de caséinates irradiées. À l'opposé, une perte du signal est perçue lorsque le glycérol est présent dans les milieux traités. À 5,0% de protéines, la perte du signal, en présence de glycérol, est significative ( $P \leq 0,05$ ) pour les doses de 4 à 20kGy alors qu'à 7,5% de protéines, elle est significative ( $P \leq 0,05$ ) pour les doses de 12, 15 et 20kGy (voir tableaux 4.17 et 4.18).

La présence de glycérol tend à privilégier l'état natif ou replié d'une protéine globulaire plutôt qu'un état dénaturé (Gekko et Timasheff, 1981). Ainsi, seul le tryptophane situé en surface de la protéine sera affecté lors de l'irradiation.

Globalement, la perte d'intensité du signal à 40kGy comparativement à 0kGy varie de 30 à 40% pour les deux concentrations de protéines.

En présence de 5,0% de protéines et de 5,0% de glycérol, une meilleure protection contre la perte de tryptophane est observée comparativement à 2,5% ou 1,0% de glycérol. Alors qu'entre 2,5% et

1,0% de glycérol, la proportion de perte du signal en fonction de la dose d'irradiation est approximativement la même.

Par contre, à 7,5% de protéines, la perte d'intensité du signal en fonction de la dose d'irradiation est proportionnellement plus élevée en présence de 5,0% de glycérol que lorsque seulement 2,5% de glycérol est présent (voir tableaux 4.17 et 4.18). L'ajout d'une concentration de 2,5% de glycérol démontre une plus grande résistance à la perte de tryptophane comparativement à une solution contenant 5,0% de protéines pour des doses d'irradiation variant de 0 à 20kGy. À 5,0% de glycérol, la situation inverse se présente; toutefois, pour les doses de 30 et 40kGy, la perte devient légèrement plus élevée avec 5,0% de protéines que 7,5% (voir tableaux 4.17 et 4.18).

Essentiellement, il n'y pas de relation directe entre la perte du signal et le contenu en glycérol en fonction de la dose d'irradiation et ce, pour les deux concentrations de protéines étudiées. Il est difficile d'établir un ratio glycérol/protéine pour lequel la protection contre la perte de tryptophane en fonction de la dose d'irradiation serait maximale. Pour une concentration de 5,0% de protéines, un ratio de 1,0 est le plus adéquat alors que pour une concentration de 7,5% de protéines, un ratio de 0,33 est plus adéquat.

La présence de glycérol modifie fortement les propriétés physico-chimiques des films de caséinate de calcium (alanate 380). Il

tend à diminuer la force à la rupture, il augmente la déformation à la rupture, il améliore la viscoélasticité, il n'inhibe pas la formation de bityrosine et il protège la protéine de la dénaturation radiative.

### **5.3 LA BIODÉGRADABILITÉ**

Globalement, une croissance bactérienne maximale est rapidement atteinte lorsque *P. fragi* est en présence du film. Pour les trois essais, un maximum d'environ  $10^7$ UFC/ml est atteint dans un délai de 60 à 80 heures après le départ des milieux. Une tendance à la baisse de la population est remarquée après que le maximum soit atteint à l'exception du troisième essai, où la population tend à augmenter après 1200 heures d'agitation.

Pour les deux derniers essais en absence de film, la population bactérienne exige un temps de latence d'environ 24 heures avant de commencer à croître. Un maximum de  $10^6$ UFC/ml est atteint après une centaine d'heures d'agitation et dans les deux cas, la population décroît de façon évidente par la suite.

En présence unique de film, la population est demeurée  $< 5$  UFC/ml sur toute la durée de l'expérimentation et ce, sur les trois essais.

Il est difficile d'expliquer le comportement de *P. fragi* dans les milieux en absence de film. Étant sous conditions aérobiques, est-il

possible que des propriétés chimiolithotrophiques puissent justifier, à elles seules, une telle croissance bactérienne? Se pourrait-il que des bactéries puissent croître de cette façon, uniquement sous leurs réserves nutritionnelles? Est-il possible qu'un effet jumelé de ces phénomènes ou d'autres puissent confirmer la croissance bactérienne obtenue? Enfin, plusieurs questions se sont présentées à nous mais peu de réponses ont ressorti. Toutefois, une observation émerge entre la première et la troisième répétition pour les milieux en absence de film: la population de *P. fragi* est demeurée élevée plus longtemps dans la troisième répétition (voir tableaux 4.19 à 4.21). Pendant l'attente pour débiter la deuxième et la troisième répétition, l'inoculum "stock" de *P. fragi* servant à démarrer les milieux était repiqué à tous les 10 à 15 jours dans un milieu nutritif. Ainsi l'espèce bactérienne pouvait s'adapter plus adéquatement au milieu. Alors, est-il possible que "l'amélioration" de la qualité de *P. fragi* puisse justifier, ou du moins partiellement expliquer, son comportement dans les milieux en absence de composés organiques? Une étude approfondie serait nécessaire pour élucider cette énigme.

#### **5.4 POURSUITE DE FUTURS TRAVAUX**

Bien que la formation de films protéiques par irradiation gamma soit démontrée en milieu expérimental, des améliorations sont toujours possibles et nécessaires. Mais d'abord, nombres d'expériences doivent être faites afin de vérifier certaines

particularités du film. Naturellement, une meilleure compréhension de certains phénomènes physico-chimiques doit également être obtenue.

Il serait intéressant de vérifier l'influence du débit de dose sur la formation du film. Ainsi, on pourrait observer l'effet d'un débit de dose faible à élevé sur les propriétés rhéologiques du film. Si aucun effet était perçu, il serait alors avantageux d'utiliser un débit de dose élevé.

La vérification de la perméabilité aux gaz et à l'humidité s'impose dans l'immédiat. Comme tout nouvel emballage, le niveau de perméabilité doit être connu afin d'orienter celui-ci vers une utilité précise.

Des tests avec un traitement acide au point isoélectrique de la protéine doivent être effectués. Une précipitation des protéines à leur point isoélectrique imperméabilise les films à l'humidité. Quelques essais ont été faits selon la méthode de Krochta (1991) avec un tampon d'acétate de sodium pH 4,6. Après trempage acide, le film est insoluble dans l'eau mais celui-ci devient très friable. Alors le gain d'imperméabilité est impressionnant mais le film perd énormément de sa souplesse. Alors, d'autres essais doivent être entrepris afin de contourner ce problème.

Des essais avec d'autres agents plastifiants que le glycérol doivent être entrepris afin d'optimiser les différentes propriétés du film. Les lipides et les cires sont à envisager.

Une étude en spectroscopie d'infra-rouge permettrait de mettre en évidence les groupements fonctionnels impliqués ou modifiés lors de l'irradiation. Il serait possible, de plus, de déterminer le taux de ramifications dans la structure du polymère formé par l'irradiation.

Suivre par GPC (*Gel Permeation Chromatography*) la distribution des poids moléculaires des différents polymères formés par l'irradiation.

Une vérification plus poussée de la biodégradabilité avec un mélange bactérien ou avec un mélange bactérien prélevé directement du sol.

Finalement, l'opacité des films peut être vérifiée par un balayage en spectroscopie UV-visible.

## 6.0 CONCLUSION

La présence d'un agent plastifiant est essentiel pour la formation adéquate d'un film protéique. Malgré le fait que le glycérol diminue la résistance du film, il améliore la déformation, favorise la production de bityrosine et protège la protéine contre la dénaturation radiative.

Selon l'ensemble des résultats obtenus, l'irradiation est bénéfique pour la résistance du film, la déformation, la viscoélasticité et la formation de bityrosine. Une dose d'irradiation se situant entre 20 et 30kGy semble être la région où les propriétés mécaniques expérimentées sont maximisées pour les deux concentrations en protéines et à 2,5% et 5,0% de glycérol. Les ratios glycérol/protéine se situant entre 0,5 et 0,67 semblent être une zone propice à subir les plus fortes variations des propriétés mécaniques à l'irradiation.

La dégradation du film (formé de 5,0% de protéines et 2,5% de glycérol irradié à 20kGy) par les systèmes enzymatiques de *Pseudomonas fragi* est certaine et rapide. Par contre, le comportement de la bactérie en absence de masse organique demeure difficilement explicable. Quelques suggestions ont été proposées mais aucune ne fût, jusqu'à présent, confirmée comme étant adéquate.

## REMERCIEMENTS

L'aboutissement d'un tel projet de recherche a été rendu possible par la participation directe et indirecte de nombreux intéressés. Naturellement, les nommer seraient trop long et je risque fort bien d'en oublier. Alors, je désire tous les remercier profondément et sans aucun doute, ils se reconnaîtront.

Toutefois, je tiens à souligner la participation particulière de certaines personnes qui m'ont aidé et conseillé dans ce projet de maîtrise:

Ma directrice, Monique Lacroix, pour ses conseils, suggestions et sa direction. De même que Michèle Jobin et Benoît Latreille; agents de recherche.

Raymond Charbonneau, pour ses précieux renseignements et propositions sur la section biodégradabilité de ce projet. Également son étudiant, Paul Michel, pour ses suggestions et informations durant les manipulations de microbiologie.

L'équipe de NORDION INTERNATIONAL INC. du Centre d'Irradiation du Canada pour leurs implications et conseils.

Les FONDS pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) pour leurs soutiens financiers.

Cette recherche a été subventionnée par le Conseil de Recherche en Science et Génie du Canada (CRSNG) sur l'effet de l'irradiation sur la fonctionnalité des protéines.

La compagnie NEW ZEALAND MILK PRODUCTS, INC. pour leurs informations mais aussi pour nous avoir généreusement fourni et donné les protéines utilisées dans ce projet.

Ma famille et ami(e)s proches pour leur soutien moral qui parfois, m'a été très profitable.

merci à tous

## RÉFÉRENCES

- Adams, D.M.; Barach, J.T. et Speck, M.L. 1976, *Effect of psychrotrophic bacteria from milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment*, J. Dairy Sci., Vol. 59, 5, 823-827.
- Adams, G.E.; Willson, R.L.; Bisby, R.H. et Cundall, R.B. 1971, *On the mechanism of the radiation-induced inactivation of ribonuclease in dilute aqueous solution*, Int. J. Radiat. Biol., Vol. 20, 5, 405-415.
- Alichanidis, E. et Andrews, A.T., 1977, *Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium PSEUDOMONAS FLUORESCENS STRAIN AR-11*, Biochim. et Biophys. Acta, 485, 424-433.
- Arakawa, T. et Timasheff, S. 1982, *Stabilization of protein structure by sugars*, Biochemistry, 21, 6536-6544.
- Avena-Bustillos, R.J. et Krochta, J.M. 1993, *Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content*, J. Food Sci., Vol. 58, 4, 904-907.
- Banker, G.S. 1966, *Film coating theory and practice*, J. Pharma. Sci., Vol. 55, 1, 81-89.

Bull, H.B. et Breese, K. 1968, *Protein hydration, 1. Binding sites*, *Arc. Biochem. Biophys.*, 128, 488-496.

Ciardelli, F.; Ruggeri, G.; Aglietto, M.; Angiolini, D.; Carlini, C.; Bianchini, G.; Siccardi, G.; Bigogno, G. et Cioni, L. 1989, *Advanced polymeric materials for coating technology*, *J. Coating Techn.*, Vol. 61, 775, 77-87.

Davies, K.J.A. 1987, *Protein damage and degradation by oxygen radicals, I General aspects*, *J. Bio. Chem.*, Vol. 262, 20, 9895-9901.

Davies, K.J.A. et Delsignore, M.E. 1987, *Protein damage and degradation by oxygen radicals, III. Modification of secondary and tertiary structure*, *J. Bio. Chem.*, Vol. 262, 20, 9908-9913.

Davies, K.J.A.; Delsignore, M.E. et Lin, S.W. 1987a, *Protein damage and degradation by oxygen radicals, II. Modification of amino acids*, *J. Bio. Chem.*, Vol. 262, 20, 9902-9907.

Davies, K.J.A.; Lin, S.W. et Pacifici, R.E. 1987b, *Protein damage and degradation by oxygen radicals, IV. Degradation of denatured protein*, *J. Bio. Chem.*, Vol. 262, 20, 9914-9920.

- Delincée, H. 1983, *Recent advances in radiation chemistry of proteins*, dans: *Recent advances in food irradiation*, Elias, P.S. et Cohen, A.J. (Eds), Elsevier Biomedical, 129-147.
- Delisle, J. 1984, *Amélioration de la valeur nutritive des différentes protéines végétales par des méthodes physiques, chimiques et biochimiques*, thèse de Doctorat, Université Laval, 15
- Ferradini, C. et Pucheault, J. 1983, II. *Radiolyse de solution diluée*, dans: *Biologie de l'action des rayonnements ionisants*, Masson, Paris, (Ed), 31-61.
- Feuge, R.O. 1955, *Acetoglycerides-new fat products of potential value to the food industry*, Food Tech, June, 314-318.
- Fricke H. et Hart, E. 1966, *Chemical dosimetry*, dans: *Radiation dosimetry, second edition, Vol. II, Instrumentation*, Attix, F.H. et Roesch, W.C. (Eds), Academic Press, N.Y., 167-175.
- Fridovich, I. 1983, *Superoxide radical: an endogenous toxicant*, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23, 239-257.
- Gage, P. 1990, *Degradable polyethylene film-the fact*, Tappi J., 10, 161-169

- Ganzer, K.M. et Rebenfeld, L. 1987, *Laboratory-scale continuously variable humidity control with saturated salt solutions*, Ame. Lab., March, 40-47.
- Gekko, K. et Morikawa, T. 1981, *Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol-water mixtures*, J. Biochem., 90, 39-50.
- Gekko, K. et Timasheff, S. 1981, *Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures*, Biochemistry, 20, 4667-4676.
- Gennadios, A. et Weller, C. 1990, *Edible films and coating from Wheat and corn proteins*, Food Technol., October, 63-69.
- Gontard, N.; Guilbert, S. et Cuq, J.L. 1992, *Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology*, J. Food Sci., Vol. 57, 1, 190-195.
- Graham, D.E. et Philips, M.C. 1980, *Proteins at liquid interfaces, V. shear properties*, J. Col. Inter. Sci., Vol. 76, 1, 240-250.
- Kamper, S.L. et Fennema, O. 1984a, *Water vapor permeability of edible bilayer films*, J. Food Sci, Vol. 49, 1478-1481.

- Kamper, S.L. et Fennema, O. 1984b, *Water vapor permeability of edible, fatty acid, bilayer film*, J. Food Sci, Vol. 49, 1482-1485.
- Kanig, J.L. et Goodman, H. 1962, *Evaluative procedures for film-forming materials used in pharmaceutical applications*, J. Pharma. Sci., Vol. 51, 1, 77-83.
- Kasai, S.; Kunimoto, T. et Nitta, K. 1983, *Cross-linking of fibrin by activated factor XIII stimulates attachment, morphological changes and proliferation of fibroblasts*, Biomed. Res., 4, 2, 155-160.
- Kester, J.J. et Fennema, O.R. 1986, *Edible films and coatings: a review*, Food Technol., December, 47-59.
- Klemchuk, P. P. 1990, *Degradable plastics: a critical review*, Pol. Degra. Stab., 27, 183-202.
- Krochta, J.M. 1991, *Coatings for substrates including high moisture edible substrates*, United States Patent no: 5 019 403.
- Lee, J.C. et Timasheff, S. 1981, *The stabilization of proteins by sucrose*, J. Bio. Chem., Vol. 256, 14, 7193-7201.

- Lehrer, S.S. et Fasman, G.D. 1967, *Ultraviolet irradiation effects in poly-L-tyrosine and model compounds. identification of bityrosine as a photoproduct*, *Biochemistry*, Vol. 6. 3, 757-767
- Li, C. et Kohn, J. 1989, *Synthesis of ploy(iminocarbinates): degradable polymers with potential application as disposable plastics and as biomaterials*, *Macromolecules*, Vol. 22, 5, 2029-2036.
- Lim, S.-T.; Jane, J.-L.; Rajagopalan, S. et Seib, P.A. 1992, *Effect of starch granule size on physical properties of starch-filled polyethylene film*, *Biotechnol. Prog.*, 8, 51-57.
- Lovergren, N.V. et Feuge, R.O. 1954, *Permeability of acetostearin products to water vapor*, *J. Agric. Food Chem.*, 2, 558-.
- Martin-Polo, M.; Voilley, A.; Blond, G.; Colas, B.; Mesnier, M. et Floquet, N. 1992, *Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of physical state*, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 413-418.
- McHugh, T.H. et Krochta, J.M., 1994, *Milk-protein-based edible films and coatings*, *Food Technol.*, January, 97-103.
- Merck & Co., Inc., 1960, *The merck index of chemicals and drugs, seventh edition*, Stecher, P.G.; Finkel, M.J.; Siegmund, O.H. et Szafranski, B.M. (Eds), Merck & Co., Inc., N.J., 733.

Ministère d'approvisionnement et services Canada, 1992, *Le plan vert du Canada, Les instruments économiques et la protection de l'environnement*, No cat. En 21-119/1992F, Gouvernement du Canada.

Modler, H.W., 1985, *Functionnal properties of nonfat dairy ingredients-a review. Modification of products containing casein*, J. Dairy Sci., 68, 2195-2205.

Motoki, M.; Aso, H.; Seguro, K. et Nio, N. 1987,  *$\alpha_{s1}$ -Casein film prepared using transglutaminase*, Agric. Biol. Chem., 51, 993-996.

Ndon, U.J.; Levine, A.D. et Bradley, B.S. 1992, *Evaluation of biodegradability of starch-based plastics*, Wat. Sci. Tech., Vol. 26, 9-11, 2089-2092.

Palleroni, N.J. 1984, *Bergey's manual of Systematic bacteriology, Vol 1*, Krieg, N.R. et Holt, J.G. (Eds), Williams & Wilkins, Baltimore, 140-407.

Peleg, M. 1979, *Characterization of the stress relaxation curves of solid foods*, J. Food Sci., Vol. 44, 1, 277-281.

Peyron, A. 1991, *L'enrobage et les produits filmogènes: un nouveau mode d'emballage*, Viandes Prod. Carnés, Vol. 12, 2, Mars-Avril, 41-46.

- Prutz, W.A. 1983, *Phenol coupling initiated by one-electron oxidation of tyrosine units in peptides and histone*, Int. J. Radiat. Biol., Vol. 44, 2, 183-196.
- Ricard-Blum, S. et Ville, G. 1988, Review *collagen cross-linking*, Cel. Molec. Bio., 34, 6, 581-590.
- Santé et bien-être social Canada, 1979, *Numération des colonies aérobies dans les aliments*, MFHPB-18, Direction générale de la protection de la santé.
- Schmidt, R.H. et Morris, H.S. 1984, *Symposium: Gelation in food protein systems, Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems*, Food Technol., May, 85-96.
- Shintani, H. et Nakamura, A. 1991, *Mechanism of degradation and crosslinking of polyurethane when irradiated by gamma-rays*, J. App. Polymer Sci., Vol. 42, 1979-1987.
- Sian, N.K. et Ishak, S. 1990, *Effect of pH on formulation, proximate composition and rehydration capacity of winged bean and sorbean protein-lipid film*, J. Food Sci., Vol. 55, 1, 261-262.
- Singh, H. et Singh, A. 1983, *Effect of gamma radiation on E. coli ribosomes II. Efficiencies of inactivation by free radicals*, Int. J. Radiat. Biol., Vol. 44, 6, 607-613.

- Singh, H. et Vadasz, J.A. 1983, *Effect of gamma radiation on E. coli ribosomes I. Inactivation by hydrogen atoms, hydroxyl radicals, hydrated electrons and secondary radicals*, Int. J. Radiat. Biol., Vol. 44, 6, 601-606.
- Snedecor, G.W. et Cochran, W.G. 1978, *One-way classifications. Analysis of variance*. dans: *Statistical methods*, The Iowa State University press, Iowa State, 258-298.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. et Case, C.L. 1989, *Microbiology, an introduction, third edition*, Williams, R.J.; Cusumano, C.; Weisberg, S.; Burner, P. et Olsen, L.(eds), The benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Ca., 260-281.
- Torres, J.A. et Karel, M. 1985, *Micribial stabilization of intermediate moisture food surface III. Effects of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisrure cheese analog*, J. Food Proc. Pre., 9, 107-119.
- Umemoto, Y.; Aoki, T. et Sato, Y. 1968, *Effects of  $\gamma$ -ray irradiation upon milk and milk proteins part II. Changes in relatives viscosities and gelation of casein solutions irradiated with  $\gamma$ -rays*, J. Agri. Chem. Soc. Japan, 42, 454-460.

- Vuillemard, J.C.; Gauthier, S. et Paquin, P. 1989, *Les ingrédients à base de protéines laitières: obtention, propriétés et utilisations*, Lait, 69, 323-351.
- Wunderlich, B. 1981, *Thermal characterization of polymeric materials*, Turi, E.A. (Ed), Academic Perss, N.Y., 92-234
- Xiong, Y.L. 1992, *Influence of pH and ionic environment on thermal aggregation of Whey proteins*, J. Agric. Food Chem., 40, 380-384.
- Yamamoto, O., 1977, *Ionizing radiation-induced crosslinking in proteins*, dans: *Protein crosslinking Biochemical and molecular aspects*, Friedman, M. (Ed), Plenum Press, N.Y., 509-547.

