

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉE À:

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE

EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

EMNA MEZGHENI

**PRODUCTION DE POLYMÈRE POUR EMBALLAGE
BIODÉGRADABLE À BASE DE CASÉINATE DE CALCIUM**

Influence de l'irradiation Gamma, d'agents plastifiants et du calcium

NOVEMBRE 1996

TABLE DES MATIÈRES

<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	<i>V</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>VII</i>
<i>SOMMAIRE</i>	<i>X</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>1</i>
<i>REVUE DE LITTÉRATURE</i>	<i>4</i>
1- LES DIFFÉRENTS TYPES DE FILMS	5
<i>1.1- Les films à base de protéines végétales</i>	<i>6</i>
<i>1.2- Les films à base de protéines animales</i>	<i>9</i>
<i>1.3- Les films à base de lipides</i>	<i>13</i>
<i>1.4- Les films à base de polysaccharides</i>	<i>16</i>
<i>1.5- Les films composites</i>	<i>18</i>
2- SÉLECTION DU SUBSTRAT COMPOSANT LES FILMS	19
3- LE PROCESSUS DE RÉTICULATION	20
<i>3.1- Les mécanismes réactionnels</i>	<i>21</i>
<i>3.2- L'interaction des acides aminés avec les radicaux libres</i>	<i>23</i>
4- INFLUENCE DES AGENTS PLASTIFIANTS	27
5- LES GELS ET LE CALCIUM	29
6- LA BIODÉGRADABILITÉ	30
<i>6.1- Les méthodes de biodégradabilité</i>	<i>31</i>
<i>6.2- Choix de la bactérie</i>	<i>33</i>
<i>6.3- Susceptibilité à la protéolyse</i>	<i>35</i>
<i>LA PROBLÉMATIQUE</i>	<i>36</i>
<i>L'HYPOTHÈSE DU PROJET DE RECHERCHE</i>	<i>36</i>
<i>LES OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE</i>	<i>37</i>

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	40
1- OPTIMISATION DE LA COMPOSITION DU POLYMÈRE	41
<i>1.1- Préparation des solutions protéiques</i>	<i>41</i>
<i>1.2- L'irradiation des solutions protéiques.....</i>	<i>43</i>
<i>1.3- L'évaluation de la réticulation.....</i>	<i>43</i>
2- VÉRIFICATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ.....	49
<i>2.1- Les paramètres de base.....</i>	<i>49</i>
<i>2.2- Les tests d'évaluations de la biodégradabilité.....</i>	<i>51</i>
3- L'ANALYSE STATISTIQUE	54
RÉSULTATS.....	55
1- ÉVALUATION DES EFFETS DE LA RÉTICULATION.....	56
<i>1.1- Le taux de formation de bityrosine.....</i>	<i>56</i>
<i>1.2 -Force de rupture des gels</i>	<i>67</i>
<i>1.3- Force de rupture des films.....</i>	<i>75</i>
<i>1.4- Déformation à la rupture des films.....</i>	<i>85</i>
<i>1.5- Viscoélasticité des films</i>	<i>95</i>
2- LA BIODÉGRADABILITÉ.....	106
<i>2.1- Le dénombrement bactérien :.....</i>	<i>106</i>
<i>2.2- Dosage de l'azote :.....</i>	<i>110</i>
<i>2.3- Mesure des liens peptidiques</i>	<i>116</i>
DISCUSSION	121
1- EFFETS DE L'IRRADIATION	122
<i>1.1- Le taux de formation de bityrosine.....</i>	<i>122</i>
<i>1.2- La force de rupture des gels</i>	<i>122</i>
<i>1.3- Force et déformation à la rupture et viscoélasticité des films</i>	<i>123</i>

2- EFFETS DU CALCIUM	124
2.1- <i>Le taux de formation de bityrosine.....</i>	124
2.2- <i>La force de rupture des gels</i>	125
2.3- <i>Force et déformation à la rupture et viscoélasticité des films</i>	127
3- EFFETS DES AGENTS PLASTIFIANTS	130
3.1- <i>Le taux de formation de bityrosine.....</i>	130
3.2- <i>La force de rupture des gels</i>	131
3.3- <i>Force et déformation à la rupture et viscoélasticité des films</i>	131
4- DISCUSSION DE LA BIODÉGRADABILITÉ :	133
4.1- <i>Le dénombrement bactérien.....</i>	133
4.2- <i>Le dosage de l'azote soluble</i>	135
4.3- <i>Les liens peptidiques.....</i>	136
5- POURSUITE DE FUTURS TRAVAUX	138
CONCLUSION.....	139
REMERCIEMENTS.....	142
BIBLIOGRAPHIE	143

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Composition du Caséinate de Calcium (Alanate 380).	41
<u>Tableau 2</u> : Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 et 5)% et en absence de Calcium.....	59
<u>Tableau 3</u> : Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,125% de Calcium.	62
<u>Tableau 4</u> : Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% de Calcium.	65
<u>Tableau 5</u> : Force de rupture des gels (g) en fonction de la dose d'irradiation administrée et en présence d'agents plastifiants : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% et en présence de 0,125 % de Calcium.....	69
<u>Tableau 6</u> : Force de rupture des gels en fonction de la dose d'irradiation administrée et en présence d'agents plastifiants : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% de Calcium.....	73
<u>Tableau 7</u> : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en absence de Calcium.....	77
<u>Tableau 8</u> : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant (Propylène Glycol(PG) ou Triéthylène Glycol(TEG) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% en présence de 0,125 Calcium.	80
<u>Tableau 9</u> : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.	83

<u>Tableau 10</u> : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.....	87
<u>Tableau 11</u> : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,125% Calcium.....	90
<u>Tableau 12</u> : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.....	93
<u>Tableau 13</u> : Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.....	97
<u>Tableau 14</u> : Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,125% Calcium.....	100
<u>Tableau 15</u> : Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.....	104
<u>Tableau 16</u> : Résultats des dénombrements de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (\log_{10}) en présence et/ou en absence d'un échantillon de films à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy.....	108
<u>Tableau 17</u> : Résultats du pourcentage d'azote soluble dans le milieu en présence et/ou en absence d'un échantillon de films (irradiés 4 ou à 64 kGy) à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol et en présence ou non de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	113
<u>Tableau 18</u> : Résultats de la densité optique des milieux contenant des films à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy en présence et/ou en absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	118

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Mécanisme réactionnel de l'électron solvaté et du radical $\bullet\text{H}$ avec l'oxygène du milieu (Fricke et Hart, 1966 ; Ferradini et Pucheaut, 1983 ; Fridovich, 1983).....	22
<u>Figure 2</u> : Mécanisme réactionnel et formation de bityrosine (Prütz, 1983).	26
<u>Figure 3</u> : Texturomètre Voland (Stevens-LFRA Texture Analyser, modèle TA-1000, NY, USA).	46
<u>Figure 4</u> : Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 ; 5)% et en absence de Calcium.	60
<u>Figure 5</u> : Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 ; 5)% en présence de 0,125% de Calcium.....	63
<u>Figure 6</u> : Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 ; 5)% et en présence de 0,250% de Calcium.....	66
<u>Figure 7</u> : Force de rupture des gels en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentration (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,125% de Calcium.	70
<u>Figure 8</u> : Force de rupture des gels en fonction de la dose d'irradiation administrée et en présence d'agents plastifiants : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% de Calcium.....	74

<u>Figure 9</u> : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% et en absence de Calcium.....	78
<u>Figure 10</u> : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% en présence de 0,125% de Calcium.	81
<u>Figure 11</u> : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.	84
<u>Figure 12</u> : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.....	88
<u>Figure 13</u> : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% présence de 0,1250% Calcium.	91
<u>Figure 14</u> : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% présence de 0,250% Calcium.	94
<u>Figure 15</u> : Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.....	98
<u>Figure 16</u> : Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,125% de Calcium.	101

- Figure 17 : Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% Calcium. 105
- Figure 18 : Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en présence et/ou en absence de films à base de caséinate de calcium et de 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy. 109
- Figure 19 : Pourcentage de l'azote soluble dans le milieu en présence et/ou en absence d'un échantillon des films (irradiés 4 ou à 64 kGy) à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol et en présence ou non de *Pseudomonas aeruginosa*. 114
- Figure 20 : Pourcentage net d'azote dû à l'activité bactérienne sur des films irradiés à 4 et à 64 kGy..... 115
- Figure 21 : Densité Optique des milieux contenant des films à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy en présence et/ou en absence de *Pseudomonas aeruginosa*. 119
- Figure 22 : Densité Optique Nette due à l'activité bactérienne en présence des films irradiés à 4 et à 64 kGy. 120

SOMMAIRE

Les emballages constituent un problème environnemental grandissant particulièrement dans les sociétés de consommation. Les contraintes imposées par la gestion et le devenir des déchets d'emballages ont réactivé l'intérêt pour les matériaux biodégradables. Certaines recherches ont permis de développer quelques polymères biodégradables à base de protéines, de lipides et/ou de polysaccharides. La caséine du lait est une protéine abondante, à un prix compétitif par rapport aux films en plastique qui offre certaines caractéristiques prometteuses pour de nouveaux débouchés non conventionnels.

Le premier volet de cette recherche porte sur l'élaboration d'un polymère protéique à base de caséine du lait en utilisant l'irradiation gamma comme moyen de réticulation. Les propriétés physico-chimiques recherchées du polymère que sont la résistance et l'élasticité ont été optimisées par l'incorporation d'agents plastifiants tels que le propylène glycol et le triéthylène glycol ainsi que du chlorure de calcium. Les réactions de réticulation ont été évaluées par le dosage du taux de formation de bityrosine, la mesure de la viscoélasticité des films ainsi que la mesure de la force de rupture des films et des gels.

Le second volet consiste à vérifier la biodégradabilité des polymères ainsi élaborés par l'attaque de *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie abondante dans l'environnement. Nous avons pu observer une croissance bactérienne significative en présence du polymère comme seule source de carbone pour la bactérie. Ces résultats ont été doublement confirmés, d'une part par le suivi régulier du dosage de l'azote soluble et, d'autre part, par l'évolution du nombre de liens peptidiques solubilisés dans le milieu par les bactéries.

Le polymère élaboré dans ce projet offre une alternative écologique, simple, accessible et abordable qui pourrait substituer le plastique, largement utilisé dans les emballages, notamment pour les produits alimentaires.

INTRODUCTION

Dans la société contemporaine de consommation, l'emballage occupe autant d'importance que le produit à mettre sur le marché. Certaines études sur l'évaluation des déchets effectués à Birmingham au Royaume-Uni ont montré que le plastique représente 1,5 % du poids total des déchets (Walsh, 1972). Aux Etats-Unis, en 1984 ce pourcentage a atteint les 7,2 % (Johnson, 1987). Cette proportion continue de croître pendant les années 1990. Ainsi, la barre des 10 % a été franchie accentuant le sérieux défi à l'équilibre environnemental (Cain, 1992).

D'autre part, l'écrasante majorité des déchets municipaux (95 % au Royaume-Uni et aux Etats-Unis) sont déposés dans des sites de décharge, alors que le restant étant incinéré. Comme la disponibilité de tels sites est en constante diminution, la proportion de déchets rejetés à l'état brut dans l'environnement va inévitablement en augmentant. Cependant, le rejet dans les océans ne peuvent plus constituer une option crédible, surtout avec les nouvelles restrictions résultant de conventions internationales en matière de limitation de la pollution en milieu marin (au Royaume-Uni par exemple, ces dits rejets ne sont plus permis depuis 1995).

Au Canada, selon le plan vert datant de 1992, les emballages représentent environ 30% des déchets solides des municipalités canadiennes. C'est dans ce

sens que les autorités fédérales ont été sensibles à ce problème et un protocole national sur l'emballage a été signé depuis avril 1990 visant à réduire de 50 % les déchets provenant des emballages d'ici l'an 2000 (Ministère d'approvisionnement et services Canada).

Par ailleurs parmi les déchets retrouvés dans les décharges, le plastique est le plus récalcitrant. D'ailleurs, il représente l'une des principales composantes utilisées pour emballer nos produits de consommation. Cependant, si les produits sont consommés, on ne sait quoi faire de ces emballages sans autre usage. Ils sont soit rejetés à l'état brut dans les décharges puis enfouis, voire rejetés directement dans les océans; soit rejetés dans l'atmosphère après incinération. Ainsi, nous saturons notre environnement par des rejets inertes et persistants. En outre, même le recyclage n'est que partiel, car coûteux en procédé et générant de nouveaux rejets. Ce sont là les limites et donc l'impasse de cette voie.

REVUE DE LITTÉRATURE

La présente section de ce travail porte sur les recherches qui ont été effectuées jusqu'à nos jours sur les différents types de films. La justification du choix de la protéine sera discutée. Le processus de réticulation ainsi que l'influence des agents plastifiants sur les propriétés physico-chimiques des films seront exposés. Un aperçu sur la formation de gels en rapport avec le calcium sera développé. Enfin, on couvrira quelques méthodes d'évaluation de la biodégradabilité.

1- LES DIFFÉRENTS TYPES DE FILMS

Les films à base de protéines ont fait leur apparition depuis longtemps. Les anciens Égyptiens, Chinois, Grecs et Romains ont utilisé la caséine dans la colle mettant en profit sa résistance à l'eau (Gennadios, 1994). La formation d'un film nécessite la dispersion des protéines dans un solvant afin d'obtenir une solution filmogène qui sera ensuite étalée puis séchée. Des études ont mis en évidence que l'utilisation de l'éthanol, du sulfite ou bien de l'acidification, avec l'addition d'un plastifiant tel que le glycérol, sont des conditions indispensables à l'obtention d'un film manipulable, homogène et sans particule insoluble (Gontard, 1994).

De nombreuses protéines d'origine animale ou végétale ont retenu l'attention pour la production de films ou l'enrobage.

1.1- Les films à base de protéines végétales

1.1.1- Le maïs

Le maïs contient 7 à 11 % de protéines (Wall et Paulis, 1978), la fraction principale du maïs est appelée zéine. On en distingue trois classes : α , β et γ (Esen, 1987).

La zéine est insoluble dans l'eau à cause de la composition de ses acides aminés. En effet, la teneur en acides aminés non polaires est très élevée (Shewry et Mifflin, 1985). Dans l'eau, les régions hydrophobiques de ces acides aminés ont tendance à s'associer entre elles. Ceci empêche la dissolution de la protéine (Wall et Paulis, 1978).

Le solvant typique de cette protéine est une solution d'alcool aliphatique aqueuse. En général, un solvant pour la zéine est un mélange d'eau avec un composé organique comme l'alcool, l'acétone et l'acétonyl acétone ou bien un mélange de deux composés organiques anhydres (Pommes, 1971). Une solution alcoolique à base de maïs et de monoglycéride acétylé et antioxydant a été utilisée

pour l'enrobage pâtissier afin de protéger la brillance et prolonger la fraîcheur en retardant le rancissement oxydative (Cosler, 1957, 1959; Alikonis, 1979). L'enrobage par une solution à base de maïs améliore la stabilité des couleurs à la lumière, ce qui augmente la pertinence de l'ajout des colorants dans les bonbons (Signorino, 1969). L'enrobage des tomates avec cette même solution a été utilisé à fin de prolonger leur durée de conservation (Park, 1991).

1.1.2- Gluten de blé

Le blé contient 8 à 15% de protéines (Kasarda et al., 1976). On distingue deux types de protéines: les gliadines qui ont un faible poids moléculaire (2700-3800) et les gluténines qui ont un poids moléculaire élevé (3600-6800). Le gluten de blé présente des propriétés filmogènes intéressantes. Wall et Beckwith (1969) et Okamoto (1978) rapportent des informations intéressantes sur les phénomènes chimiques, mais les films correspondants sont friables et cassants. Anker et al. (1972) ont développé une méthode pour produire des films rigides et flexibles.

1.1.3- Protéine de soja

Les protéines de soja sont un mélange complexe de quatre sous unités ayant des propriétés fonctionnelles respectives. On distingue quatre sous unités sous le nom de: 2S, 7S, 11S et 15S, de poids moléculaires élevés (300'000 à

600'000). Ces protéines ont une structure quaternaire pouvant être dispersée par le chauffage qui va dénaturer la structure secondaire et tertiaire ainsi que les ponts de disulfure des molécules (Kinsella et Whitehead, 1989). Les films à base de protéine de soja sont moins adhésifs et cohésifs.

Les protéines de soja forment aisément un hydrogel. La gélification est un phénomène induit thermiquement par la préparation d'une solution contenant une concentration d'au moins 7 % de protéines à des températures d'au moins 100 °C (Schmidt et Morris, 1984).

1.1.4- Le collagène

Le collagène est une fibre protéique contenue dans la peau, les tendons et les tissus connectifs. Il peut être dissous à partir de sa source naturelle par extraction en milieu soit acide soit basique ou bien en présence d'une solution saline neutre. On distingue deux composés: α et β . Le composé α a un poids moléculaire autour de 100,000. Le composé β a un poids moléculaire de 200,000 (Harington, 1966; Piez et al., 1968). Les films à base de collagène ont été traditionnellement utilisés dans l'industrie de la viande , en particulier pour les saucisses. Pour augmenter la rigidité des films, un procédé de séchage à une humidité de 15 à 40 % est appliqué en présence d'alcool polyédrique comme le

sucrose ou le polyéthylène glycol (Kidney, 1970). L'ajout du glycéraldéhyde favorise les réactions de «crosslinking» au cours du traitement de séchage. On observe alors une augmentation de la rigidité et de la température de résistance du collagène (Jones et Whitmore, 1972). Il a été démontré qu'un film fabriqué à partir d'une solution de collagène où les chaînes de polymères ont été réticulées avait une perméabilité réduite à l'oxygène significativement ($p \leq 0.05$) (Lieberman et Gilbert, 1973).

1.2- Les films à base de protéines animales

Les protéines animales de type laitier sont sécrétées par la glande mammaire de tous les mammifères afin d'assurer une nutrition adéquate et une protection immunologique pour les nouveaux nés (Jenness, 1988). Le lait contient 33g/L de protéines totales ; le lactosérum et les caséines sont les principales fractions protéiques (Dalglish, 1989). Les protéines du lait sont très intéressantes pour former des films grâce à leurs qualités nutritionnelles, leur solubilité dans l'eau ainsi que leurs capacités à former des émulsions.

1.2.1- Les protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum représentent 20 % des protéines totales du lait. Ils sont caractérisés par leur solubilité à un pH de 4,6 (Brunner, 1977). On

distingue cinq types de protéines sériques : l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline, le sérum albumine bovine, l'immunoglobuline et le protéoseptone. La β -lactoglobuline est la majeure fraction protéique dans le lactosérum. C'est une protéine globulaire contenant des groupements sulfhydriles à l'intérieur de la protéine. Le chauffage de cette protéine engendre l'oxydation des groupements sulfhydriles et conduit à une réticulation. L' α -lactalbumine contient quatre ponts disulfures alors que le sérum albumine bovine contient quatorze ponts disulfures. Chacun des monomères de la β -lactoglobuline contient un groupement sulfhydre libre et deux groupements disulfides.

Le lactosérum produit des films transparents, comestibles, flexibles, insolubles dans l'eau et sans odeur. McHugh et al. (1994) ont produit des films en utilisant un traitement de chauffage entre 75 et 100 °C. Un tel chauffage était nécessaire pour la formation des ponts disulfures intermoléculaires requis pour la formation de films. Ces derniers sont moins perméables à l'eau à cause de la présence de ponts disulfures covalents. Cependant, ceux obtenus sont cassants d'où l'idée d'ajouter un agent plastifiant.

1.2.2- La caséine

Le lait est un complexe biologique constitué essentiellement d'eau, de gras, de protéine, d'acide citrique et de composés inorganiques. La caséine est la protéine majeure dans le lait ; elle représente 80 % des protéines totales du lait (Dagleish, 1989). C'est une phosphoprotéine à caractère amphiphile qui s'associe fortement aux ions Ca^{2+} et Zn^{2+} (Schmidt et Morris, 1984; Vuilleumard et al., 1989). Le mécanisme primaire dans la formation de films à base de caséine semble être les ponts d'hydrogènes et les interactions électrostatiques (McHugh et al., 1994). La composition et la structure des micelles de caséines sont données par McMahon et Brown (1984). Les micelles sont composées de submicelles liées par des forces de surface dans lesquelles la distribution de la caséine est inégale, le K-caséine se trouvant à la surface des submicelles. Les principales forces d'interactions entre les micelles de caséine sont les forces électrostatiques et les interactions hydrophobes. D'autres forces peuvent aussi agir, tels les ponts d'hydrogènes, les interactions stériques ou spécifiques entre les groupes de protéines le long de la chaîne macromoléculaire (Schmidt, 1982 ; McMahon et Brown, 1984 et Bloomfield, et Morr., 1973).

Les caséinates commerciales sont obtenues par précipitation du lait à un pH de 4,6 et à la température de 20 °C. À ce pH, les caséines sont coagulées et resolubilisées par l'ajustement du pH à 6,7 en utilisant le sodium, le potassium, le calcium ou l'hydroxyde de magnésium (Gennadios, et al., 1994)

Les films de caséine ne produisent pas une barrière efficace à l'humidité à cause de leur caractère hydrophile qui peut jouer le rôle d'agent émulsifiant créant ainsi une émulsion caséine lipide stable (Avena-Bustillos et Krochta, 1993). Les protéines laitières possèdent de bonnes propriétés pour la formation d'un film. Les caséinates ont une meilleure solubilité que la caséine native, une facilité de faire des ponts hydrophobes, hydrogènes ou électrostatiques, ce qui les rend intéressantes comme sources de substrat pour la fabrication de films. De plus c'est une source de protéines accessibles et à prix compétitif.

Les propriétés de barrières aux gaz et à l'humidité des films à base de caséinates peuvent être améliorées par la réticulation de la protéine en présence de calcium mais aussi en ajustant le pH du milieu au point isoélectrique des protéines. L'ajustement au point isoélectrique optimise les interactions entre les protéines, ce qui modifie la configuration moléculaire et peut avoir une influence

sur les propriétés de transfert de masse (Krochta, 1991; Avena-Bustillos et Krochta, 1993).

Les caséines peuvent être réticulées par une réaction enzymatique (Ikura et al., 1980). Un film à base d' α_s1 caséine est obtenu par des liaisons covalentes ϵ -(γ -glutamyl)lysine en utilisant la transglutaminase (Motoki et al., 1987). Le film ainsi obtenu est stable dans l'eau, le-mercaptoéthanol et l'urée. La force de rupture et l'élongation de ces films sont améliorées par un facteur de deux comparativement aux films sans traitement enzymatique.

1.3- Les films à base de lipides

Les produits alimentaires sont souvent enrobés avec des films à base de lipides afin de prolonger leur durée de conservation et d'améliorer l'apparence des aliments. L'enrobage peut être utilisé pour encapsuler certains condiments alimentaires, bonbons ou médicaments dans le but de protéger leurs saveurs. Les fruits et les légumes peuvent être également enrobés afin de limiter leur respiration et leur perte de poids au cours de l'entreposage.

L'ajout de lipides lors de la fabrication d'emballage améliore la flexibilité et l'imperméabilisation à l'eau. Des agents plastifiants peuvent être ajoutés afin de

réduire la rigidité et d'augmenter la flexibilité et la résistance à l'étirement. Cette particularité est importante surtout si le produit est entreposé à basse température (Kester et Fennema, 1989). En outre l'utilisation des lipides réduit la surface d'abrasion durant les manipulations : ils agissent ainsi comme fongicides, antioxydants et antimicrobiens. L'enrobage avec des composés polaires tend à réduire la perméabilité à l'oxygène (Hagenmaier et Shaw, 1991).

Jusqu'à ce jour, une grande diversité de lipides a été utilisée pour la confection des films comprenant des cires naturelles, des monoglycérides, des polyglycérides et des agents de surface.

1.3.1- Les cires naturelles

Les films à base de cires naturelles sont moins perméables à l'humidité que tout autre film lipidique ou non lipidique. Par contre, les cires n'adhèrent pas parfaitement aux surfaces très humides à cause de leur caractère très hydrophobe (Kester et Fennema, 1986). Il est préférable d'ajouter des monoglycérides acétylés aux cires afin d'y apporter de la flexibilité diminuant ainsi la résistance à la perméabilité de l'eau et des gaz (Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991). Ceci permet d'éviter tout processus de dégradation anaérobie lors de l'enrobage d'un aliment.

1.3.2- Les esters acétiques de monoglycérides

Ces esters sont obtenus par acétylation du monostéarate de glycérol par réaction avec l'anhydride acétique. Lovegren et Feuge, 1954, ont montré que la perméabilité à la vapeur d'eau à travers des films d'acétoglycérides augmente avec le degré d'acétylation. Les films d'acétoglycérides ont été appliqués sur des morceaux de viande de volaille pour les protéger de la déshydratation pendant le stockage. La dessiccation était réduite de 80% par rapport à des pièces de volailles non enrobées (Zabik et Dawson, 1963).

1.3.3- Les acides gras et les polyglycérides

Les acides gras et les polyglycérides et leurs dérivés ont été utilisés comme émulsifiants et agents dispersants. Les mono- et diglycérides sont les plus utilisés comme émulsifiants alimentaires. Ceux-ci sont préparés à la suite d'une trans- estérification du glycérol et du triglycérol. Les alcools à longues chaînes sont utilisés comme additifs dans les films grâce à la fois à leur point de fusion élevé ainsi qu'à leur caractère hydrophobique (Hagenmaier et Shaw, 1990).

1.3.4- Les agents de surface

Les agents de surfaces ou les lipides tensioactifs réduisent l'activité de l'eau (a_w) à la surface d'un produit. Ils ont la propriété de réduire le taux de perte

d'humidité au cours de l'entreposage. L'enrobage des aliments avec un agent de surface contribue à modifier les modes de détérioration 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 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).

1.4- Les films à base de polysaccharides

Les principales caractéristiques des films à base de polysaccharides sont leur perméabilité sélective à l'oxygène et au gaz carbonique. Ils ont été utilisés pour modifier l'atmosphère et réduire la respiration des fruits et légumes (Nisperos et al., 1990). Le principal inconvénient des polymères à base de polysaccharides consiste en une barrière très limitée aux micro-organismes (Kester et Fennema, 1986; Peyron, 1991; Torres et Karel, 1985). Parmi ces films, on distingue ceux à base de cellulose et ceux à base d'amidon.

1.4.1- La cellulose et ses dérivés

C'est un polysaccharide composé de chaîne linéaire : β -D-glucopyranosyl. L'état natif est insoluble dans l'eau à cause du taux élevé de liaison d'hydrogène intramoléculaire dans le polymère de cellulose. On distingue la cellulose non ionique telle que le méthyle cellulose (MC), l'hydroxy-propyl-méthyle cellulose (HPMC) et l'hydroxy propyl cellulose (HPC). Ces composés donnent de bons films flexibles et transparents (Krumel & Lindsay, 1976). Ces films sont toutefois solubles dans l'eau.

Le MC produirait des films qui ont une perméabilité à la vapeur d'eau relativement élevée. Ils ont aussi d'excellentes propriétés de barrière contre la migration des lipides, ce qui explique leur utilisation dans la pâtisserie (Nelson & Fennema, 1991).

L'insolubilité des films MC et HPMC dans l'eau peut être obtenue par «crosslinking» avec la résine formaldéhyde mélanine. Pour l'HPC, on peut incorporer la zéine ou l'éthyle cellulose afin de résoudre le problème de solubilité. Ces films ont été utilisés pour créer une barrière d'absorption des huiles et retardent la perte de l'humidité (Dziezak, 1991).

1.4.2- L'amidon et ses dérivés

On distingue deux polymères dans les granules d'amidon. Ce sont l'amylose et l'amylopectine. Les films à base d'amylose sont isotropiques, inodores, incolores et non toxiques. Ils offrent des similitudes avec les films en plastique quant à leurs caractéristiques physiques, leurs résistances chimiques ainsi que leurs propriétés mécaniques (Wolf et al., 1951). Cependant, le potentiel d'utilisation de l'amylose pour la préparation des films dépend du développement de méthodes de fractionnement de l'amidon et de la découverte de variétés de plantes avec un taux élevé d'amylose. D'ailleurs des films de plastique à base d'amidon sont actuellement sur le marché (Gage, 1990). La présence d'amidon contribue à faciliter l'attaque microbienne via les systèmes enzymatiques.

1.5- Les films composites

Les films composites peuvent être de natures différentes et être composés d'un mélange de polysaccharides, de protéines et/ou de lipides. Ces compositions permettent d'utiliser les avantages et les caractéristiques individuelles de chacune de ces classes de films.

Des films alimentaires composés d'éther cellulosique et d'un mélange d'acides gras (palmitique, stéarique) ont été développés par Kamper et

Fennema (1984-1985). Les résultats ont montré que la perméabilité a été réduite d'un facteur de dix quand les acides gras sont incorporés dans les films en solution. D'autres films composites (cires naturelles avec acide gras ou protéines avec acides gras) ont été proposés notamment par Guilbert et al. (1985).

2- SÉLECTION DU SUBSTRAT COMPOSANT LES FILMS

Selon les différentes études effectuées jusqu'à présent sur les films comestibles, il ressort 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 par comparaison à 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 adéquates. Cette source de protéines est de surcroît, accessible et de prix compétitif. Selon des travaux réalisés au préalable en laboratoire (Brault, 1994), la caséinate de calcium a donné les meilleurs résultats pour leurs bonnes propriétés physico-chimiques et leur capacité à former des réticulats. Ce sel de caséine a donc été utilisé pour la suite de nos travaux.

3- LE PROCESSUS DE RÉTICULATION

La réticulation de monomères permet de former des chaînes polymériques continues et/ou ramifiées permettant ainsi de fournir une matrice suffisamment résistante et adhérente. Les caséines étant des polymères, les réactions de réticulations peuvent y être favorisées par la chaleur, l'utilisation d'enzymes ou de produits chimiques, l'irradiation aux rayons U-V (McHugh et Krochta, 1991) ou aux rayons gamma (Shintani et Nakamura, 1991).

La chaleur est essentielle pour la formation de liens disulfides intermoléculaires en présence de produits à plusieurs acides aminés soufrés.

Parmi les enzymes utilisées, on peut citer la transglutaminase, la lipoxygénase, le lysyl-oxidase, le polyphenol-oxidase et la peroxydase (Stuchell et Krochta, 1994). La transglutaminase est une enzyme bien spécifique qui catalyse la formation de ϵ -(γ -glutamyl)lysine dans les protéines (Folk, 1980). Toutefois, étant peu abondante et à coût élevé, son utilisation a dissuadé toute exploration pour la production de films comestibles.

Parmi les produits chimiques pouvant être utilisés, on trouve le triallylcyanurate (TCA), le triméthylpropanetriméthacrylate (TRIM), l'éthylène glycol diméthacrylate (EDMA), le 1.4-butanadiol-diméthacrylate

(BDMA) et le triméthylolpropanetriacrylate (TMPTA). Ces agents peuvent être classés dans deux catégories, soient ceux qui ont une saturation terminale et ceux qui ont un groupe terminal actif. L'effet de la réticulation par le (TAC) peut être amplifié par l'addition de peroxydes (Rodiger et Du Plessis, 1986).

L'irradiation permet la formation de liens covalents plus résistants alors que les méthodes conventionnelles vont favoriser la formation de liens hydrophobes, électrostatiques et hydrogènes (McHugh et Krochta, 1994). En plus, l'irradiation est moins coûteuse que les enzymes avec un pourcentage de 90% des liens formés qui sont covalents.

3.1.-Les mécanismes réactionnels

La réticulation d'une solution protéique en utilisant l'irradiation au Cobalt 60 est possible. Cette source de rayonnement ionisante gamma est la plus utilisée au Canada. Le Co^{60} est un isotope radioactif obtenu par bombardement du Co^{59} stable par des neutrons dans un réacteur nucléaire.

L'effet de l'irradiation sur un substrat engendre la production de produits intermédiaires pour finalement produire des composés stables via des radicaux libres (Singh et Singh, 1982; Simic, 1983). La réticulation d'une solution

protéique au Co^{60} sous une atmosphère inerte produit majoritairement plus de radicaux $\bullet\text{OH}$ grâce à l'interaction de l'électron solvaté.

L'irradiation en présence d'oxygène (O_2) produit des ions radicalaires superoxydes ($\bullet\text{O}_2$) (voir figure 1), soit par l'interaction directe d' e^-_{aq} avec une molécule d'oxygène, soit par l'interaction indirecte d'un radical ($\bullet\text{H}$) et d'une molécule O_2 .

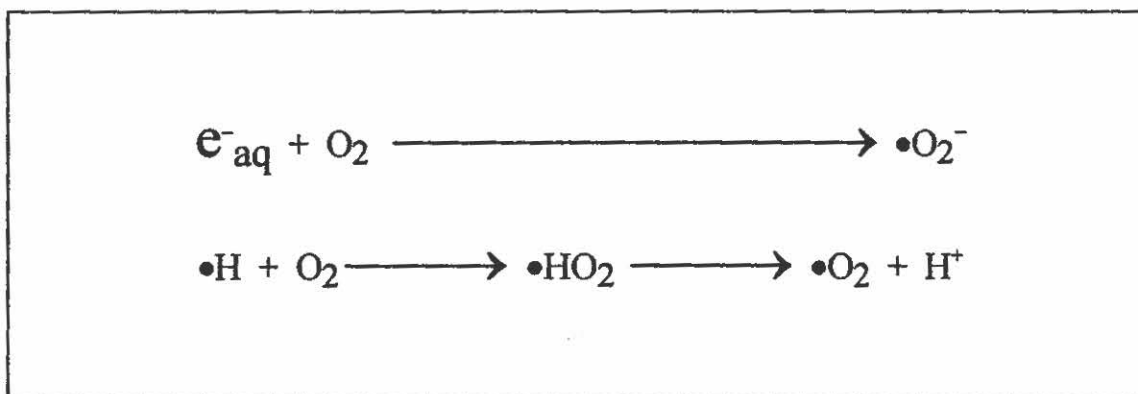


Figure 1 : Mécanisme réactionnel de l'électron solvaté et du radical $\bullet\text{H}$ avec l'oxygène du milieu (Fricke et Hart, 1966 ; Ferradini et Pucheaut, 1983 ; Fridovich, 1983).

À pH neutre, le radical hydrodioxyle ($\bullet\text{HO}_2$) est rapidement déprotoné (pK_a 4,8) pour former encore plus de radicaux superoxydes (Ferradini et Pucheaut, 1983 ; Fridovich, 1983).

L'irradiation sous atmosphère inerte produit environ 8% de radical hydrogène ($\bullet\text{H}$) (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 inerte et en présence d'absorbant radicalaire (par exemple: alcool t-butylque, mannitol, acide urique) a démontré que le radical ($\bullet\text{H}$) n'est pas impliqué dans la formation de liaisons covalentes ou dans le processus de polymérisation (Davies et al., 1987a).

En présence de radicaux $\bullet\text{OH}$, on observe une formation progressive de liens covalents formant ainsi un «crosslinking» particulièrement due à la formation intermoléculaire de bityrosine (Davies et Delsignore, 1987).

3.2- L'interaction des acides aminés avec les radicaux libres

Dans une solution aqueuse et en absence d'oxygène, les acides aminés simples subissent les réactions radiolytiques suivantes (exemples : abstraction de l'hydrogène, déamination réductive et décarboxylation). L'oxygène bloque la

déamination réductive en déplaçant l'électron (e-) et le radical •H. Les acides aminés aromatiques et sulfuriques réagissent plus rapidement avec les radicaux libres que les acides aminés aliphatiques (Stockhausen et al., 1978-1988). En particulier, les radicaux •OH réagissent avec les résidus aromatiques.

Certains acides aminés tels que la cystéine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine, sont plus susceptibles que d'autres à interagir avec les radicaux •OH (Delincée, 1983 ; Yamamoto, 1977). L'exposition de protéines aux radicaux •OH sous atmosphère inerte produit, à la fois la formation de nouvelles liaisons entre deux résidus de tyrosines, et une perte significative ($p \leq 0,05$) des résidus de tryptophane (Davies et al., 1987a). Le radical tyrosyl est formé par l'abstraction d'un atome d'hydrogène sur la fonction hydroxyle du résidu tyrosine par le radical •OH. (voir figure 2). Le radical tyrosyl ainsi formé peut réagir avec un autre radical tyrosyl ou avec une molécule de tyrosine, pour former un composé biphénolique stable principalement sous la forme 2,2'-biphénol due à l'effet ortho-orienteur impliqué (Prütz, 1983).

La formation de bityrosine est davantage une liaison intermoléculaire qu'intramoléculaire. Elle représente un facteur important dans le processus de polymérisation des protéines traitées aux radicaux •OH (Davies, 1987). Près de

90% de la polymérisation protéique induite par le radical $\bullet\text{OH}$ est attribuable à la formation de nouvelles liaisons covalentes intermoléculaires autres que les ponts disulfures. Les 10% restants, représentent l'agrégation générée par les interactions non covalentes et les ponts disulfures (Davies, 1987). Le radical $\bullet\text{OH}$ est le principal agent responsable de la destruction du tryptophane (Davies et al., 1987a).

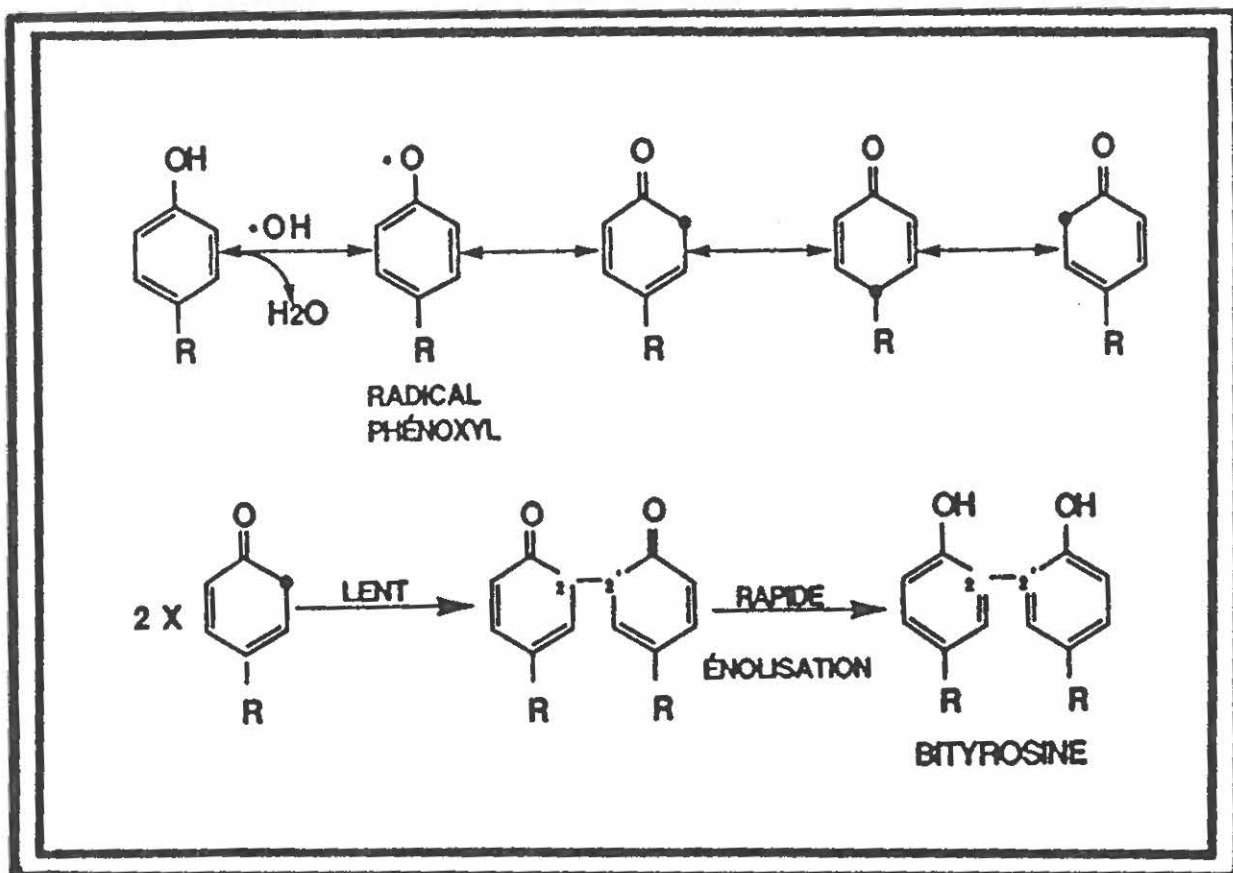


Figure 2: Mécanisme réactionnel et formation de bityrosine (Prütz, 1983).

4- INFLUENCE DES AGENTS PLASTIFIANTS

L'agent plastifiant est une substance non volatile possédant une température d'ébullition élevée et ne favorisant aucune séparation de phases lorsqu'il est ajouté à un polymère. Il induit alors un changement des propriétés physiques et mécaniques. L'effet plastifiant des polyols est dû à leurs habilités à réduire les ponts hydrogènes internes de la protéine diminuant ainsi la cohésion interactive et augmentant l'espace moléculaire.

L'ajout d'un polyol peut stabiliser la conformation des protéines. Les réactions d'agrégation préférentielle indiquent que le potentiel protéique chimique augmente avec l'augmentation de la concentration d'agents plastifiants. En d'autres termes, l'augmentation du coefficient d'activité d'un composé correspond à la diminution de sa concentration dans une activité constante ou une diminution de sa solubilité. L'agent plastifiant interagit favorablement avec l'eau à travers les ponts d'eau et en renforcent la structure des solvants (McDuffie et al., 1962).

La présence d'agents plastifiants dans un milieu aqueux peut augmenter le potentiel chimique de la protéine. En d'autres termes, la solubilité de la protéine est diminuée. Étant une substance hydrophile, l'agent plastifiant va interagir

fortement avec les molécules d'eau qui forment une sphère d'hydratation autour de la protéine. On dit alors que la protéine est préférentiellement hydratée, car l'agent plastifiant est préférentiellement exclu du domaine hydrophobe de la protéine augmentant ainsi l'hydrophobicité de cette dernière (Gekko et Timasheff, 1981). Les groupes non polaires dans la surface protéique doivent être exclus afin de réagir avec le solvant. Les groupes hydrophobes de la surface préfèrent migrer à l'intérieur de la protéine pour éviter le contact avec le solvant. Une telle migration est empêchée par la structure tridimensionnelle compacte de la protéine et par le fait que les groupes hydrophobes sont reliés par des liaisons covalentes à la chaîne polypeptidique des protéines. Une fraction considérable de la surface native globulaire est hydrophobique. Dans ce sens, cette surface est occupée par des atomes qui n'ont pas l'habileté de former des ponts d'hydrogène (Bull et Breese, 1968 ; Gekko et Timasheff, 1981).

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).

Des agents plastifiants peuvent être ajoutés pour donner de la flexibilité aux films comme les polyols tels que le glycérol, le propylène glycol, le triéthylène glycol, le sorbitol, etc. (Peyron, 1991). Le triéthylène glycol et le propylène glycol sont approuvés comme additifs alimentaires par l'U.S. Food & Drug Administration (Code of Federal Regulations, 1980).

5- LES GELS ET LE CALCIUM

La capacité de certaines protéines à former des gels de structures différentes est très importante dans l'industrie alimentaire. Les propriétés texturales, les caractéristiques sensorielles ainsi que les taux de transformations dans les aliments (par exemple, le fromage, le yoghourt et la crème) sont liés directement à la formation des gels protéiques au cours du chauffage.

Clark (1992) définit le gel comme un réseau solide et continu suite à l'assemblage à partir de particules ou polymères imprégnés dans une solution aqueuse. Les propriétés des gels dépendent de la nature de la protéine, sa concentration, son pH, l'environnement ionique, la durée de chauffage et les interactions avec les autres ingrédients (Clark, 1992 : Barbut, 1994). Les gels protéiques peuvent être divisés en deux grandes catégories. La première étant la structure globale, formée typiquement par du blanc d'oeuf à pH 7. La deuxième

consiste en un lit fin de gel clair ou mi-clair qui peut être formé par la gélatine et la protéine de lactosérum en présence de sodium ou de calcium (Doi, 1993).

Le composé minéral a un effet significatif sur les caractéristiques des gels (Schmidt et al., 1978). Le chauffage est également essentiel à la formation de gels. En comparant l'effet du calcium et du sodium à faible concentration sur la fermeté des gels à base de β -lactoglobuline, on note un effet significatif du calcium (Mulvihill et Kinsella, 1988). L'effet primaire du chlorure de calcium (CaCl_2) est probablement l'implication des interactions électrostatiques (Damodaran et Kinsella, 1982). Le Ca^{2+} favorise les interactions entre les polymères ainsi que le déroulement des molécules de protéine afin de former une matrice.

6- LA BIODÉGRADABILITÉ

L'augmentation des quantités de plastiques dans les déchets municipaux solides (8 à 10%), leur résistance à la dégradation a suscité l'intérêt pour toute alternative qui limiterait l'effet négatif de ces résidus, notamment sur la faune et la flore (Green et al., 1974). Dans cette perspective, les premières recherches ont été entamées pour produire des polymères de plastiques biodégradables (Guillet et al.,

1992 : Gould et al., 1990). La plupart des polymères, spécialement ceux à base de produits pétrochimiques, résistent aux attaques enzymatiques à cause de leur insolubilité dans les solvants polaires ou non polaires, à cause de leurs poids moléculaires élevés.

Les efforts pour rendre le plastique biodégradable doivent être orientés vers deux directions : soit d'essayer de trouver de nouveaux polymères avec une structure proprement photo- ou/et biodégradable, ou bien modifier la structure des polymères existants ; soit d'incorporer des additifs biodégradables, qui, en disparaissant, contribuent à l'altération ou la destruction de l'intégrité structurale du polymère.(Cain, 1992)

6.1- Les méthodes de biodégradabilité

La biodégradation est le processus par lequel les bactéries, moisissures, levures et leurs enzymes consomment une substance comme source de nourriture de sorte que la forme originale de cette substance disparaît (Klemchuk, 1990).

L'habilité des micro-organismes à se multiplier dans le polymère synthétique nécessite le changement dans la masse de celui-ci avec les

changements des propriétés physiques ou/et chimiques qui s'y associent. Pour vérifier la biodégradabilité, plusieurs tests ont été utilisés.

6.1.1- Test de pourcentage de croissance

L'échantillon de plastique est placé dans un milieu d'Agar solide déficient en source de carbone. Après inoculation avec des micro-organismes, le milieu contenant l'échantillon est incubé pendant trois semaines. Durant cette période, la culture est examinée et la croissance des colonies est notée. Le protocole d'essai ASTM G21-70 stipule l'utilisation d'une culture de *champignons* (*Chaetomium globosum*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium funiculosum* et *Aspergillus Niger*) comme inoculum. Le choix de ces champignons est basé sur leur longue durée d'utilisation. Le protocole ASTM-G22-76, y est similaire avec pour seule différence l'utilisation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* comme inoculum (Cain, 1992).

6.1.2- Test de libération de l'ammoniaque

Les bactéries libèrent de l'ammoniaque après l'attaque du carbone catabolisable et de la source d'énergie (Gronlund et Campbell, 1965). L'utilisation des protéines endogènes et de l'ARN libère l'ammoniaque linéairement dans le temps dès que la consommation commence (Mackelvie et al., 1967). Cette

technique est exploitée pour la première fois par Sharp et Woodrow (1972) dans l'investigation de film de plastique (PVC) biodégradable. Ces auteurs ont observé une corrélation inverse entre la production d'ammoniaque et la perte de poids des films de (PVC) ($r=0.989$). L'exactitude et la sensibilité de la méthode de dosage de l'ammoniaque peuvent être déterminées par des méthodes titrimétriques ou colorimétriques.

6.1.3- Test de dioxyde de carbone

La méthode de l'ASTM D 5209-92 consiste à sélectionner le plastique pour la détermination de sa biodégradabilité en aérobie. Une boue activée des rejets d'égouts de collecte est obtenue à partir des usines de traitement d'eaux usées pour préparer l'inoculum. Par la suite, on expose le plastique à l'inoculum aéré et on mesure l'évolution du dioxyde de carbone déduit en fonction du temps, le contenu du carbone organique soluble et du poids résiduel du polymère ce qui permet d'estimer le degré de la biodégradabilité.

6.2- Choix de la bactérie

Pseudomonas aeruginosa est une espèce bactérienne fréquente dans l'environnement et pouvant synthétiser une quantité d'enzymes très diverses.

C'est un bâtonnet Gram⁻, généralement de (0,5 à 0,8 sur 1,5 à 3) nm de dimensions, chimio-organotrophe, aérobique avec une seule flagelle mobile. Sa croissance se fait à 42 °C (Lanyi et Bergan, 1978).

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

L'utilisation de *Pseudomonas* pour la dégradation de composantes diverses est très intéressante étant donné sa résistance à différentes conditions de stress (comme par exemple la température et la source de carbone), et sa capacité de synthétiser une importante quantité d'enzymes (Tortora et al., 1989). Les principales protéases synthétisées pour la biodégradation de la caséine sont des métalloprotéases et des sérineprotéases (Alichanidis et Andrews, 1977 ; Davies et al., 1987b).

6.3- Susceptibilité à la protéolyse

Le groupe de recherches Davies et Delsignore (1987) ; Davies et al. (1987b) a démontré que lorsque l'ASB était traitée avec des radicaux $\bullet\text{OH}$, celle-ci devenait plus susceptible à la protéolyse par les enzymes cellulaires, ce qui peut être expliqué par le processus de dénaturation (dépliment ou augmentation de l'hydrophobicité). Il a été observé qu'une souche d'*Escherichia coli*, des extraits cellulaires d'erythrocytes humains ou de lapins ainsi que 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 des enzymes cellulaires sont peu compris (Davies, 1987).

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

LA PROBLÉMATIQUE

Comme 80% des emballages se trouvent dans les décharges et seulement 18% d'entre eux sont recyclées, il devient donc justifié d'explorer de nouvelles avenues au lieu de déplacer le problème en le repoussant un peu plus loin.

N'est il donc pas temps, à cette étape de notre histoire technologique, de tout mettre en oeuvre afin de maîtriser la production d'emballages à partir de substrats qui soient abondants, accessibles, économiques et surtout biodégradables, voire comestibles?

L'HYPOTHÈSE DU PROJET DE RECHERCHE

Les films de caséinate, comme nous l'avons déjà mentionné, se sont avérés intéressants à plusieurs égards, notamment pour leur transparence et leur flexibilité. Le substrat de base est facilement accessible et d'un prix compétitif.

Nous posons comme hypothèses : qu'un traitement d'irradiation d'une solution de caséinate permettra l'obtention d'une réticulation de ces polymères ; que l'ajout d'agents plastifiants et d'ions divalents (Ca^{++}) favorise les réactions de réticulations au cours du traitement d'irradiation ; que l'optimisation des réactions de réticulation permettrait d'améliorer les propriétés mécaniques des films.

LES OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Ce travail de recherche porte sur l'élaboration d'un polymère protéique biodégradable qui pourrait frayer une piste alternative aux produits usuels. Nous pouvons énumérer les objectifs de recherche comme suit:

- 1) Vérifier l'effet de l'irradiation sur les réactions de réticulations des solutions protéiques.
- 2) Étudier l'effet de l'ajout d'agents plastifiants (propylène glycol et triéthylène glycol) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% p/p et de chlorure de calcium à des concentrations de (0 ; 0,125 et 0,250)% p/p sur les réactions de réticulation.
- 3) Vérifier la biodégradabilité d'un film sélectionné par une bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

Moyens pour atteindre les objectifs :

- 1- Les doses d'irradiation effectuées sont de (0, 8, 16, 32, 64, 96 et 128) kGy à un débit de dose de 1,5 (kGy/h). L'irradiation a été réalisée sous atmosphère inerte.
- 2- La protéine choisie est la caséinate de calcium (alanate 380) selon les conditions optimales déjà mises au point (5% protéines) (Brault, D., 1994).

3- Les réactions de réticulation seront évaluées selon les critères suivants :

- Par la détermination de la production de bityrosine dans les solutions selon une méthode de Davies (1987) ; Davies et al. (1987a). La bityrosine est mesurée aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 325 nm, et 410 nm.
- Par la mesure de la force de rupture des gels obtenus après chauffage des solutions protéiques selon une méthode développée par Sakamoto et al. (1994). Cette force est déterminée à l'aide d'un texturomètre Voland, un poinçon de 3 mm de diamètre pénétrant à une vitesse de 2mm/sec et une distance de pénétration de 10cm
- Par l'évaluation des propriétés rhéologiques des films (force de rupture et viscoélasticité) qui seront déterminées à l'aide d'un texturomètre Voland selon la méthode du groupe de recherches de Gontard et al. (1992). La force de rupture est évaluée en utilisant un poinçon de 2mm, pénétrant à une vitesse de 1mm/sec, et ce, jusqu'à la 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 3 mm.

- La biodégradabilité sera évaluée en utilisant une solution dont la seule source de carbone sera le film en présence d'une bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC_15442. Trois milieux à base d'eau saline seront utilisés: le premier contient le film seul, le deuxième contient la bactérie seule et, le troisième contient le film avec les bactéries. La cinétique de digestion des films sera évaluée en dosant l'azote soluble libéré au cours de la fermentation selon la méthode de Callely et al. (1978) par l'appareil Leco FP-428. L'azote soluble dans l'acide trichloroacétique permettra d'évaluer le contenu en azote total représentant les composés ayant un poids moléculaire inférieur à 10,000. Le nombre de liens peptidiques sera évalué au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 210nm pour seulement deux milieux, celui contenant le film seul ou celui contenant le film avec les bactéries. Le dénombrement bactérien sera évalué au cours de la fermentation afin de suivre la croissance bactérienne selon la méthode officielle microbiologique pour les trois milieux.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- OPTIMISATION DE LA COMPOSITION DU POLYMÈRE

1.1- Préparation des solutions protéiques

Les solutions protéiques utilisées sont à base de caséinate de calcium (alanate 380, New Zealand Milk Products, Inc., Ca, USA). D'après le bulletin fourni par la compagnie, le contenu en protéines y est certifié de 91 % . La composition de la caséinate de calcium est comme indiqué au tableau suivant :

ÉLÉMENTS	PROTÉINES	MINÉRAUX	HUMIDITÉ	MAT. GRASSE	LACTOSE
ALANATE	91.8 %	3.8 %	3.9 %	0.7 %	0.1 %

Tableau 1: Composition du Caséinate de Calcium (Alanate 380).

D'autre part, ce contenu en azote total a été vérifié au laboratoire avec un appareil (Leco, FP-428; MI, USA). Il y était de l'ordre de 94,2%. C'est ce pourcentage qui a été retenu pour déduire les concentrations en protéines (% p/p) au moment de la formulation des solutions.

La concentration en alanate est de 5 % p/p. selon les concentrations optimales déterminées. La préparation consiste à solubiliser l'alanate dans un

tampon tris-Hcl (Sigma, St-Louis, U.S.A.) 1 mM à pH 8, en présence d'agents plastifiants «Propylène glycol (PG), Triéthylène glycol (TEG)» (A&C, Montréal, Canada) à trois concentrations (0 ; 2,5% et 5%) p/p. La solubilisation est faite sous agitation magnétique pendant 30 minutes à une température de 25°C afin de disperser les micelles qui pourraient s'y former.

Après solubilisation complète de la solution protéique, il est nécessaire d'appliquer un vide de 15 minutes sous agitation magnétique, suivi immédiatement d'un barbotage d'un gaz inerte (Linde, Union Carbide, Toronto, Canada) pendant une seconde période de 15 minutes sous agitation. Après l'étape de dégazage, la solution est versée dans des bouteilles à bouchons vissables sous flux de gaz inerte. Les bouteilles sont ensuite scellées à la paraffine et enveloppées avec un papier d'aluminium pour assurer la noirceur afin que les réactions radicalaires les plus longues soient achevées. Elles sont ensuite placées dans l'irradiateur.

1.2- L'irradiation des solutions protéiques

L'irradiation est réalisée dans un irradiateur au Co^{60} de type Gammacell_220 à un débit moyen de dose de 1,5 (kGy/h) pour les doses de (8, 16, 32, 64, 96 et 128) kGy. L'opération a été effectuée aux installations du Centre d'Irradiation du Canada (CIC.), Institut Armand-Frappier situées à la ville de Laval (Québec).

Après chaque période d'irradiation, une attente de 20 à 30 minutes est allouée afin que les réactions les plus longues soient complétées et pour éviter aussi une photodécomposition des biphénols (Leher et Fasman, 1976; Prutz, 1983). Après irradiation, les solutions sont homogénéisées. Le calcium est enfin ajouté selon trois concentrations différentes (0 ; 0,125 % et 0,250 %) p/p afin d'éviter la précipitation de ce dernier au cours du traitement d'irradiation. La solubilisation se fait sous agitation magnétique.

1.3- L'évaluation de la réticulation

1.3.1- Le taux de formation de bityrosine

100 μl de la solution protéique irradiée est prélevée et complétée à 10 ml avec un tampon HEPES (A&C, Montréal; Canada) 20 mM, pH à 7 afin d'éviter une saturation de l'appareil. Le contenu en bityrosine est évalué par fluorescence

(Davies et al., 1987a) à l'aide d'un spectrofluoromètre (Spectrofluorometer 2070, Varian, CA, USA) au Xénon (75W) sur un volume d'injection de 90 µl. Les détecteurs sont des photomultiplicateurs pour l'excitation et l'émission. Le seuil de détectabilité est de 0,03 ppb de sulfate de quinone dans une solution de H₂SO₄ à 0,1M. Le spectrofluoromètre est relié à un HPLC (High Performance Liquid Chromatography: VISTA 5500, Varian, CA, USA) qui est raccordé à son tour 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 (PC 486/33MHz) permettant la lecture et le traitement des données (Varian Star Workstation, Copyright 1989-1992, Varian Associates Inc., CA, USA). La lecture de données est d'une durée fixe de 60 secondes. Le taux de formation de bityrosine est mesuré aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 305 nm et 415 nm (± 5 nm) respectivement. L'évaluation du taux de formation de bityrosine est estimée qualitativement par le calcul de l'aire sous la courbe. Des essais ont montré que ni le tampon HEPES (20 mM, pH 7), ni le propylène glycol, ni le triéthylène glycol à différentes concentrations ne génèrent de signaux caractéristiques supérieurs au bruit de fond pour des solutions, qu'elles soient irradiées ou non irradiées.

1.3.2 La formation des gels

1,25 ml de la solution protéique irradiée ou non irradiée sont versés dans des tubes à bouchon vissables placés sur un support. Ce dernier est immergé dans un bain-marie à 90 °C pour une durée de quatre heures. Les tubes sont ensuite retirés et mis au réfrigérateur pendant une nuit avant de prendre les mesures sur les gels.

La force de rupture des gels est mesurée avec un Texturomètre Voland (Stevens-LFRA Texture Analyser, modèle TA-1000, NY, USA) muni d'un poinçon de trois millimètres de diamètre calibré avant chaque utilisation. Les conditions d'expérimentations sont les suivantes:

- La vitesse de descente du poinçon est de 2 mm/s.
- La distance de pénétration est de 10 cm.
- La vitesse de déroulement du papier de l'imprimante est de 50 cm/mn.

La force de rupture en grammes (g) est reportée sur le graphique par le premier pic correspondant à la résistance du gel lors de la pénétration du poinçon.



Figure 4 : Texturomètre Voland (Stevens-LFRA Texture Analyser, modèle TA-1000, NY, USA).

1.3.3- La formation des films

Cinq millilitres (5 ml) de la solution protéique sont déposés uniformément en évitant la formation de bulles d'air, dans une boîte de pétrerie qui est à son tour placée sur une surface plane. Le film se forme au cours d'une période de 18 heures de séchage à l'air libre, à 25 °C. Cette méthode est une adaptation de celle des équipes de recherches de Gontard et al. (1992) et Krochta (1991).

Après le temps de séchage, le film est retiré de son support, son épaisseur est déterminée à l'aide d'un appareil de mesure «Digimatic Indicator» (Mitutoyo, Japan). Les films obtenus sont placés dans un dessiccateur contenant une solution de bromure de sodium saturée (Gontard et al., 1992) pendant 48 heures afin d'assurer une atmosphère de 56% d'humidité relative (Ganzer et Rebenfeld, 1987). Les films humidifiés sont ensuite solidement immobilisés entre deux plaques de Plexiglas exposant une surface de 3,2 cm de diamètre pour les mesures de la force de rupture et la viscoélasticité des films. Les propriétés physico-chimiques sont évaluées à l'aide d'un Texturomètre Volland ((Stevens-LFRA Texture Analyser, modèle TA-1000, NY, USA) muni d'un poinçon de deux millimètres de diamètre.

1.3.3.1- La force et la déformation à la rupture des films

La force de rupture des films est calculée à partir de la poussée du poinçon qui est enregistrée et imprimée puis convertie en unité de force (N). La déformation à la rupture est aussi enregistrée et imprimée en même temps. Elle est exprimée en millimètre selon les conditions d'expérimentation suivantes :

- La vitesse de descente du poinçon est de 1 (mm/s).
- La distance de pénétration est de 10 cm.
- La vitesse de déroulement du papier de l'imprimante est de 50 (cm/mn).
- Le texturomètre est calibré contre une masse de 1000g.

1.3.3.2- La viscoélasticité

La viscoélasticité d'un film est évaluée à l'aide de la courbe de relaxation obtenue suite à l'application d'une force maintenue par le poinçon sur le film.

Les conditions d'expérimentations sont les suivantes:

- La vitesse de descente du poinçon est de (1mm/s).
- La distance de pénétration est de 3 mm.
- La vitesse de déroulement du papier de l'imprimante est de 10 (cm/mn).

Deux valeurs de la force sont enregistrées à un intervalle de 60 secondes

(Peleg, 1979). L'équation de calcul du coefficient de relaxation (Y), est ainsi:

$$Y(1\text{min}) = \frac{(F_0 - F_1)}{F_0}$$

où F_0 : force initiale
et F_1 : force à 60 secondes.

2- VÉRIFICATION DE LA BIODÉGRADABILITÉ

2.1- Les paramètres de base

2.1.1 Le milieu de culture

Le milieu de culture de base choisi est un milieu de base (NaCl 0,8%) (Anachemia, Montréal, Canada) dont la seule source de carbone est le film. Afin de pouvoir comparer l'évolution de la croissance bactérienne, on a préparé les trois milieux suivants qu'on a placés dans des erlenmeyers de 500 ml, soient:

- ◆ Milieu A : échantillon de film + *Pseudomonas aeruginosa* (4ml) + 296 ml de NaCl à 0,8 %.
- ◆ Milieu A1 : *Pseudomonas aeruginosa* (4ml) + 296 ml de NaCl à 0,8 %
- ◆ Milieu A2 : Échantillon de film + 300 ml de NaCl à 0,8 %

Avant l'inoculation, la stérilité des milieux est vérifiée. L'expérience est répétée trois fois.

2.1.2 La souche bactérienne

La souche utilisée est *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Elle est conservée dans un congélateur à -80 °C avec du glycérol (A&C, Montréal, Canada) à 10%. Pour l'inoculation, la souche est repiquée deux fois dans un bouillon nutritif : Nutrient Broth (Becton Dickinson, MD,USA) afin d'adapter la souche et la recueillir en pleine phase de croissance.

Un millilitre (1ml) de la culture-mère est prélevé, auquel est ajouté neuf millilitres (9ml) d'eau saline à 0,8% NaCl (Anachemia, Montréal, Canada). Le tout est soumis à une centrifugation à 2700 rpm pendant 20 minutes (Centrifugeuse : Sorvall Instruments, RC5C, Dupont Company, Chemical and Instrument, Systems Division, Newtown). Après quoi, le surnageant est jeté. Cette manipulation est répétée trois fois afin de s'assurer d'un bon lavage des cellules en éliminant toute présence de substances nutritives pour les bactéries. L'inoculation est réalisée après avoir prélevé quatre millilitres (4ml) de l'inoculum. Le compte bactérien est par la suite évalué aux jours 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 et 40.

2.1.3 Les films

Un seul type de film est sélectionné pour vérifier la biodégradabilité. Le mélange choisi contient 5% de caséinate de calcium et 2,5% de Propylène glycol. La biodégradabilité des films irradiés à 4 et 64 kGy est évaluée afin de cerner l'effet de la réticulation sur les rendements de biodégradabilité. Comme les films vont constituer la seule source de carbone dans notre milieu, cinq films fabriqués à partir de dix millilitres (10 ml) de solution chacun, ont été préparés selon la méthode décrite auparavant. Ceux-ci ont été coulés et prélevés stérilement. Avant l'inoculation, la stérilité des milieux est vérifiée. Une fois les milieux sont prêts,

les erlenmeyers sont incubés à 37°C sous agitation pendant 40 jours. Un prélèvement est effectué tous les quatre jours.

2.2- Les tests d'évaluations de la biodégradabilité

2.2.1- Le dénombrement bactérien

Le dénombrement bactérien a été fait en dupliqua sur milieu Nutrient Agar (Becton Dickinson, MD, USA) selon la méthode de dénombrement conseillée par la Direction Générale de la Protection de la Santé (DGPS; santé et bien-être social Canada, 1979). Les décomptes bactériens sont vérifiés après 24 et 48 heures d'incubation à 37 °C ±2 °C. Seuls les décomptes se situant entre 30 et 300 sont retenues.

2.2.2- Le dosage de l'azote soluble

Cinq millilitres (5ml) de chacun des trois milieux (A, A1 et A2) sont prélevés et déposés dans des tubes auxquels cinq millilitres (5 ml) d'Acide Trichloro-Acétique (TCA) à 10 % (A&C, Montréal, Canada) sont ajoutés. Le contenu en azote soluble représente l'azote protéique ayant un poids inférieur à 10,000 daltons.

Après centrifugation à 15,000 rpm pendant 20 minutes à +4 °C, le surnageant est récupéré dans des bouteilles où le pH est ajusté à 7. Le surnageant est congelé à -80 °C pendant cinq heures puis lyophilisé pendant 24 heures. La lyophilisation est un procédé par lequel un produit est desséché à froid et sous vide afin de concentrer le produit sans altérer les nutriments. L'azote total est dosé sur 0,100 gramme d'échantillon à l'aide d'un appareil (LECO FP-428, MI, USA).

Il y a trois phases pendant le cycle d'analyse: la purge, la combustion et l'analyse proprement dite. Pendant la première phase, l'échantillon encapsulé dans un papier en étain est placé dans le carrousel puis scellé et purgé de tous les gaz atmosphériques. Tous les circuits de gaz (O₂, air et azote), de même que le ballast (cylindre de verre dans lequel un piston se soulève quand les gaz entrent et le repousse vers la boucle d'échantillonnage) sont également purgés.

Pour la phase de combustion, l'échantillon est poussé dans une fournaise (950 °C) et mis en présence d'oxygène pur pour une très rapide combustion. Les produits de combustion qui sont principalement le CO₂, H₂O, NO₂ et N₂ circulent à travers le système de refroidissement afin d'enlever la plus grande partie d'eau et sont recueillis dans le ballast.

Pour la dernière phase d'analyse, le piston est poussé vers le bas et 10 cm³ du mélange gazeux passent à travers la spirale d'échantillonnage (valve de dosage). L'échantillon passe ensuite à travers du cuivre chaud, ce qui enlève l'oxygène et change les groupements NO_x en N₂. Il est ensuite balayé à travers deux filtres : Lecosorb® et Anhydrone® pour enlever le CO₂ et l'eau respectivement. Le produit de combustion restant n'est autre que l'azote. Il est mesuré par une cellule de conductivité thermique. Les résultats sont alors exprimés en pourcentage d'azote totale ou de protéines après multiplication d'un facteur de conversion de 6,25.

Avant de commencer l'analyse, il est à rappeler que l'appareil doit être calibré en passant des blancs (l'air), un standard de calibration (le maïs) contenant un pourcentage d'azote connu (1,438).

2.2.3- Évaluation des liens peptidiques

La densité optique détermine l'évolution du nombre de liens peptidiques solubilisés au cours de la fermentation. 1,5 ml de chaque milieu (A et A2) est prélevé et placé dans des tubes. Après centrifugation à 2,700 rpm pendant 20 minutes, le surnageant est récupéré pour l'évaluation du contenu en liens

peptidiques. Celle-ci est déterminée par la mesure de la densité optique (DO) au spectrophotomètre de type DMS 220 à la longueur d'onde de 210 nm.

3- L'ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats de l'effet de la réticulation ont été soumis à une analyse de variance suivie d'un test de DUNCAN pour les comparaisons multiples. Le test de STUDENT a été utilisé pour les comparaisons par paires.

Pour les résultats de la biodégradabilité, on a utilisé la régression linéaire dans les cas du compte bactérien et celui du dosage de l'azote soluble. Quant à la densité optique, on a utilisé le test de Student.

RÉSULTATS

Cette section se compose de deux volets. Le premier est consacré aux résultats des expériences portant sur les effets de la réticulation par irradiation sur le comportement d'un composé à base de caséinate de calcium contenant différentes concentrations d'agents plastifiants (0 ; 2,5 et 5% de Propylène glycol (PG) et Triéthylène glycol (TEG)). Le suivi de ce comportement couvre son état liquide (mesures des taux de formation de bityrosine), son état de gel (mesures de la force de rupture) et son état de film (mesures de la force de rupture et de la viscoélasticité).

La composition présentant le comportement optimal a été sélectionnée pour confectionner le film qui a été soumis à son tour à des tests de biodégradabilité. Ces derniers ont généré trois groupes de mesures qui constituent le deuxième volet de résultats. Il s'agit des mesures du pourcentage d'azote soluble, des comptes bactériens ainsi que des liens peptidiques.

1- ÉVALUATION DES EFFETS DE LA RÉTICULATION

1.1.-Le taux de formation de bityrosine

Les résultats exposés dans les tableaux (2, 3 et 4) ci-après représentent les valeurs du taux de formation de bityrosine induit par le seul effet de l'irradiation.

Ces valeurs ont été calculées en déduisant la valeur moyenne obtenue sans irradiation. En effet, le signal de fluorescence perçu à 0 kGy reflète la présence

initiale de traces de bityrosine ou d'autres composés avoisinants. Ces traces peuvent s'expliquer par la disposition de multiples groupements fonctionnels à proximité les uns des autres.

Les résultats montrent une augmentation du taux de formation de bityrosine quand on accroît la dose d'irradiation sans égard de l'agent plastifiant ni de la concentration de Calcium.

En absence de Calcium (tableau 2, figure 4) on observe une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux de formation de bityrosine avec l'augmentation de la dose d'irradiation. La dose optimale de 64 kGy est obtenue pour 0 et 2,5% PG, le taux de formation de bityrosine passe de 346,506 à 1,686,127 pour le 0% PG et de 476,002 à 2,225,031 pour le 2,5% PG.

En présence de 5% PG et 2,5% TEG, une dose optimale est atteinte à 128 kGy. Les valeurs passent de 387,385 à 3,248,512 en présence de 5% PG et de 401,328 à 3,402,462 en présence de 2,5% TEG. Avec le 5% TEG, une dose optimale est atteinte à 96 kGy, les valeurs passent de 308,993 à 3,093,653.

À une concentration de 2,5% PG, l'ajout d'un agent plastifiant augmente significativement ($p \leq 0,05$) le taux de formation de bityrosine et ce, à partir d'une dose de 16 kGy et jusqu'à la dose de 96 kGy. À une concentration de 2,5% TEG,

le même phénomène est observé jusqu'à la dose de 64 kGy. À 8 kGy aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été perçue avec l'ajout de l'agent plastifiant.

En comparant les agents plastifiants entre eux, à même concentration (2,5%), on ne note aucune différence significative ($p > 0,05$) du taux de formation de bityrosine, quelle que soit la dose d'irradiation. À une concentration de 5%, ce n'est qu'à la dose de 16 kGy qu'une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux de formation de bityrosine a été enregistrée avec le PG.

En présence de 2,5% TEG, le taux de formation de bityrosine montre une faible augmentation particulièrement significative ($p \leq 0,05$) dans le cas de 16kGy. Une augmentation du TEG de 2,5% à 5% a un effet significatif ($p \leq 0,05$) sur la formation du taux de bityrosine seulement pour la dose 16 kGy. Par contre, l'augmentation du PG de 2,5% à 5% n'a pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur le taux de formation de bityrosine, quelle que soit la dose d'irradiation. Une dose optimale est atteinte à 64 kGy pour 0% et 2,5% PG. Une dose optimale de 96 kGy est obtenue pour 5% TEG. À 5% PG et 2,5% TEG, une dose de 128 kGy n'est toujours pas optimale.

Tableau 2: Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 et 5)% et en absence de Calcium.

Dose (kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
8	346 506 ±144 425 ^{a(1)}	476 002 ±29 433 ^{a(1)}	387 385 ±18 476 ^{a(1)}	401 328 ±8 184 ^{a(1)}	308 993 ±28 925 ^{a(1)}
16	585 603 ±63 267 ^{b(1)}	916 845 ±98 938 ^{b(2)}	811 410 ±47 854 ^{b(2)}	889 730 ±47 758 ^{b(2)}	602 072 ±25 768 ^{b(1)}
32	939 083 ±83 677 ^{c(1)}	1 368 604 ±186 960 ^{c(2)}	1 427 327 ±229 188 ^{c(2)}	1 333 398 ±88 014 ^{c(2)}	1 290 842 ±305 705 ^{c(2)}
64	1 686 127 ±115 779 ^{d(1)}	2 225 031 ±177 397 ^{d(2,3)}	2 100 849 ±116 979 ^{d(2)}	2 398 178 ±61 096 ^{d(3)}	2 250 260 ±85 128 ^{d(2,3)}
96	2 090 995 ±385 928 ^{d(1)}	2 587 276 ±22 8987 ^{d e(2)}	2 521 854 ±81 064 ^{e(1,2)}	2 515 199 ±203 618 ^{d(1,2)}	3 093 653 ±33 8249 ^{e(2)}
128	2 438 629 ±454 722 ^{d(1)}	2 884 913 ±62 542 ^{e(1,2)}	3 248 512 ±21 3426 ^{f(2)}	3 402 462 ±249 498 ^{e(2)}	3 612 882 ±642 708 ^{e(2)}

Il n'y a pas d'unité, car ces taux sont mesurés par l'aire sous la courbe obtenue. Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

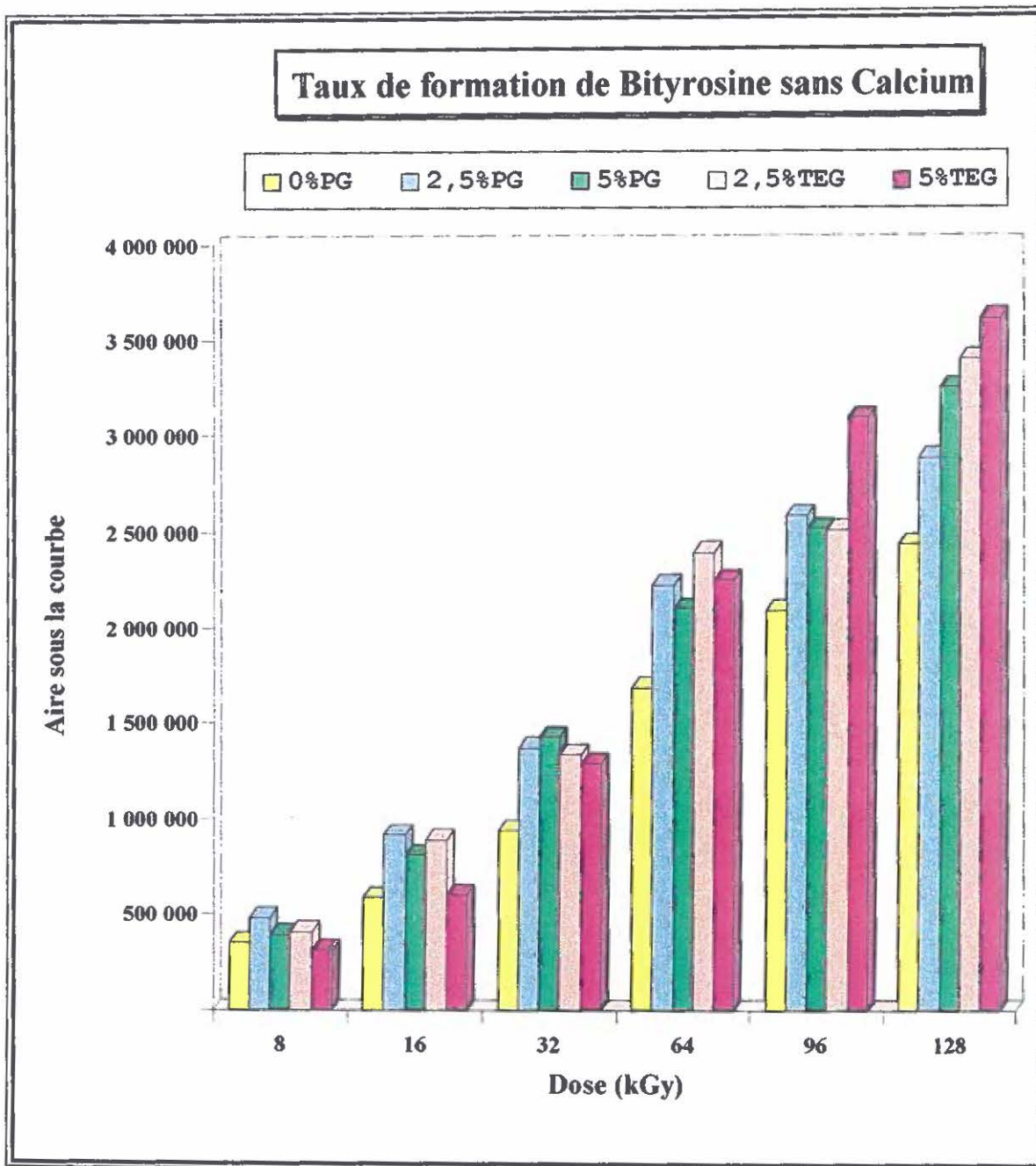


Figure 4: Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 ; 5)% et en absence de Calcium.

À la concentration de 0,125% de Calcium (tableau 3, figure 5), on observe une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux de formation de bityrosine avec l'augmentation de la dose d'irradiation pour atteindre un maximum à 64 kGy pour (0 et 5)% PG. Les valeurs y passent de 337,172 à 1,815,416 dans le cas de 0% PG et de 464,986 à 2,082,185 dans le cas de 5% PG.

À 5% TEG, le maximum est enregistré à la dose de 96 kGy. Les valeurs y passent de 336,848 à 3,064,245. À 2,5% (PG ou TEG), une dose de 128 kGy n'est toujours pas optimale. Les valeurs y passent de 538,399 à 3,228,265 en présence de 2,5% PG et de 373,511 à 3,285,437 dans le cas du TEG.

Quelque soit l'agent plastifiant utilisé, il favorise significativement ($p \leq 0,05$) la formation de bityrosine pour les doses 16 et 32 kGy. Au delà de ces doses, aucune augmentation significative ($p > 0,05$) n'a été observée. Une différence significative ($p \leq 0,05$) a toutefois été observée entre 0% PG/TEG et 5% TEG pour les doses de 96 et 128 kGy. En outre, l'augmentation de la concentration en agent plastifiant n'augmente pas significativement ($p > 0,05$) le taux de formation de bityrosine. En comparant les deux agents plastifiants entre eux, on ne note aucune différence significative ($p > 0,05$) pour le taux de formation de bityrosine.

Tableau 3: Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,125% de Calcium.

Dose (kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
8	337 172 ±245 855 ^{a(1)}	538 399 ±58 386 ^{a(1)}	464 986 ±139 200 ^{a(1)}	373 511 ±24 598 ^{a(1)}	336 848 ±93 542 ^{a(1)}
16	534 541 ±100 203 ^{b(1)}	1091453 ±10 466 ^{b(3)}	720 153 ±100 093 ^{b(2)}	787 406 ±21 435 ^{b(2)}	679 974 ±21 497 ^{b(2)}
32	849 954 ±103 726 ^{b(1)}	1 404 460 ±185 793 ^{c(2)}	1 298 538 ±384 547 ^{c(2)}	1302636 ±185 793 ^{c(2)}	1 274 417 ±50 453 ^{c(2)}
64	1 815 416 ±139 643 ^{c(1)}	2 267 634 ±128 218 ^{d(1)}	2 082 185 ±564 687 ^{d(1)}	2 276 052 ±25 4447 ^{d(1)}	2 220 082 ±226 361 ^{d(1)}
96	2 031 578 ±444 494 ^{c(1)}	2 340 411 ±207 457 ^{d(1,2)}	2 568 273 ±534 353 ^{d(1,2)}	2 444 797 ±68 876 ^{d(1,2)}	3 064 245 ±258 593 ^{e(2)}
128	2 652 576 ±333 116 ^{c(1)}	3 228 265 ±222 359 ^{e(1,2)}	3 073 108 ±614 990 ^{d(1,2)}	3 285 437 ±57 253 ^{e(1,2)}	3 612 564 ±349 750 ^{e(2)}

Il n'y a pas d'unité, car ces taux sont mesurés par l'aire sous la courbe obtenue. Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

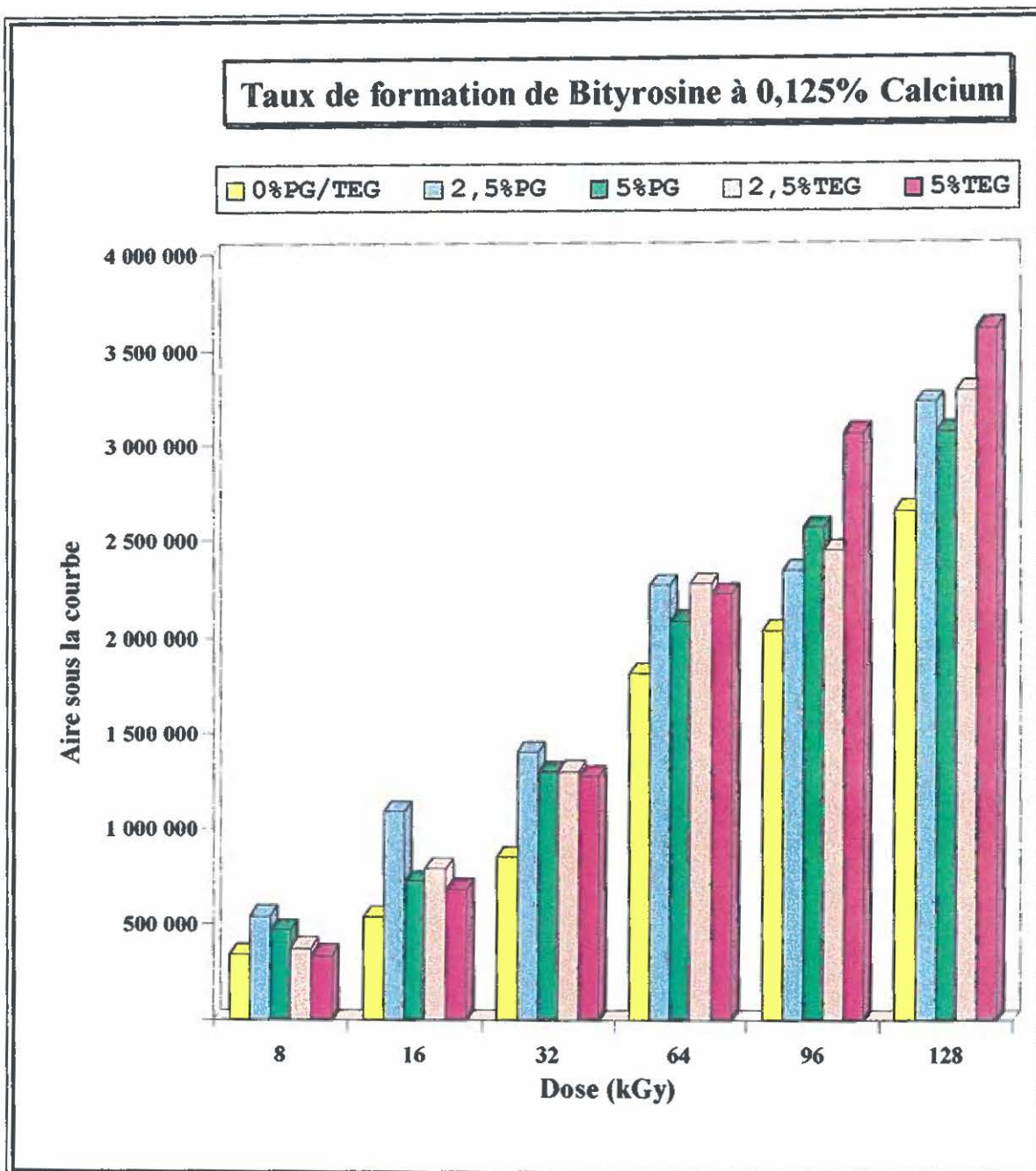


Figure 5: Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : PropylèneGlycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 ; 5)% en présence de 0,125% de Calcium

À la concentration de 0,250% de Calcium (tableau 4, figure 6) : le maximum du taux de formation de bityrosine est atteint à la dose de 96 kGy pour (0 et 5)% PG et 5% TEG. Les valeurs y passent de 441,344 à 2,232,210 dans le cas de 0% PG/TEG et de 491,959 à 2,480,578 dans le cas de 5% PG et de 385,842 à 3,234,535 dans le cas de 5% TEG. La dose optimale atteinte pour 2,5% (PG ou TEG) est de 128 kGy; les valeurs y passent de 543,293 à 3,037,233 en présence de 2,5% PG et de 386,826 à 3,393,418 en présence de 2,5% TEG.

Avec l'ajout d'un agent plastifiant à 2,5% PG et 5% PG, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux de formation de bityrosine à partir de la dose 16 kGy et ce jusqu'à la dose 64 kGy. Une seconde augmentation significative ($p \leq 0,05$) est observée à 128 kGy.

Avec l'ajout de 2,5% TEG, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du taux de formation de bityrosine à partir de la dose 32 kGy. Pour le 5% TEG, cette augmentation significative ($p \leq 0,05$) n'est notée qu'à partir de la dose de 64 kGy. En observant les deux agents plastifiants (PG et TEG) à une même concentration (soit 2,5%, soit 5%), on constate que le 2,5% PG favorise significativement ($p \leq 0,05$) la formation de bityrosine à la dose d'irradiation de 16 kGy et que le 5% TEG la favorise à la dose de 96 kGy.

Tableau 4: Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% de Calcium.

Dose (kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
8	441 344 ±154 424 ^{a(1)}	543 293 ±84 918 ^{a(1)}	491 959 ±120 660 ^{a(1)}	386 826 ±12 973 ^{a(1)}	385 842 ±51 742 ^{a(1)}
16	532 630 ±82 409 ^{a(1)}	1 068 565 ±120 341 ^{b(2)}	770 249 ±261 068 ^{b(1)}	678 929 ±88 072 ^{b(1)}	585 237 ±26 004 ^{b(1)}
32	937 124 ±101 569 ^{b(1)}	1 495 782 ±107 508 ^{c(2)}	1 297 279 ±215 021 ^{c(2)}	146 1657 ±181 156 ^{c(2)}	1 194 008 ±233 207 ^{c(1,2)}
64	1 724 716 ±290 525 ^{c(1)}	2 340 862 ±143 062 ^{d(2)}	1 965 528 ±316 213 ^{d(1,2)}	2 397 038 ±74 503 ^{d(2)}	2 255 206 ±271 335 ^{d(2)}
96	2 232 210 ±255 316 ^{cd(1)}	2 539 710 ±22 1317 ^{d(1,2)}	2 480 578 ±312 913 ^{de(1,2)}	2 765 675 ±79 007 ^{d(2,3)}	3 234 535 ±172 349 ^{e(3)}
128	2 470 941 ±330 378 ^{d(1)}	3 037 233 ±92 225 ^{e(1,2)}	3 164 229 ±659 749 ^{e(2)}	3 393 418 ±22 1897 ^{e(2)}	3 803 913 ±239 412 ^{e(2)}

Il n'y a pas d'unité, car ces taux sont mesurés par l'aire sous la courbe obtenue. Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

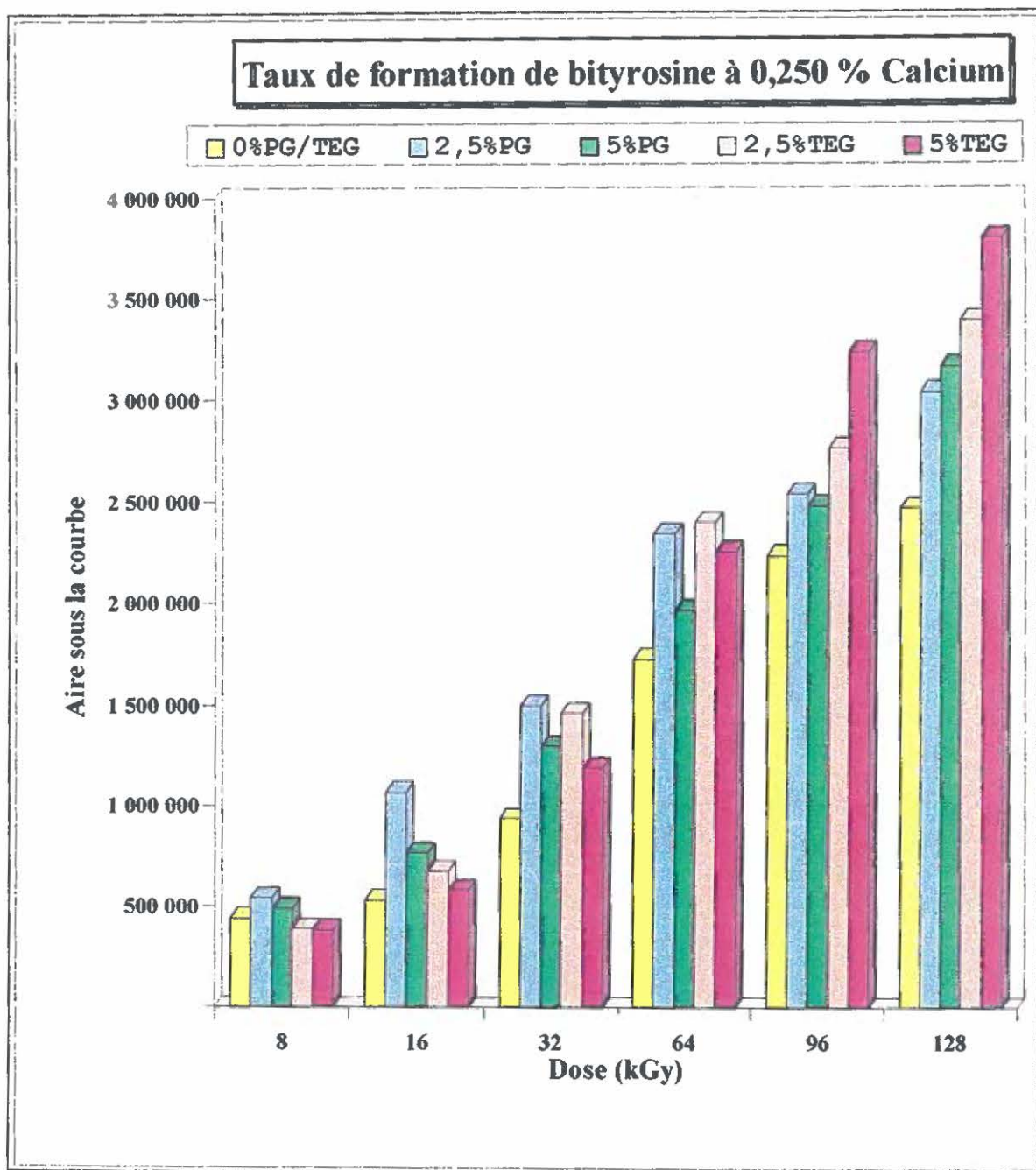


Figure 6.: Taux de formation de bityrosine en fonction de la dose d'irradiation appliquée, selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentrations (0 ; 2,5 ; 5)% et en présence de 0,250% de Calcium.

1.2.-Force de rupture des gels

Les résultats de la force de rupture des gels sont exposés dans les tableaux (5, 6 et 7). Ils sont rapportés en grammes (g). La présence du Calcium et l'exposition des solutions à l'irradiation sont des paramètres étudiés permettant l'obtention de gels.

En présence de 0,125% de Calcium (tableau 5, figure 7), les premiers gels se forment à partir de la dose d'irradiation de 16 kGy en présence de PG et seulement à partir de la dose 32 kGy avec le TEG, quelle que soit la concentration de ce dernier.

En absence d'agent plastifiant, la force de rupture des gels augmente significativement ($p \leq 0,05$) avec la dose d'irradiation pour atteindre un maximum à la dose de 32 kGy avec une valeur de 18,16, représentant une augmentation de 42%.

Dans le cas du 2,5% PG, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des gels avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Le maximum est atteint à 32 kGy avec une de 19,25, soit une augmentation de 43% par rapport à la dose de base de 16 kGy.

Cependant, à la concentration de 5% PG, le maximum est atteint à la dose de 96 kGy atteignant une valeur de 16,66 représentant une augmentation de 61% de la force de rupture des gels comparativement à 16 kGy.

En comparant les deux concentrations de PG, c'est dans le cas du 2,5% qu'on obtient la meilleure force de rupture des gels pour les différentes doses d'irradiation. Ces résultats sont de surcroît significatifs ($p \leq 0,05$) à l'exception de la dose 96 kGy où la dite augmentation observée est non significative ($p > 0,05$).

En présence de TEG (2,5 et 5)%, on n'a décelé aucune différence significative ($p > 0,05$) de la force de rupture des gels, quelle que soit la dose d'irradiation appliquée. En doublant la concentration de TEG (de 2,5 à 5%), on note une diminution de la force de rupture des gels. L'optimum est atteint à 2,5% TEG à la dose de 64 kGy avec la valeur de 16,41.

Tableau 5: Force de rupture des gels (g) en fonction de la dose d'irradiation administrée et en présence d'agents plastifiants :Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% et en présence de 0,125 % de Calcium.

Dose(kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
16	12,75 ±0,1 ^{a(2)}	13,5 ±0,1 ^{a(3)}	10,33 ±0,38 ^{a(1)}	- -	- -
32	18,16 ±0,52 ^{c(2)}	19,25 ±0,43 ^{c(2)}	14 ±1,95 ^{bc(1)}	14,33 ±1,01 ^{a(1)}	12,83 ±1,66 ^{ab(1)}
64	18,66 ±0,28 ^{c(2)}	20,16 ±0,57 ^{c(2)}	16,25 ±1,29 ^{bc(1)}	16,41 ±1,52 ^{a(1)}	15,75 ±1,52 ^{b(1)}
96	16,83 ±0,76 ^{b(2,3)}	18,91 ±1,90 ^{bc(3)}	16,66 ±0,94 ^{d(2,3)}	15,33 ±2,50 ^{a(1,2)}	12,75 ±2,04 ^{ab(1)}
128	16,33 ±1,18 ^{b(2,3)}	17,25 ±1,14 ^{b(3)}	13,66 ±1,25 ^{b(1,2)}	14 ±1,88 ^{a(1,2,3)}	10,91 ±2,96 ^{a(1)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

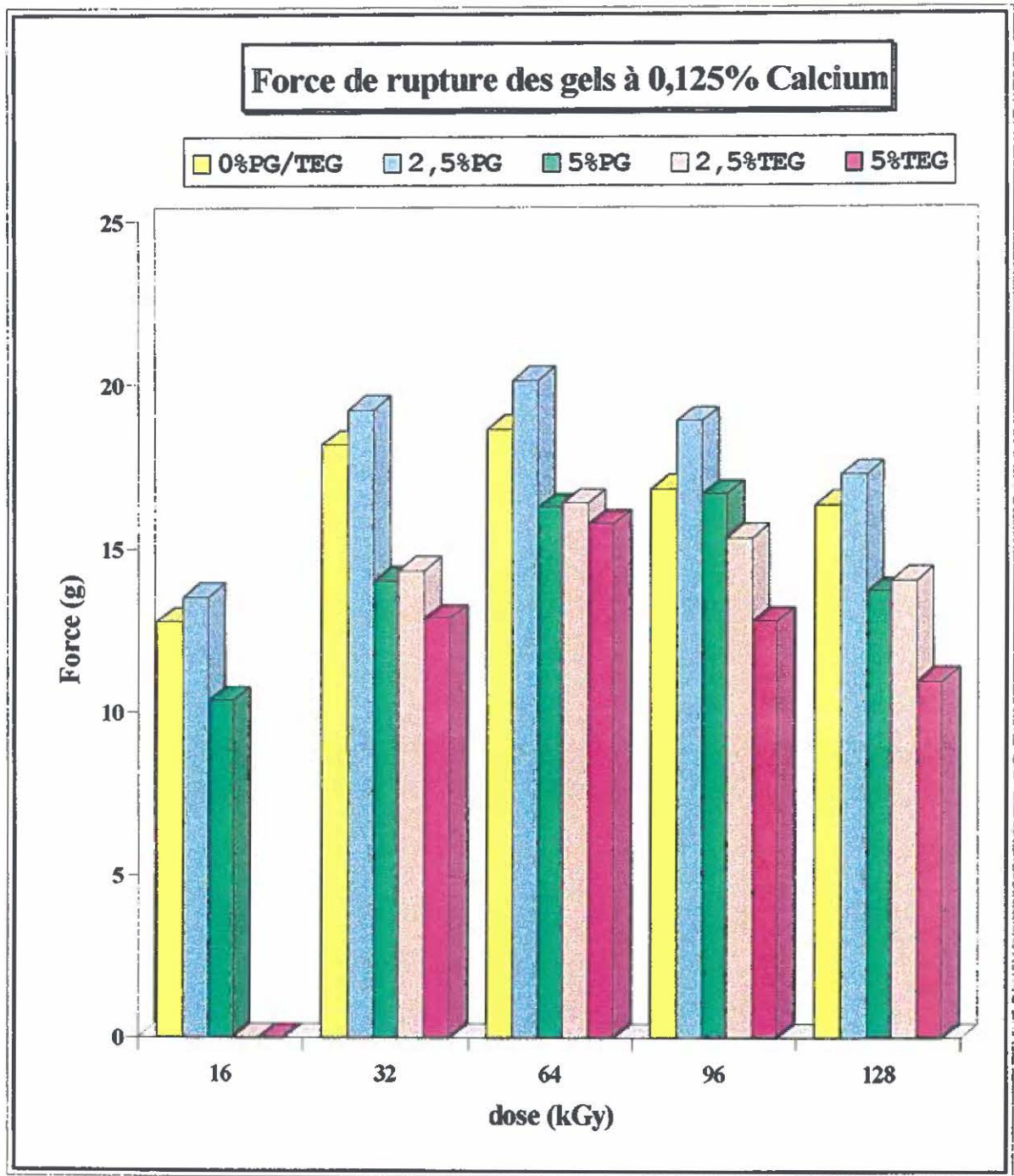


Figure 7: Force de rupture des gels en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à différentes concentration (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,125% de Calcium.

En présence de 0,250% de Calcium (tableau 6, figure 8), on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des gels avec l'augmentation de la dose d'irradiation, quelle que soit la concentration d'agents plastifiants.

En absence d'agent plastifiant, un maximum de 24,16 est atteint à la dose d'irradiation de 64 kGy, soit une augmentation de 38% par rapport à la dose de base de 16 kGy.

À 2,5% et 5% PG, les maximums sont respectivement atteints à 96 et 32kGy, avec des valeurs de 22,91 et 18,33, ce qui correspond à une augmentation de 80% et 32% respectivement par rapport à la dose de base de 16kGy.

À 2,5% TEG il n'y a aucune différence significative ($p > 0,05$) de la force de rupture des gels avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Les valeurs varient de 16,91 à 15,33 entre 0 et 128 kGy, avec un maximum de 19,16 observé à 64 kGy.

En présence de 5% TEG, il y a une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la dite force pour atteindre un maximum de 17,91 à 64 kGy, soit une augmentation de 26,5% par rapport à la base de 16 kGy.

En ajoutant l'agent plastifiant (PG ou TEG), la force de rupture des gels diminue significativement ($p \leq 0,05$), quelle que soit la dose d'irradiation. Toutefois, en présence de 2,5% PG, la force de rupture des gels augmente significativement ($p \leq 0,05$) pour les doses de 96 et 128 kGy lorsque ces valeurs sont comparées à 0%. Ces valeurs passent de 20,75 à 22,91 et 20,33 aux doses de 64, 96 et 128 kGy. En outre, en doublant la concentration de TEG de (2,5 à 5)%, la force de rupture des gels diminue significativement ($p \leq 0,05$) pour les doses 32, 96 et 128 kGy soient des valeurs de 14,5 ; 15,66 et 11,91.

Tableau 6: Force de rupture des gels en fonction de la dose d'irradiation administrée et en présence d'agents plastifiants : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% de Calcium.

Dose (kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
16	17,5 ±0,25 ^{a(3)}	12,75 ±0,25 ^{a(1)}	13,16 ±3,17 ^{a(1,2)}	16,91 ±2,96 ^{a b(2,3)}	14,16 ±1,18 ^{a b(1,2,3)}
32	21,33 ±0,38 ^{b(3)}	18,5 ±1,73 ^{b(2)}	17,33 ±1,15 ^{b(2)}	18,33 ±1,50 ^{a b(2)}	14,5 ±0,10 ^{a b(1)}
64	24,16 ±1,01 ^{c(2)}	20,75 ±1,08 ^{c(1)}	17,25 ±0,43 ^{b(1)}	19,16 ±2,37 ^{b(1)}	17,91 ±2,89 ^{c(1)}
96	20,75 ±0,43 ^{b(3)}	22,91 ±1,15 ^{d(4)}	16,33 ±0,14 ^{b(1)}	18,25 ±0,43 ^{a b(2)}	15,66 ±0,76 ^{b c(1)}
128	17,91 ±0,52 ^{a(3)}	20,33 ±0,52 ^{b(4)}	15,33 ±0,72 ^{a b(2)}	15,33 ±1,28 ^{a(2)}	11,91 ±1,42 ^{a(1)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

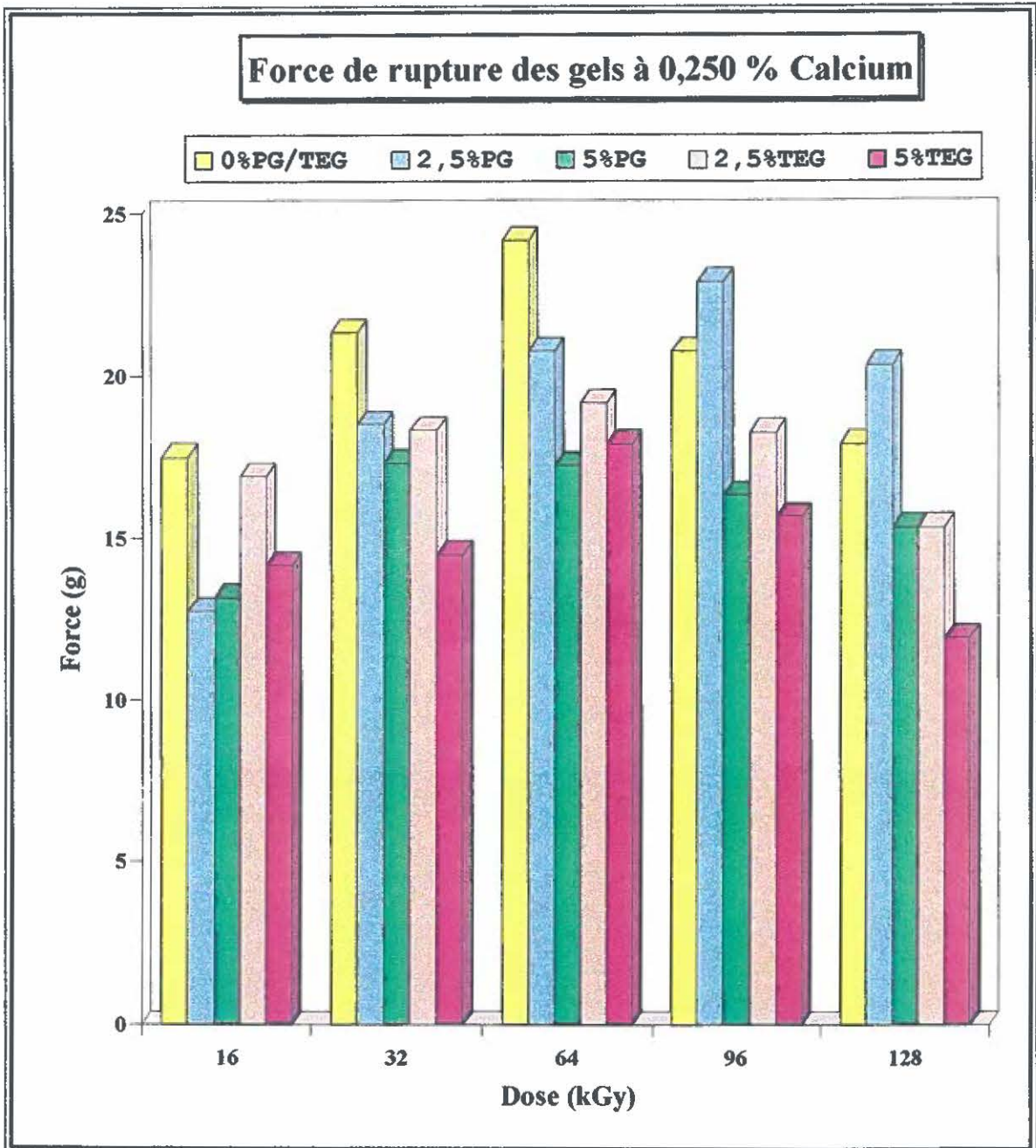


Figure 8 : Force de rupture des gels en fonction de la dose d'irradiation administrée et en présence d'agents plastifiants : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG)) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% de Calcium

1.3- Force de rupture des films

Elle est déterminée par le rapport de la valeur lue de la force de rupture sur une valeur moyenne de 6 mesures d'épaisseur du film afin d'éviter d'éventuelles variations dues à la lecture de l'épaisseur. Ce rapport est représenté par le symbole F/E et exprimé en $N/\mu m$.

En l'absence de Calcium (tableau 7, figure 9), on note une augmentation de la force de rupture des films avec une augmentation de la dose d'irradiation.

Aux concentrations (0 et 5)% PG, les maximums qui sont atteints à 16 kGy, sont respectivement de 16,22 et 8,86, soit des augmentations de 13% et 23% par rapport aux valeurs des films non irradiés. À la concentration de 2,5% PG, ce maximum est également atteint à la dose 16 kGy qui est de 13,71, soit une augmentation de 12% par rapport au film non irradié.

En présence de TEG (2,5 et 5)%, les maximums de la force de rupture des films sont obtenus à 16 kGy, représentant une augmentation de 28% et 33% respectivement. Les valeurs obtenues pour ces échantillons sont de 6,83 et 3,68.

Pour toutes les doses d'irradiation, on note une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des films avec l'ajout de l'agent plastifiant, à l'exception du cas de 2,5% PG pour les doses 96 et 128 kGy.

En doublant la concentration d'agent plastifiant, la force de rupture des films diminue significativement ($p \leq 0,05$). Toutefois en comparant les deux agents plastifiants, c'est le PG qui donne de meilleures forces de rupture de films.

Tableau 7 : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en absence de Calcium.

Dose (kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	14,33 ±0,62 ^{c(5)}	12,26 ±0,41 ^{abc(4)}	7,21 ±0,41 ^{a(3)}	5,35 ±0,16 ^{a(2)}	2,77 ±0,17 ^{b(1)}
8	15,52 ±0,47 ^{c(5)}	13,12 ±0,98 ^{bc(4)}	8,23 ±0,74 ^{ab(3)}	6,15 ±0,79 ^{ab(2)}	3,34 ±0,05 ^{c(1)}
16	16,22 ±0,92 ^{d(4)}	13,71 ±1,92 ^{bc(3)}	8,86 ±1,048 ^{b(2)}	6,83 ±0,81 ^{bc(2)}	3,68 ±0,56 ^{cd(1)}
32	16,53 ±1,07 ^{d(5)}	14,11 ±1,22 ^{c(4)}	9,35 ±1,90 ^{b(3)}	7,17 ±0,27 ^{c(2)}	4,13 ±0,24 ^{d(1)}
64	15,43 ±0,22 ^{cd(5)}	14,16 ±0,19 ^{c(4)}	8,85 ±0,77 ^{ab(3)}	7,32 ±0,14 ^{c(2)}	3,36 ±0,09 ^{c(1)}
96	9,54 ±0,35 ^{b(4)}	11,98 ±0,17 ^{ab(5)}	8,36 ±0,51 ^{ab(3)}	6,94 ±0,43 ^{bc(2)}	2,57 ±0,14 ^{ab(1)}
128	7,63 ±1,16 ^{a(3)}	10,43 ±1,29 ^{a(4)}	7,22 ±0,53 ^{a(2,3)}	5,94 ±0,13 ^{a(2)}	2,10 ±0,32 ^{a(1)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

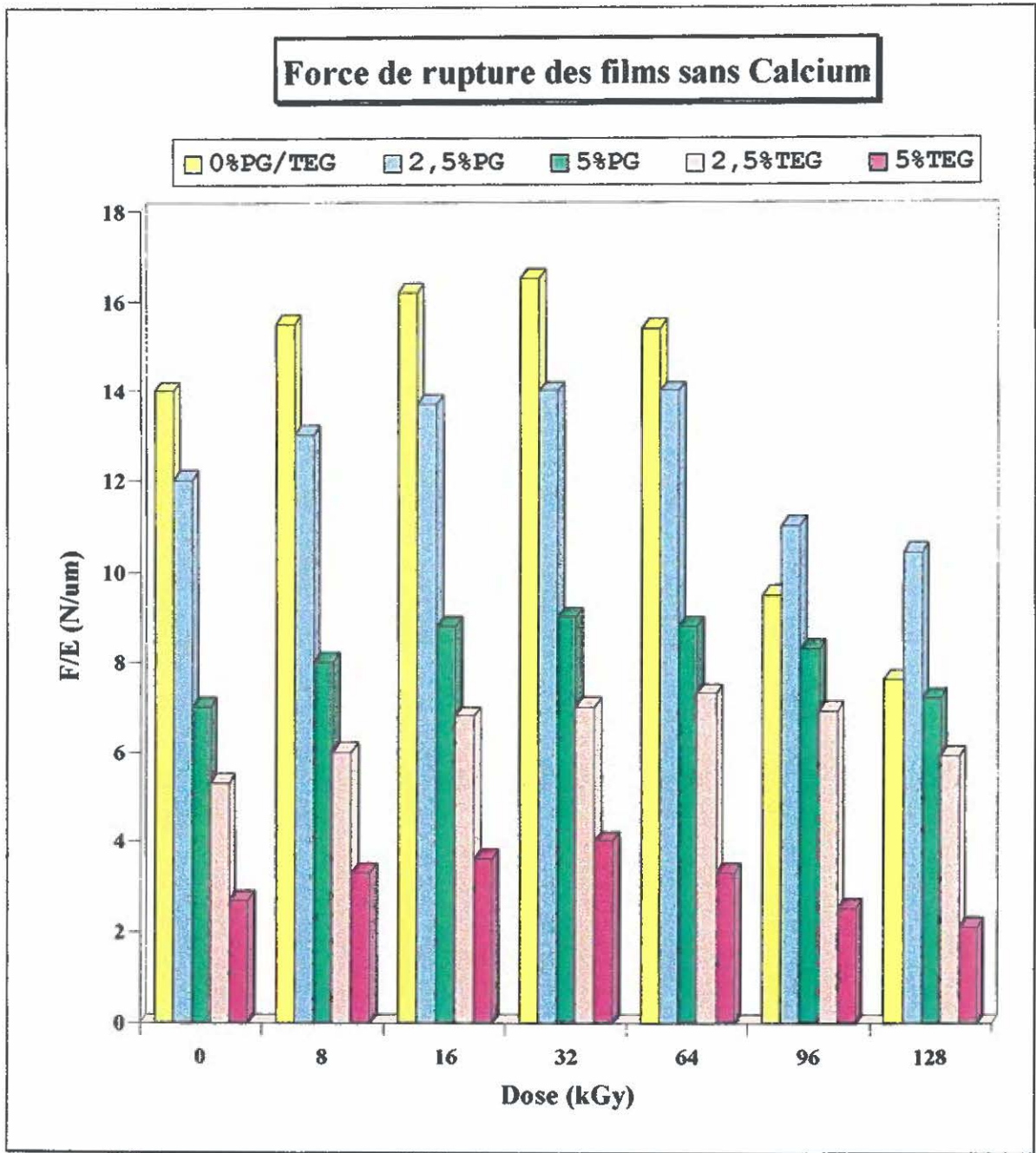


Figure 9 : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG)) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% et en absence de Calcium.

À la concentration de 0,125% Calcium, (tableau 8, figure 10) : Sans agent plastifiant, l'irradiation n'augmente pas significativement ($p > 0,05$) la force de rupture des films. Les valeurs passent de 15,15 (à 0 kGy) à 17,69 (N/ μm), soit une augmentation de 17%. Cependant, en présence de calcium, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des films avec l'augmentation de la dose d'irradiation.

Dans le cas de 2,5% PG, la force de rupture optimale des films est atteinte à la dose de 8 kGy. Elle passe de 7,84 à 11,49 entre 0 kGy et 8 kGy, soit une augmentation de 47%. La dose de 8 kGy est également optimale pour 5% PG. À 2,5% et 5% TEG la dose optimale est atteinte à 16 kGy. Ces valeurs représentent une augmentation respective de 27%, 40% et 53% avec des valeurs obtenus de 8,46 ; 7,20 et 4,55. En doublant la concentration de PG de 2,5% à 5%, on observe une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des films, quelle que soit la dose d'irradiation à l'exception des valeurs extrêmes de 0 et 128 kGy.

Par contre, en présence de 5% TEG on observe une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des films quelle que soit la dose d'irradiation. Toutefois, la force de rupture est significativement ($p \leq 0,05$) plus élevée avec PG qu'avec TEG.

Tableau 8 : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant (Propylène Glycol(PG) ou Triéthylène Glycol(TEG) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% en présence de 0,125% Calcium.

Dose (kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	15,15 ±1,68 ^{bc(4)}	7,84 ±0,14 ^{a(3)}	6,65 ±0,41 ^{a(3)}	5,14 ±0,12 ^{a(2)}	2,98 ±0,09 ^{ab(1)}
8	16,60 ±0,51 ^{bc(4)}	11,49 ±2,12 ^{b(3)}	7,82 ±0,35 ^{bc(2)}	6,29 ±0,77 ^{b(2)}	3,77 ±0,22 ^{c(1)}
16	17,03 ±0,70 ^{bc(4)}	12,07 ±1,65 ^{b(3)}	8,46 ±0,26 ^{c(2)}	7,20 ±0,43 ^{c(2)}	4,55 ±0,44 ^{d(1)}
32	17,69 ±0,87 ^{c(4)}	12,61 ±1,22 ^{b(3)}	8,76 ±0,43 ^{c(2)}	7,56 ±0,15 ^{c(2)}	4,92 ±0,15 ^{d(1)}
64	16,61 ±0,37 ^{bc(4)}	12,78 ±0,96 ^{b(3)}	8,10 ±0,55 ^{c(2)}	7,88 ±0,34 ^{c(2)}	3,30 ±0,27 ^{b(1)}
96	14,30 ±1,35 ^{b(4)}	11,48 ±0,31 ^{b(3)}	6,90 ±0,62 ^{ab(2)}	7,13 ±0,60 ^{c(2)}	2,91 ± ^{c(1)}
128	11,35 ±3,29 ^{a(3)}	8,42 ±0,20 ^{a(2)}	6,08 ±1,10 ^{a(2)}	6,15 ±0,54 ^{b(2)}	2,65 ±0,06 ^{a(1)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

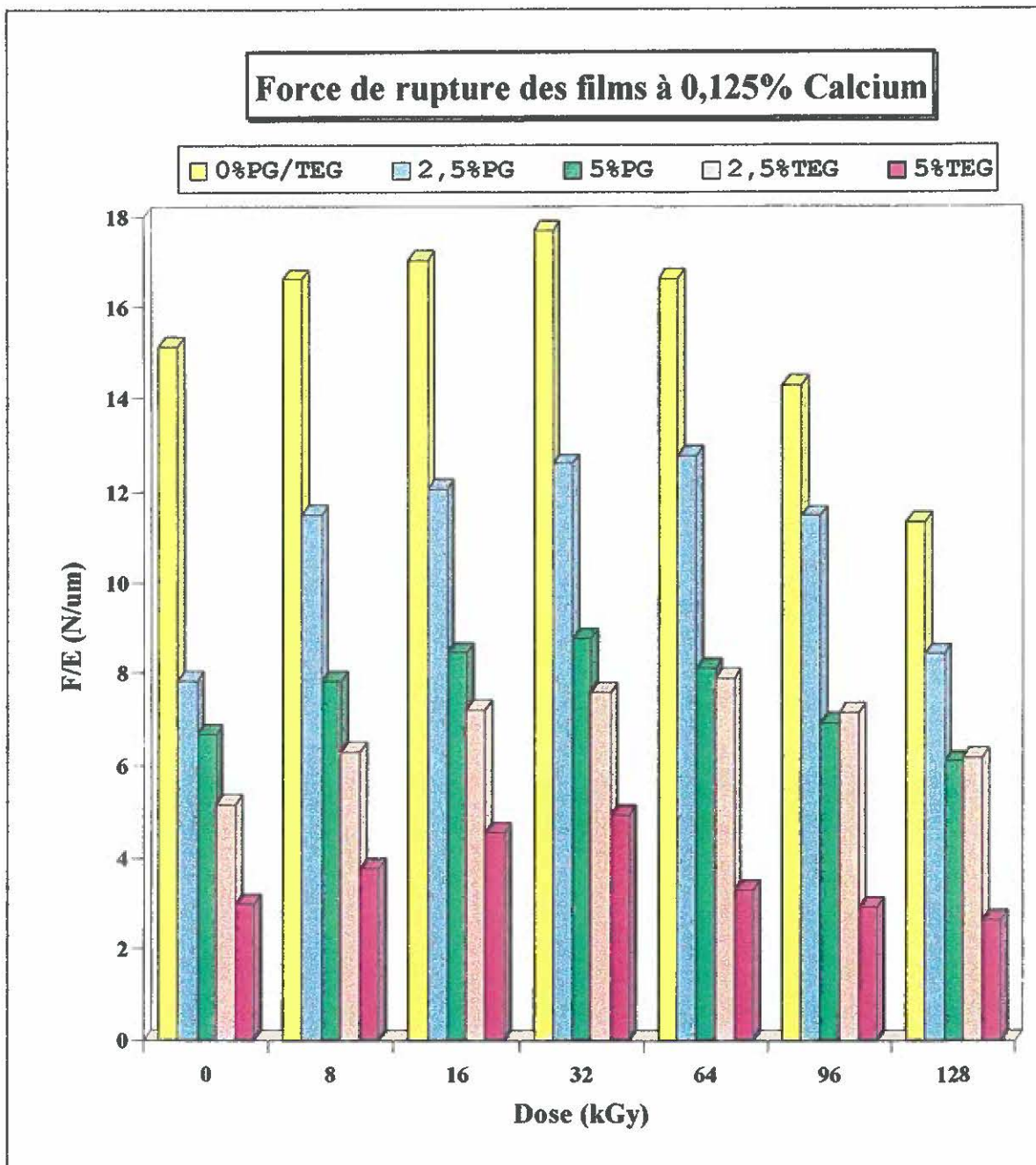


Figure 10 : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0, 2,5 et 5)% en présence de 0,125% de Calcium.

À la concentration de 0,250% Calcium, (tableau 9, figure 11), on observe une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des films avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Une dose optimale est atteinte à 16 kGy pour 2,5% PG et 5% PG. Une dose optimale est atteinte à 32 kGy pour 2,5% TEG et 5% TEG. La force de rupture optimale des films et le pourcentage de l'augmentation par rapport à un film non irradié sont représentés comme suit : 12,33 (10%) à 2,5% PG, 7,95 (40%) à 5% PG, 6,86 (36%) à 2,5% TEG et 4,66 (65%) à 5% TEG.

L'ajout d'agents plastifiants diminue significativement ($p \leq 0,05$) la force de rupture des films quelle que soit la dose d'irradiation, à l'exception du 2,5% PG pour les doses de 0, 96 et 128 kGy où aucune différence significative n'a été observée ($p > 0,05$).

En comparant les agents plastifiants aux mêmes concentrations, on note que le PG donne des forces de rupture de films significativement ($p \leq 0,05$) plus élevées que celles du TEG.

Tableau 9: Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.

Dose(kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	12,04 ±0,38 ^{b(4)}	9,87 ±0,41 ^{a b(4)}	5,69 ±0,68 ^{a(2)}	5,02 ±0,35 ^{a(2)}	2,82 ±0,17 ^{b(1)}
8	13,33 ±0,24 ^{b c(4)}	11,54 ±0,90 ^{a b c(3)}	6,99 ±0,90 ^{b c d(2)}	5,89 ±0,34 ^{b c(2)}	3,68 ±0,09 ^{c(1)}
16	14,02 ±1,36 ^{c d(5)}	12,33 ±0,35 ^{b c(4)}	7,95 ±0,42 ^{c d(3)}	6,46 ±0,53 ^{c d(2)}	4,06 ±0,11 ^{c(1)}
32	14,96 ±0,92 ^{d(4)}	12,75 ±1,75 ^{c(3)}	8,19 ±0,60 ^{d(2)}	6,86 ±0,19 ^{d e(2)}	4,66 ±0,04 ^{d(1)}
64	15,05 ±1,04 ^{d(4)}	12,97 ±1,73 ^{c(3)}	7,68 ±0,46 ^{c d(2)}	7,10 ±0,30 ^{e(2)}	3,11 ±0,57 ^{b(1)}
96	13,12 ±0,70 ^{b c(3)}	11,67 ±2,32 ^{a b c(3)}	6,84 ±0,83 ^{a b c(2)}	6,65 ±0,28 ^{d e(2)}	2,26 ±0,45 ^{a(1)}
128	8,99 ±0,75 ^{a(4)}	9,54 ±0,26 ^{a(4)}	6,15 ±0,26 ^{a b(3)}	5,39 ±0,11 ^{a b(2)}	2,05 ±0,12 ^{a(1)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

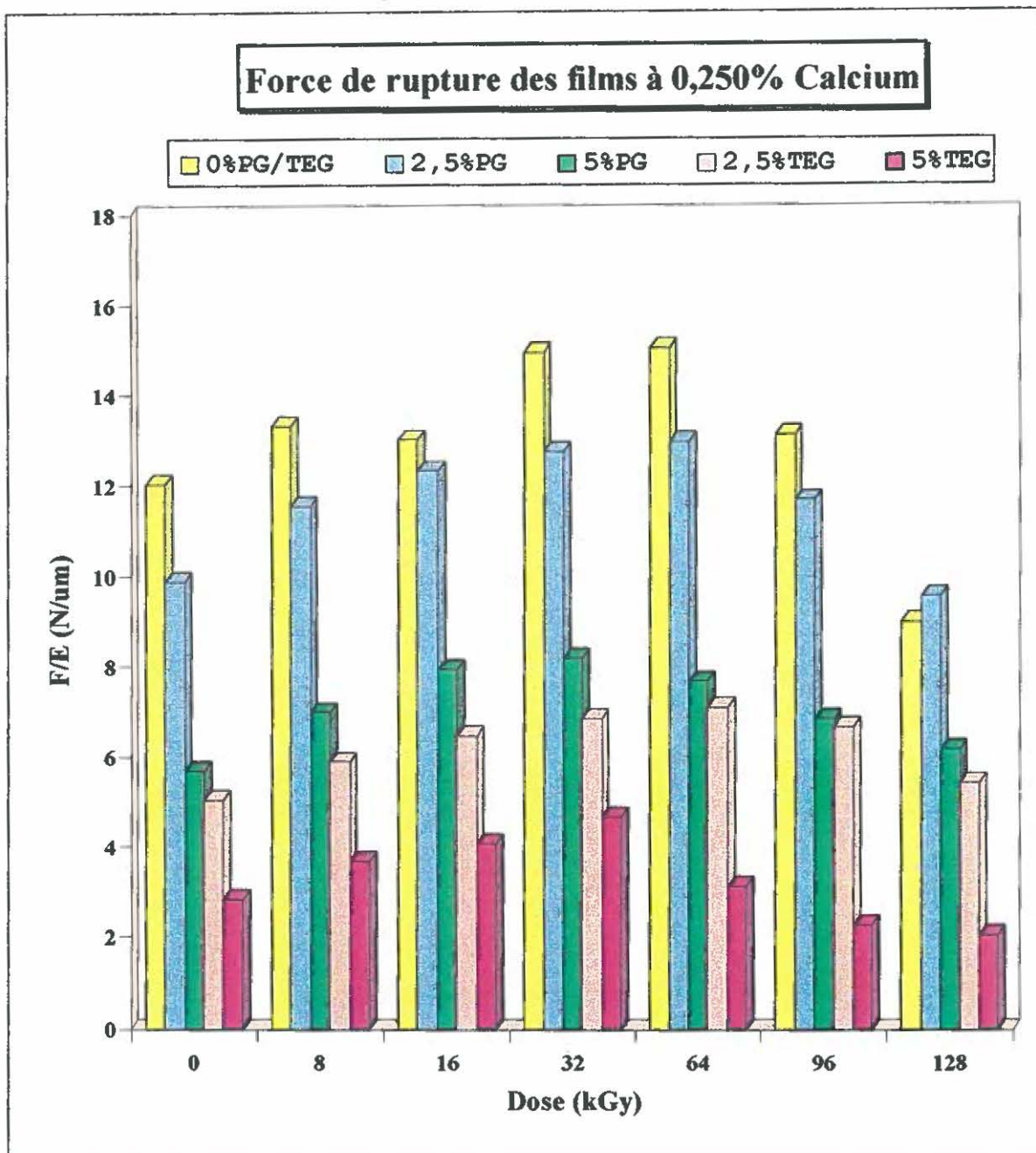


Figure 11 : Force de rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.

1.4- Déformation à la rupture des films

La déformation à la rupture des films est exprimée en millimètre. Les valeurs relevées sur les courbes imprimées sont multipliées par un coefficient de correction pour tenir compte des différentes vitesses (celle de déroulement du papier de l'imprimante et celle de descente du poinçon). Les résultats sont exposés aux tableaux (10, 11 et 12) et aux figures (12, 13 et 14).

En absence de calcium (tableau 10, figure 12), on note une diminution de la déformation à la rupture avec la dose d'irradiation. Le pouvoir déformant le plus faible est obtenu à la dose d'irradiation la plus élevée.

En absence d'agent plastifiant, la déformation varie entre 2,8mm et 1,68mm ce qui représente une diminution du pouvoir déformant de 40% avec l'irradiation à 128 kGy.

Avec l'ajout de 2,5% PG, la dite déformation diminue avec la dose d'irradiation de 4,54mm (0 kGy) à 2,44mm (128 kGy) représentant un affaiblissement du pouvoir déformant de 46%. Avec le 5% PG, on note également une diminution de la déformation à la rupture. Sa valeur varie de 6,04mm à 4,20mm, soit un affaiblissement du pouvoir déformant de 30,5%.

En présence de TEG, la déformation à la rupture des films diminue avec la dose d'irradiation. Les valeurs varient de 7,82mm à 5,88mm en présence de 2,5%TEG et de 10,34mm à 8,96mm avec 5% TEG, soit une perte du pouvoir déformant de 25% et de 13% respectivement.

Avec l'ajout d'agents plastifiants, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la déformation à la rupture pour toutes les doses d'irradiation. Il est à relever que le pouvoir déformant est plus élevé avec l'ajout de TEG qu'avec celui de PG.

Tableau 10: Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.

Dose (kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	2,80 ±0,06 ^{d(1)}	4,54 ±0,28 ^{e(2)}	6,04 ±0,09 ^{c(3)}	7,82 ±0,28 ^{e(4)}	10,34 ±0,09 ^{d(5)}
8	2,60 ±0,27 ^{cd(1)}	3,86 ±0,13 ^{d(2)}	5,04 ±0,10 ^{b(3)}	7,40 ±0,24 ^{de(4)}	10,17 ±0,30 ^{cd(5)}
16	2,48 ±0,24 ^{cd(1)}	3,60 ±0,18 ^{cd(2)}	4,93 ±0,42 ^{b(3)}	7,18 ±0,03 ^{cd(4)}	10,06 ±0,04 ^{bcd(5)}
32	2,54 ±0,09 ^{cd(1)}	3,48 ±0,06 ^{c(2)}	4,82 ±0,11 ^{b(3)}	7,00 ±0,50 ^{cd(4)}	9,92 ±0,39 ^{bcd(5)}
64	2,34 ±0,27 ^{bc(1)}	2,82 ±0,10 ^{b(1)}	4,85 ±0,25 ^{b(2)}	6,64 ±0,49 ^{bc(3)}	9,70 ±0,14 ^{bc(4)}
96	2,10 ±0,12 ^{b(1)}	2,58 ±0,10 ^{ab(1)}	4,66 ±0,24 ^{b(2)}	6,18 ±0,31 ^{ab(3)}	9,50 ±0,45 ^{b(4)}
128	1,68 ±0,10 ^{a(1)}	2,44 ±0,33 ^{a(2)}	4,20 ±0,20 ^{a(3)}	5,88 ±0,12 ^{a(4)}	8,96 ±0,36 ^{a(5)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

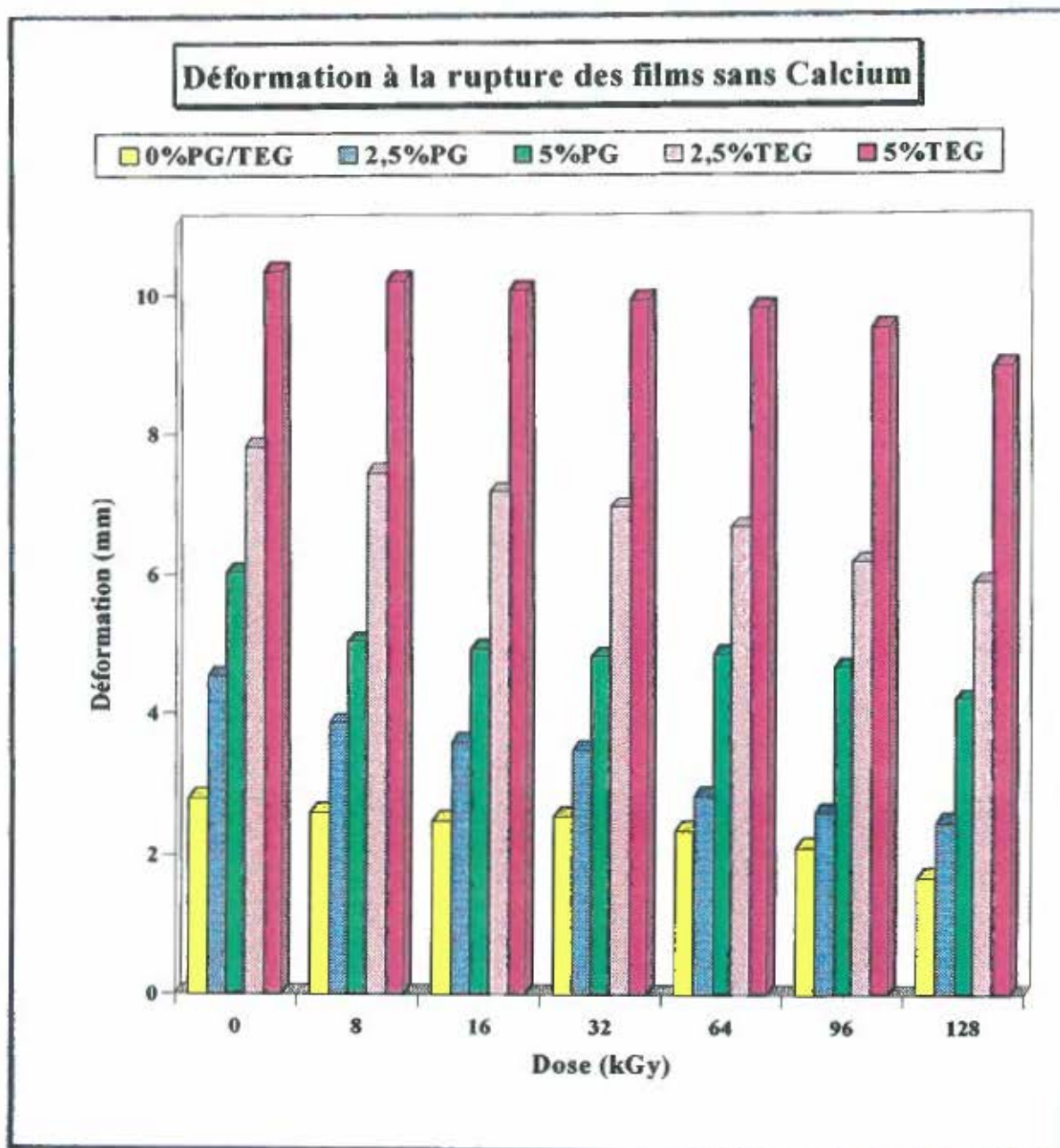


Figure 12 : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.

En présence de 0,125% de calcium (tableau 11, figure 13), on note une diminution de la déformation à la rupture avec la dose d'irradiation. Le pouvoir déformant le plus faible est obtenu à la dose d'irradiation la plus élevée.

En absence d'agent plastifiant, la déformation varie entre 2,68mm et 1,78mm ce qui représente une diminution du pouvoir déformant de 34% avec l'irradiation à 128 kGy.

Avec l'ajout de 2,5% PG, la dite déformation diminue avec la dose d'irradiation de 5,08mm (0 kGy) à 2,54mm (128 kGy) représentant un affaiblissement du pouvoir déformant de 50%. Avec le 5% PG, on note également une diminution de la déformation à la rupture. Sa valeur varie de 7,00mm à 4,62mm, soit un affaiblissement du pouvoir déformant de 34%.

En présence de TEG, la déformation à la rupture des films diminue avec la dose d'irradiation. Les valeurs varient de 8,08mm à 6,14mm en présence de 2,5%TEG et de 10,34mm à 9,17mm avec 5% TEG, soit une perte du pouvoir déformant de 24% et de 11% respectivement.

Avec l'ajout d'agents plastifiants, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la déformation à la rupture pour toutes les doses d'irradiation.

Tableau 11: Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,125% Calcium.

Dose(kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	2,68 ±0,19 ^{c(1)}	5,08 ±0,15 ^{d(2)}	7,00 ±1,23 ^{c(3)}	8,08 ±1,05 ^{d(3)}	10,34 ±0,09 ^{c(4)}
8	2,52 ±0,26 ^{b c(1)}	4,24 ±0,03 ^{c(2)}	6,54 ±0,10 ^{b c(3)}	7,95 ±0,28 ^{d(4)}	10,71 ±0,65 ^{b c(5)}
16	2,44 ±0,09 ^{b c(1)}	4,00 ±0,21 ^{b c(2)}	6,16 ±0,54 ^{a b c(3)}	7,86 ±0,57 ^{c d(4)}	10,04 ±0,71 ^{a b(5)}
32	2,46 ±0,15 ^{b c(1)}	3,84 ±0,42 ^{b(2)}	5,68 ±0,67 ^{a b c(3)}	7,60 ±0,24 ^{b c d(4)}	9,90 ±0,06 ^{a b(5)}
64	2,34 ±0,10 ^{b(1)}	2,90 ±0,24 ^{a(1)}	5,06 ±0,72 ^{a b(2)}	7,00 ±0,12 ^{a b c(3)}	9,60 ±0,36 ^{a(4)}
96	2,26 ±0,06 ^{b(1)}	2,70 ±0,06 ^{a(1)}	4,91 ±0,66 ^{a(2)}	6,77 ±0,10 ^{a b(3)}	9,44 ±0,27 ^{a(4)}
128	1,78 ±0,09 ^{a(1)}	2,54 ±0,10 ^{a(1)}	4,62 ±1,19 ^{a(2)}	6,14 ±0,06 ^{a(3)}	9,17 ±0,66 ^{a(4)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

Déformation à la rupture des films à 0,125% Calcium

0%PG/TEG 2,5%PG 5%PG 2,5%TEG 5%TEG

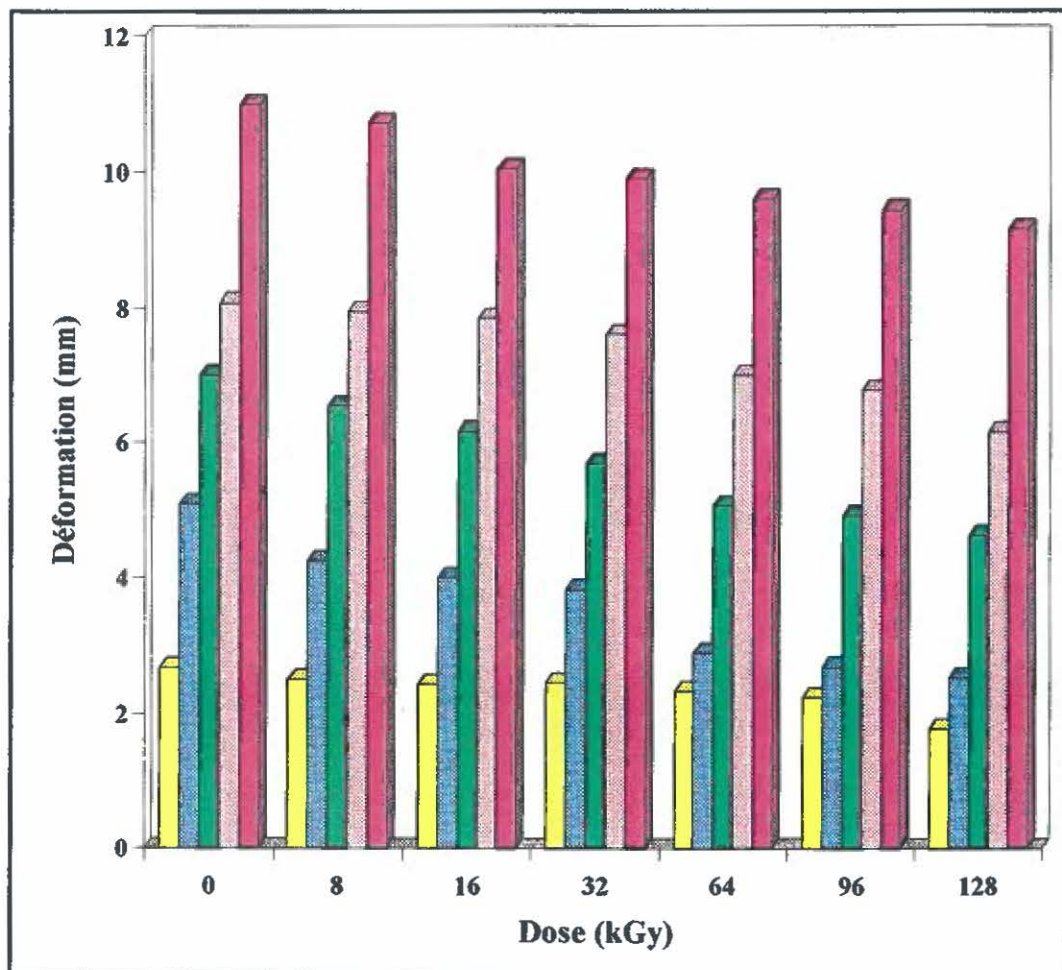


Figure 13 : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% présence de 0,1250% Calcium.

En présence de 0,250% de calcium (tableau 12, figure 14), on note aussi une diminution de la déformation à la rupture avec la dose d'irradiation.

En absence d'agent plastifiant, la déformation varie entre 2,84mm et 1,66mm ce qui représente une diminution du pouvoir déformant de 42% avec l'irradiation à 128 kGy.

Avec l'ajout de 2,5% PG, la dite déformation diminue avec la dose d'irradiation de 5,52mm (0 kGy) à 2,72mm (128 kGy) représentant un affaiblissement du pouvoir déformant de 51%. Avec le 5% PG, on note également une diminution de la déformation à la rupture. Sa valeur varie de 7,74mm à 5,04mm, soit un affaiblissement du pouvoir déformant de 35%.

En présence de TEG, la déformation à la rupture des films diminue avec la dose d'irradiation. Les valeurs varient de 8,90mm à 6,86mm en présence de 2,5%TEG et de 10,88mm à 8,74mm avec 5% TEG, soit une perte du pouvoir déformant de 23% et de 20% respectivement.

Avec l'ajout d'agents plastifiants, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la déformation à la rupture pour toutes les doses d'irradiation.

Tableau 12: Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.

Dose(kGy)	0% PG/TEG	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	2,84 ±0,18 ^{d(1)}	5,52 ±0,15 ^{d(2)}	7,74 ±0,06 ^{d(3)}	8,90 ±0,63 ^{d(4)}	10,88 ±0,22 ^{e(5)}
8	2,68 ±0,09 ^{cd(1)}	4,54 ±0,27 ^{c(2)}	6,96 ±0,78 ^{c(3)}	8,38 ±0,09 ^{cd(4)}	10,46 ±0,17 ^{de(5)}
16	2,56 ±0,13 ^{bc(1)}	4,02 ±0,24 ^{b(2)}	6,52 ±0,54 ^{c(3)}	8,02 ±0,34 ^{bc(4)}	10,10 ±0,12 ^{cd(5)}
32	2,48 ±0,06 ^{b(1)}	3,96 ±0,27 ^{b(2)}	6,20 ±0,36 ^{bc(3)}	7,76 ±0,27 ^{b(4)}	9,60 ±0,10 ^{bc(5)}
64	2,46 ±0,06 ^{b(1)}	2,90 ±0,03 ^{a(1)}	5,64 ±0,18 ^{ab(2)}	7,56 ±0,06 ^{b(3)}	9,18 ±0,76 ^{ab(4)}
96	2,44 ±0,09 ^{b(1)}	2,76 ±0,01 ^{a(1)}	5,48 ±0,33 ^{ab(2)}	6,98 ±0,39 ^{a(3)}	9,10 ±0,43 ^{ab(4)}
128	1,66 ±0,06 ^{a(1)}	2,72 ±0,06 ^{a(2)}	5,04 ±0,18 ^{a(3)}	6,86 ±0,02 ^{a(4)}	8,74 ±0,27 ^{a(5)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

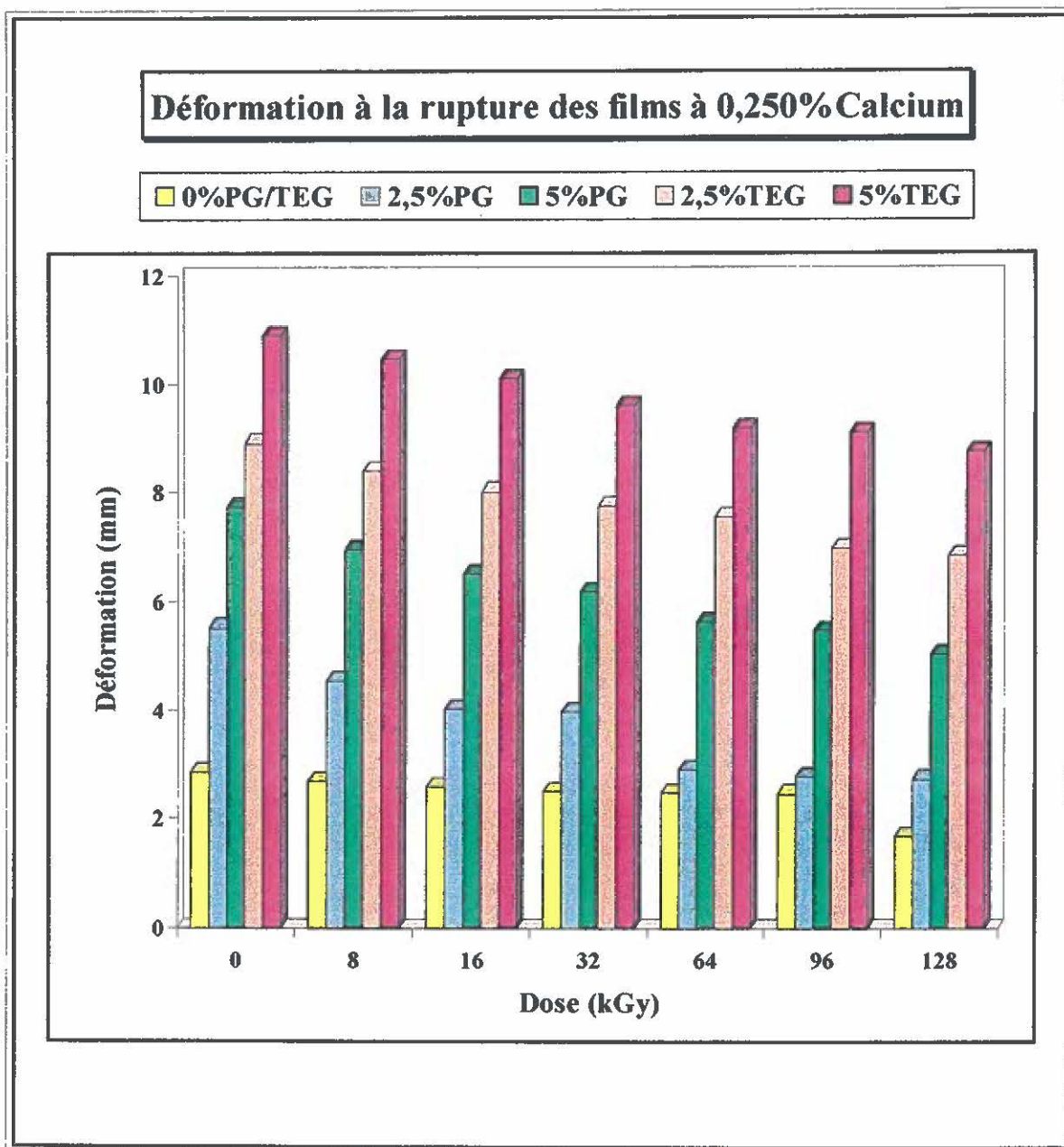


Figure 14 : Déformation à la rupture des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% présence de 0,250% Calcium.

1.5- Viscoélasticité des films

La viscoélasticité des films est évaluée par le coefficient de relaxation (Y) dont la valeur varie entre 1 et 0. Les résultats sont exposés aux tableaux 13, 14 et 15. Une des particularités recherchées dans de tels films est leur caractéristique élastique, ce qui correspond à un faible coefficient de relaxation. Par ailleurs, seuls les films pouvant se déformer à plus de trois millimètres (3 mm) peuvent être étudiés, car la viscoélasticité est mesurée suite à une déformation maintenue de 3mm pendant une minute. Par conséquent, seuls les films contenant un agent plastifiant seront étudiés. Une diminution de la valeur du coefficient de relaxation correspond à une amélioration de l'élasticité.

En absence de Calcium: (tableau 13, figure 15), on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'élasticité des films avec l'augmentation de la dose d'irradiation. À 2,5% PG, le coefficient de relaxation (Y) minimum de 0,48 est atteint à la dose d'irradiation de 96 kGy. En doublant la concentration de PG à 5%, l'élasticité des films ne s'était pas améliorée significativement ($p > 0,05$) avec l'irradiation.

Par contre, à 2,5% TEG, le coefficient de relaxation minimum de 0,64 est atteint à 32 kGy, alors qu'il était de 0,70 à 0 kGy. En doublant la concentration de TEG (à 5%), l'élasticité augmente significativement ($p \leq 0,05$) avec la dose d'irradiation. Le coefficient de relaxation diminue donc de 0,56 à 0,40 en portant la dose d'irradiation de 0 à 128 kGy.

En comparant les deux agents plastifiants entre eux, quelle que soit la dose d'irradiation, c'est le TEG à la concentration 5% qui donne la meilleure viscoélasticité. La valeur optimale est donc atteinte à 128 kGy donnant un coefficient de relaxation γ de 0,40.

Tableau 13: Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.

Dose (kGy)	2,5%PG	5%PG	2,5%TEG	5%TEG
0	0,70 ±0,01 ^{e(3)}	0,66 ±0,01 ^{a b(2)}	0,70 ±0,007 ^{d(3)}	0,56 ±0,01 ^{e(1)}
8	0,62 ±0,01 ^{c(2)}	0,64 ±0,01 ^{a(2)}	0,67 ±0,01 ^{b c(3)}	0,54 ±0,005 ^{d e(1)}
16	0,65 ±0,03 ^{c d(2)}	0,68 ±0,007 ^{c d(2)}	0,65 ±0,01 ^{a b(2)}	0,48 ±0,005 ^{b c(1)}
32	0,64 ±0,01 ^{c d(2)}	0,66 ±0,008 ^{a b(2)}	0,64 ±0,01 ^{a(2)}	0,45 ±0,01 ^{b(1)}
64	0,56 ±0,03 ^{b(2)}	0,66 ±0,01 ^{b c(3)}	0,65 ±0,002 ^{a b(3)}	0,50 ±0,04 ^{c d(1)}
96	0,48 ±0,01 ^{a(1)}	0,70 ±0,002 ^{e(2)}	0,67 ±0,002 ^{c(2)}	0,48 ±0,02 ^{b c(1)}
128	0,66 ±0,002 ^{d e(2)}	0,68 ±0,007 ^{d(3)}	0,70 ±0,01 ^{d(4)}	0,40 ±0,002 ^{a(1)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

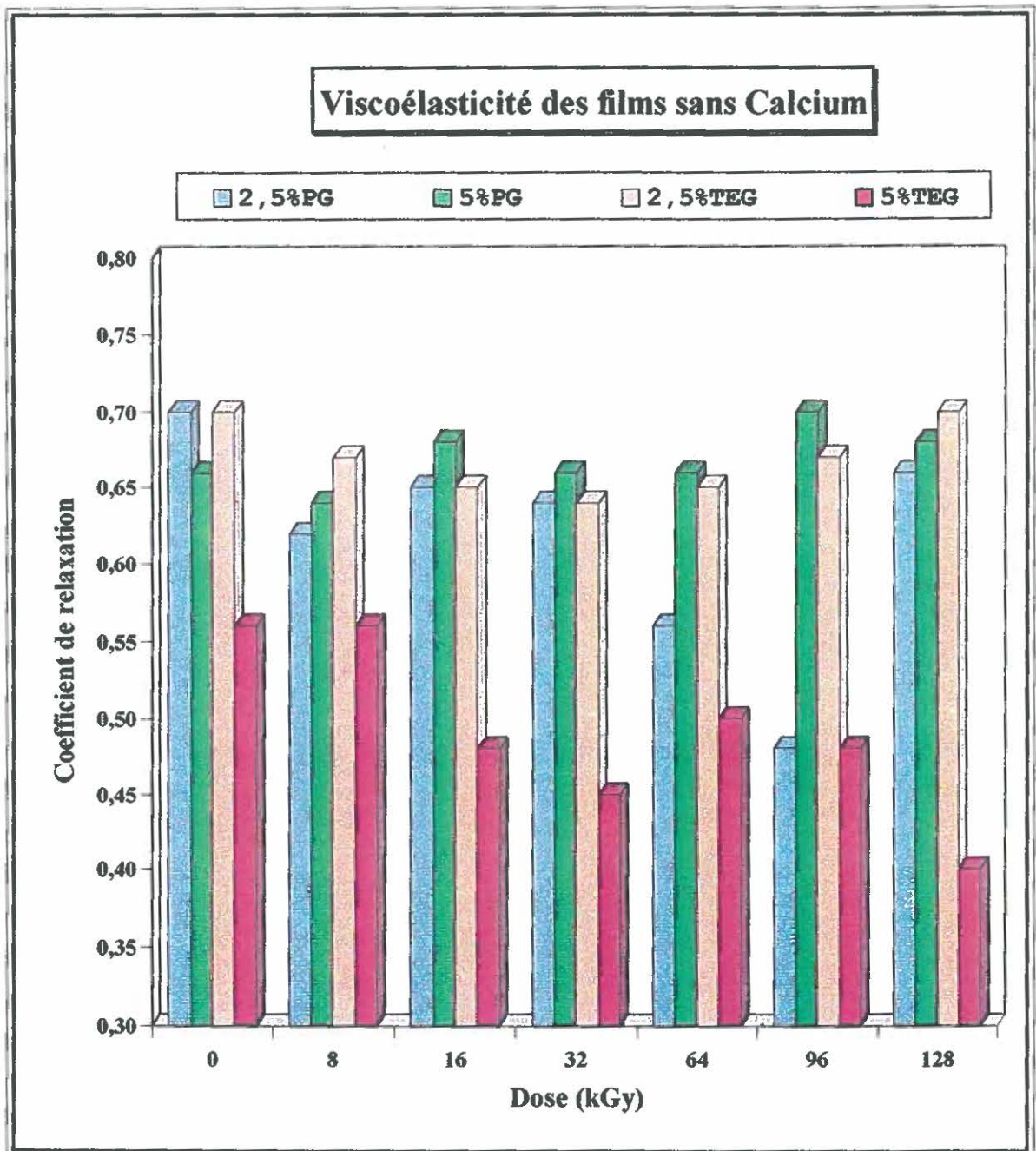


Figure 15 : Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en absence de Calcium.

À la concentration de 0,125% Calcium: (tableau 14, figure 16), l'irradiation a tendance à produire des films plus élastiques. En effet, on note une amélioration significative ($p \leq 0,05$) de la viscoélasticité avec la dose d'irradiation pour tous les films sauf le 5% PG.

À 2,5% PG, la valeur minimale du coefficient de relaxation Y est de 0,51. Elle a été atteinte à la dose de 96 kGy. En doublant la concentration à 5% PG, l'élasticité des films augmente significativement ($p \leq 0,05$) pour les doses de 0 kGy : Y passe respectivement de 0,70 à 0,64 ; et pour 8 kGy : Y passe de 0,66 à 0,62). D'autre part, avec le 2,5% TEG, le Y_{minimum} de 0,64 est atteint à 32kGy. En doublant la concentration à 5% TEG, ce Y_{minimum} de 0,44 est obtenu à la dose de 16 kGy.

En comparant les deux concentrations de TEG, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'élasticité des films avec l'ajout de TEG quelle que soit la dose d'irradiation appliquée. C'est en particulier à la concentration de 5% TEG qu'on obtient les meilleures valeurs de viscoélasticité.

Tableau 14: Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,125% Calcium.

Dose (kGy)	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	0,70 ±0,005 ^{c(3)}	0,64 ±0,01 ^{a b c(2)}	0,70 ±0,007 ^{d(2)}	0,53 ±0,007 ^{d(1)}
8	0,66 ±0,007 ^{b c(3)}	0,62 ±0,008 ^{a(2)}	0,67 ±0,005 ^{c(3)}	0,51 ±0,005 ^{c(1)}
16	0,66 ±0,005 ^{b c(2)}	0,63 ±0,03 ^{a b(2)}	0,65 ±0,002 ^{b c(2)}	0,44 ±0,007 ^{a(1)}
32	0,64 ±0,04 ^{b c(2)}	0,65 ±0,01 ^{b c d(2)}	0,64 ±0,005 ^{a(2)}	0,43 ±0,01 ^{a(1)}
64	0,60 ±0,07 ^{b(2)}	0,67 ±0,01 ^{c d(2)}	0,65 ±0,005 ^{a b(2)}	0,47 ±0,005 ^{b(1)}
96	0,51 ±0,01 ^{a(1)}	0,67 ±0,005 ^{d(2)}	0,65 ±0,01 ^{b c(2)}	0,50 ±0,005 ^{c(1)}
128	0,65 ±0,01 ^{b c(2)}	0,64 ±0,005 ^{a b c(2)}	0,70 ±0,002 ^{d(3)}	0,43 ±0,02 ^{a(1)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

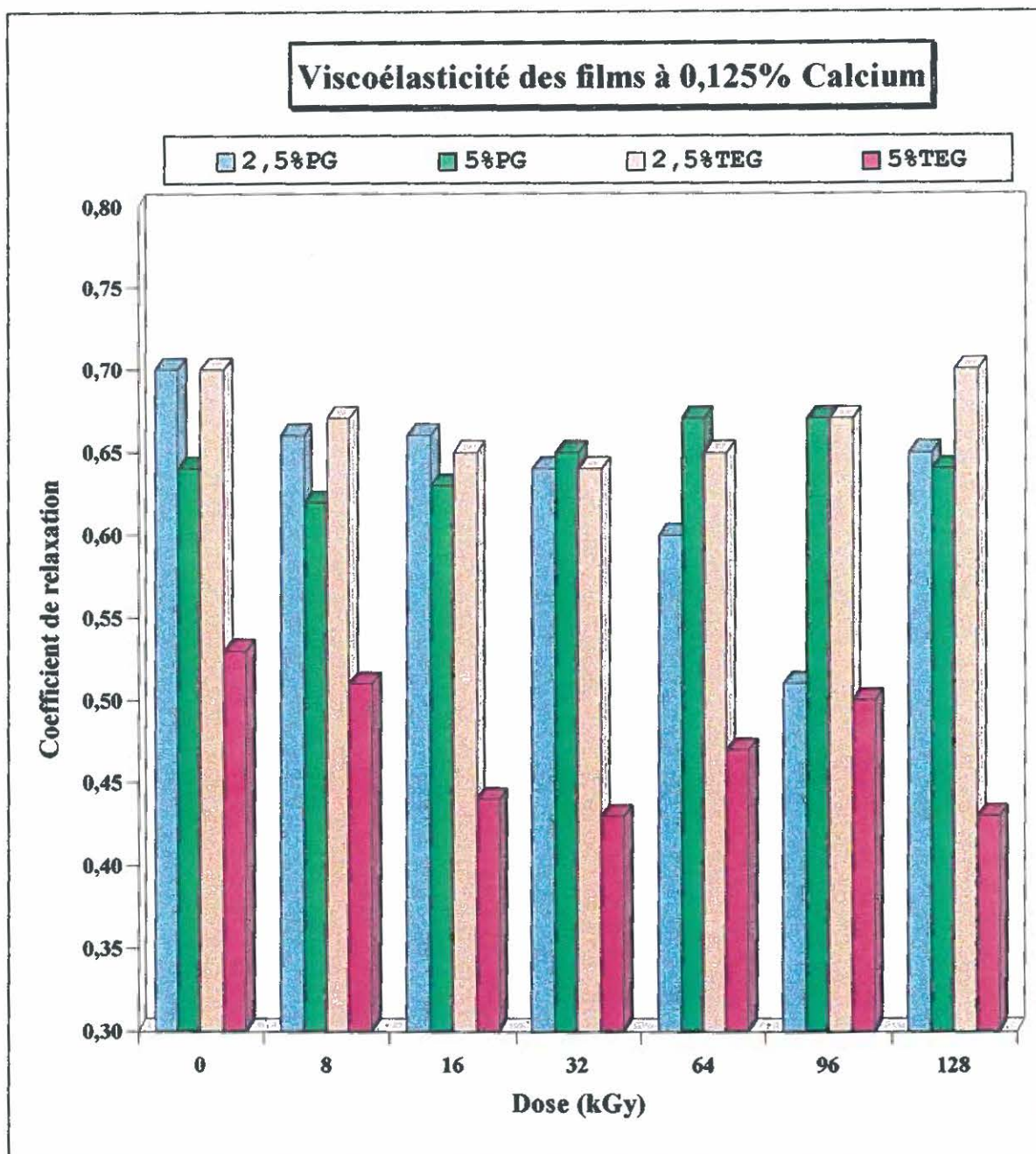


Figure 16: Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,125% de Calcium.

À la concentration de 0,250% Calcium : (tableau 15, figure 17), on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'élasticité des films avec l'augmentation de la dose d'irradiation. Toutefois, en présence de 5% PG, on ne relève aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les différentes doses d'irradiation. Dans le cas de 2,5% PG, le maximum de l'élasticité correspondant à Y de 0,58 est atteint à la dose de 64 kGy. Quant au cas de 2,5% TEG, ce maximum correspondant à $Y=0,63$ est atteint à 32 kGy. Par contre, à la concentration de 5% TEG, une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'élasticité a été observée en fonction de la dose d'irradiation.

En essayant de comparer les deux concentrations de PG, on remarque que la dose de 16 kGy représente un point critique. Pour les doses d'irradiation inférieures (0 et 8) kGy, c'est la concentration de 5% qui donne la meilleure viscoélasticité. Par contre, pour les doses 32, 64 et 96 kGy, c'est la concentration 2,5% PG qui donne les meilleurs résultats (Y étant de 0,65 ; 0,58 et 0,56 respectivement).

En doublant la concentration de TEG à 5%, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'élasticité des films pour toutes les doses d'irradiation.

Les valeurs de Y passe de 0,71 à 0,54 pour un film non irradié et de 0,69 à 0,41 pour un film de 128 kGy.

En comparant les deux agents plastifiants, c'est le 5% TEG irradié à 128 kGy qui donne la meilleure viscoélasticité avec un coefficient de relaxation de 0,41.

Tableau 15: Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% en présence de 0,250% Calcium.

Dose (kGy)	2,5% PG	5% PG	2,5% TEG	5% TEG
0	0,71 ±0,01 ^{c(3)}	0,66 ±0,01 ^{a b c(2)}	0,71 ±0,007 ^{e(3)}	0,54 ±0,007 ^{g(1)}
8	0,67 ±0,002 ^{b(3)}	0,65 ±0,01 ^{a b(2)}	0,69 ±0,002 ^{d(4)}	0,53 ±0,005 ^{f(1)}
16	0,67 ±0,01 ^{b(2)}	0,66 ±0,01 ^{b c(2)}	0,67 ±0,007 ^{c(2)}	0,44 ±0,01 ^{c(1)}
32	0,65 ±0,01 ^{b(2)}	0,67 ±0,007 ^{c d(3)}	0,63 ±0,002 ^{a(2)}	0,43 ±0,005 ^{b(1)}
64	0,58 ±0,01 ^{a(2)}	0,66 ±0,007 ^{a b c(3)}	0,65 ±0,005 ^{a b(3)}	0,48 ±0,01 ^{d(1)}
96	0,56 ±0,01 ^{a(2)}	0,68 ±0,002 ^{d(4)}	0,66 ±0,008 ^{b(3)}	0,51 ±0,007 ^{e(1)}
128	0,66 ±0,02 ^{b(2)}	0,65 ±0,005 ^{a(2)}	0,69 ±0,01 ^{d(3)}	0,41 ±0,008 ^{a(4)}

Pour chaque colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$). Pour chaque ligne, deux moyennes suivies d'un même chiffre ne sont pas significativement différentes entre elles ($p > 0,05$).

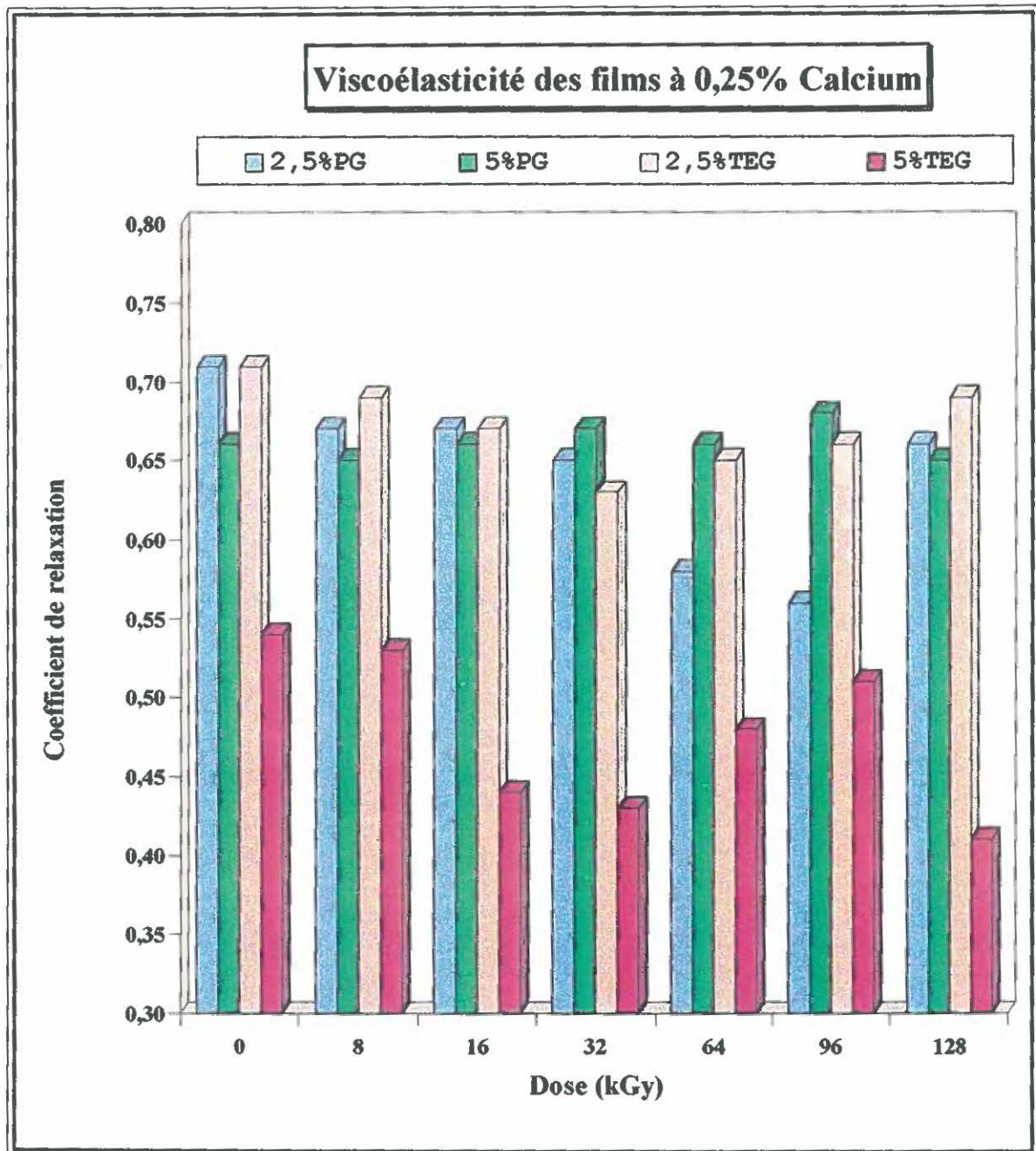


Figure 17: Viscoélasticité des films en fonction de la dose d'irradiation appliquée selon l'agent plastifiant : Propylène Glycol (PG) ou Triéthylène Glycol (TEG) à des concentrations de (0 ; 2,5 et 5)% et en présence de 0,250% Calcium.

2- LA BIODÉGRADABILITÉ

Selon les résultats ci-dessus, nous avons sélectionné le film composé de 2,5% PG irradié à 64 kGy dont on comparera la biodégradabilité avec un film de même composition irradié seulement à 4 kGy. Les résultats correspondants sont représentés aux tableaux 16, 17 et 18.

2.1- Le dénombrement bactérien :

Lorsque les films irradiés à 4 kGy sont mis en présence de bactéries, on note une diminution significative ($p \leq 0,05$) du nombre d'unités formatrices de colonies qui passe ainsi de 10^{10} à 10^6 , ceci entre le moment de l'inoculation et le quatrième jour de fermentation (tableau 16, figure 18). Entre le huitième et le douzième jour, on observe une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la croissance bactérienne. Ce dit nombre passe de 10^5 à 10^9 UFC/ml. Au delà, on observe une phase de stabilisation qui s'étend jusqu'au vingt-quatrième jour avec un maximum de 10^9 UFC/ml. Enfin, c'est la phase de décroissance qui se maintient jusqu'à la fin de la fermentation. Au jour 40, le compte bactérien observé est de 10^6 UFC/ml.

Lorsque les films irradiés à 64 kGy sont mis en présence de bactéries, on note une diminution significative ($p \leq 0,05$) du nombre d'unités formatrices de colonies qui passe ainsi de 10^{10} à 10^6 ; ceci entre le moment de l'inoculation et le quatrième jour de fermentation (tableau 16, figure 18). À partir de ce moment, on observe l'apparition d'une phase de croissance bactérienne qui se poursuit jusqu'au jour 28. Le maximum de micro-organismes est de 10^9 (UFC/ml) au jour 28. Au delà, le compte bactérien diminue significativement ($p \leq 0,05$) jusqu'à la fin de la fermentation. Au jour 40, il est de 10^8 .

Lorsque les bactéries sont mises seules dans un milieu de base sans carbone, on y relève une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la croissance bactérienne jusqu'au quatrième jour d'incubation. Le nombre d'unités formatrices de colonies passe de 10^{10} à 10^6 UFC/ml (tableau 16, figure 18). Une phase de stabilisation suit jusqu'au vingtième jour où ce nombre atteint 10^5 . Au delà, on observe une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la croissance bactérienne qui se termine par la mort des bactéries au trente-deuxième jour d'incubation. Lorsque les films sont seuls dans le milieu, on n'a décelé aucune présence bactérienne tout au long de l'expérience, ce qui confirme que le milieu était bien stérile.

Tableau 16: Résultats des dénombrements de *Pseudomonas aeruginosa* (\log_{10}) en présence et/ou en absence d'un échantillon de films à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy.

Jours	Films seuls à 4 ou 64kGy	Bactéries Seules	Films à 4kGy + Bactéries	Films à 64 kGy + Bactéries
0	0	9,76 ± 0,24	9,5 ± 0,15	9,76 ± 0,24
4	0	5,78 ± 0,38 p<0,0001	5,96 ± 0,19 p<0,0001	5,84 ± 0,02 p<0,0001
8	0	5,74 ± 0,29 p=0,89	5,44 ± 0,05 p=0,01	6,15 ± 0,29 p=0,14
12	0	5,61 ± 0,42 p=0,70	8,47 ± 0,49 p=0,0005	7,5 ± 1,14 p=0,12
16	0	5,49 ± 0,34 p=0,72	8,44 ± 0,01 p=0,94	7,61 ± 1,16 p=0,92
20	0	5,14 ± 0,36 p=0,29	8,62 ± 0,05 p=0,007	8,08 ± 0,81 p=0,60
24	0	3,39 ± 0,18 p=0,07	8,72 ± 0,10 p=0,22	8,72 ± 0,23 p=0,26
28	0	1,64 ± 0,12 p=0,23	7,78 ± 0,22 p=0,003	8,99 ± 0,11 p=0,15
32	0	0	7,65 ± 0,12 p=0,42	8,35 ± 0,15 p=0,004
36	0	0	6,94 ± 0,43 p=0,05	8,00 ± 0,14 p=0,04
40	0	0	6,01 ± 0,02 p=0,02	7,67 ± 0,43 p=0,28

Dénombrement bactérien

□ UFC-Films seuls (4 / 64) kGy ■ UFC-Bactéries Seules
■ UFC-Films à 64 kGy + Bactéries ■ UFC-Films à 4 kGy + Bactéries

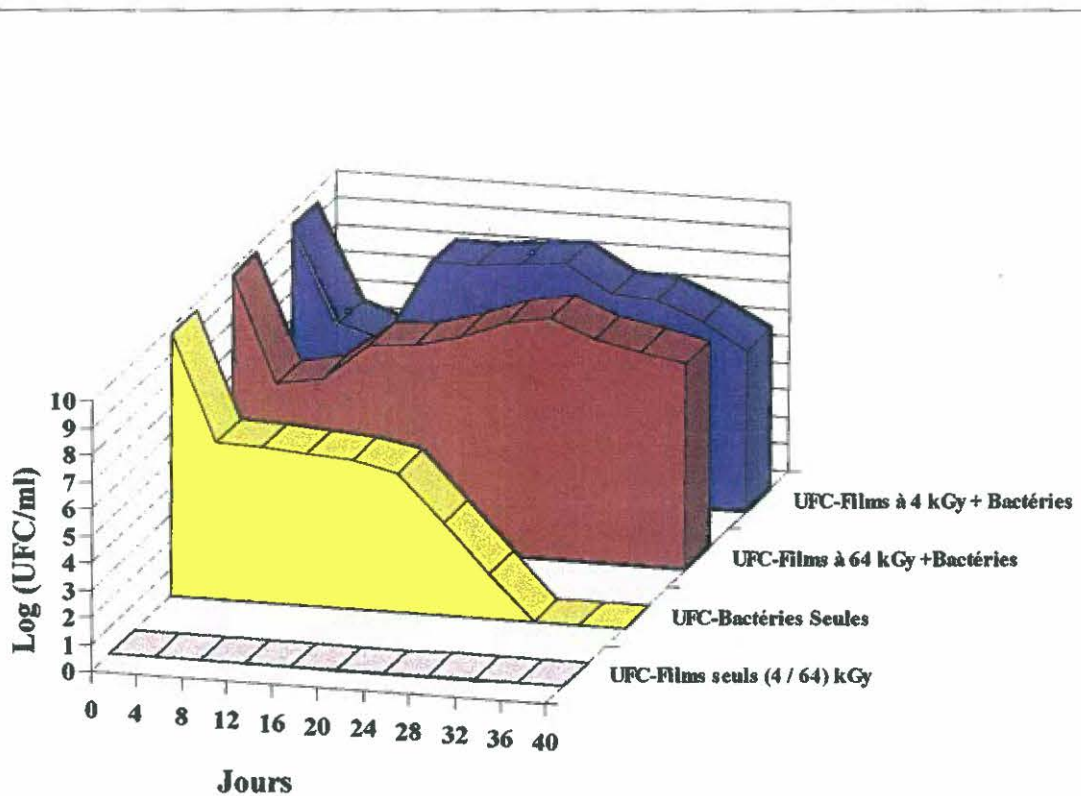


Figure 18: Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en présence et/ou en absence de films à base de caséinate de calcium et de 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy.

2.2- Dosage de l'azote :

Les valeurs du pourcentage d'azote soluble au cours de la fermentation sont énumérées au tableau 17 et aux figures 19 et 20.

Lorsque les bactéries sont seules, on note une faible production d'azote soluble dans le milieu par la population bactérienne qui est de l'ordre de 0.06%. Ce pourcentage d'azote diminue tout au long de la fermentation pour s'annuler au trente-deuxième jour avec la mort des bactéries. Cette diminution est particulièrement significative ($p \leq 0,05$) à partir du jour 24 où la valeur était 0,02%.

Lorsque les films irradiés à 4 kGy sont seuls dans le milieu, on observe une augmentation progressive du pourcentage d'azote avec le temps. Il varie entre 0,106% et 0,377% au cours des 40 jours d'analyse.

Lorsque les films irradiés à 4 kGy sont mis en présence des bactéries, on note une première phase de faible augmentation significative ($p \leq 0,05$) du pourcentage d'azote entre le moment de l'inoculation et le huitième jour. Le pourcentage d'azote soluble passe de 0,191% à 0,245%. La deuxième phase est caractérisée par une forte augmentation significative ($p \leq 0,05$) entre le huitième et le seizième jour, atteignant 1,108% d'azote soluble. Après le seizième jour, une

phase de stabilisation est observée jusqu'au vingt-quatrième jour où la valeur a atteint 1,019%. À partir de ce jour, une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la production d'azote reprend à un rythme relativement lent pour atteindre la valeur de 1,131% à la fin de l'expérience (quarantième jour).

Lorsque les films irradiés à 64 kGy sont seuls dans le milieu, on observe une augmentation progressive du pourcentage d'azote tout au long de l'expérience. Le contenu en azote soluble aux jours 0, 8, 16 et 40 est respectivement de 0,218% ; 0,237% ; 0,261% et 0,362%. Le taux de libération d'azote est de l'ordre de 0,004% par jour, tout au long de l'expérience.

Lorsque les films irradiés à 64 kGy sont mis en présence des bactéries, on note une première phase de faible augmentation non significative ($p > 0,05$) du pourcentage d'azote entre le moment de l'inoculation (0,273%) et le douzième jour (0,321%). À partir du seizième jour, une deuxième phase caractérisée par une forte augmentation significative ($p \leq 0,05$) se maintient jusqu'au trente-deuxième jour. Les valeurs de l'azote soluble passent de 0,276% à 1,206%. Une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la production d'azote se poursuit à un taux de 0,016% par jour. Au jour 40, la quantité d'azote soluble est de 1,335%.

En comparant l'évolution de la production d'azote en présence de bactéries entre les deux types de films (irradiés à 4 kGy ou à 64 kGy, figure 19), on remarque un comportement largement similaire avec, toutefois, avec un décalage de 8 jours. En effet, l'augmentation significative ($p \leq 0,05$) du pourcentage d'azote se produit au huitième jour pour les films irradiés à 4 kGy et au seizième jour pour les films irradiés à 64 kGy.

Au douzième jour, le pourcentage d'azote soluble était de 0,851% pour les films irradiés à 4 kGy ; alors qu'il était de 0,321% pour ceux irradiés à 64 kGy. Au jour 20, ces pourcentages étaient de 1,045% et 0,440% respectivement. Pour les films irradiés à 64 kGy, ce n'est qu'au jour 28 que ce pourcentage atteint une valeur dépassant le 1% (exactement 1,123%).

Les valeurs nettes du pourcentage d'azote soluble dû exclusivement à l'activité bactérienne sont représentées à la figure 20. Elles sont calculées en déduisant les valeurs obtenues des milieux de films seuls de celles en présence de bactéries. Cette représentation a l'avantage de nous illustrer la variation de la vitesse d'attaque bactérienne selon la dose d'irradiation du film (4 ou 64 kGy).

Tableau 17: Résultats du pourcentage d'azote soluble dans le milieu en présence et/ou en absence d'un échantillon de films (irradiés 4 ou à 64 kGy) à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol et en présence ou non de *Pseudomonas aeruginosa*.

Jours	Bactéries Seules	Films seuls à 4kGy	Films seuls à 64kGy	Films à 4kGy + Bactéries	Films à 64kGy + Bactéries
0	0,062 ± 0,010	0,106 ± 0,004	0,218 ± 0,010	0,191 ± 0,007	0,273 ± 0,038
4	0,063 ± 0,029 p=0,96	0,128 ± 0,000	0,230 ± 0,010	0,216 ± 0,002 p=0,004	0,306 ± 0,039 p=0,36
8	0,042 ± 0,013 p=0,32	0,184 ± 0,006	0,237 ± 0,021	0,245 ± 0,010 p=0,010	0,309 ± 0,036 p=0,92
12	0,057 ± 0,033 p=0,49	0,133 ± 0,019	0,251 ± 0,024	0,851 ± 0,013 p<0,0001	0,321 ± 0,068 p=0,80
16	0,049 ± 0,019 p=0,73	0,200 ± 0,001	0,261 ± 0,011	1,108 ± 0,072 p=0,004	0,276 ± 0,012 p=0,33
20	0,029 ± 0,029 p=0,19	0,211 ± 0,005	0,307 ± 0,048	1,045 ± 0,043 p=0,27	0,440 ± 0,017 p=0,0002
24	0,02 ± 0,004 p=0,30	0,207 ± 0,017	0,342 ± 0,037	1,019 ± 0,007 p=0,36	0,628 ± 0,007 p<0,0001
28	0,003 ± 0,002 p=0,004	0,332 ± 0,002	0,286 ± 0,018	1,048 ± 0,001 p=0,003	1,123 ± 0,003 p<0,0001
32	0 p=0,04	0,34 ± 0,002	0,316 ± 0,006	1,085 ± 0,003 p<0,0001	1,206 ± 0,005 p<0,0001
36	0	0,359 ± 0,002	0,329 ± 0,004	1,114 ± 0,007 p=0,005	1,285 ± 0,005 p<0,0001
40	0	0,377 ± 0,010	0,362 ± 0,009	1,131 ± 0,003 p=0,02	1,335 ± 0,006 p=0,0004

Dosage de l'azote soluble

- Bactéries Seules
- Films à 4kGy seuls
- Films à 64kGy seuls
- Films à 64kGy + Bactéries
- Films à 4kGy + Bactéries

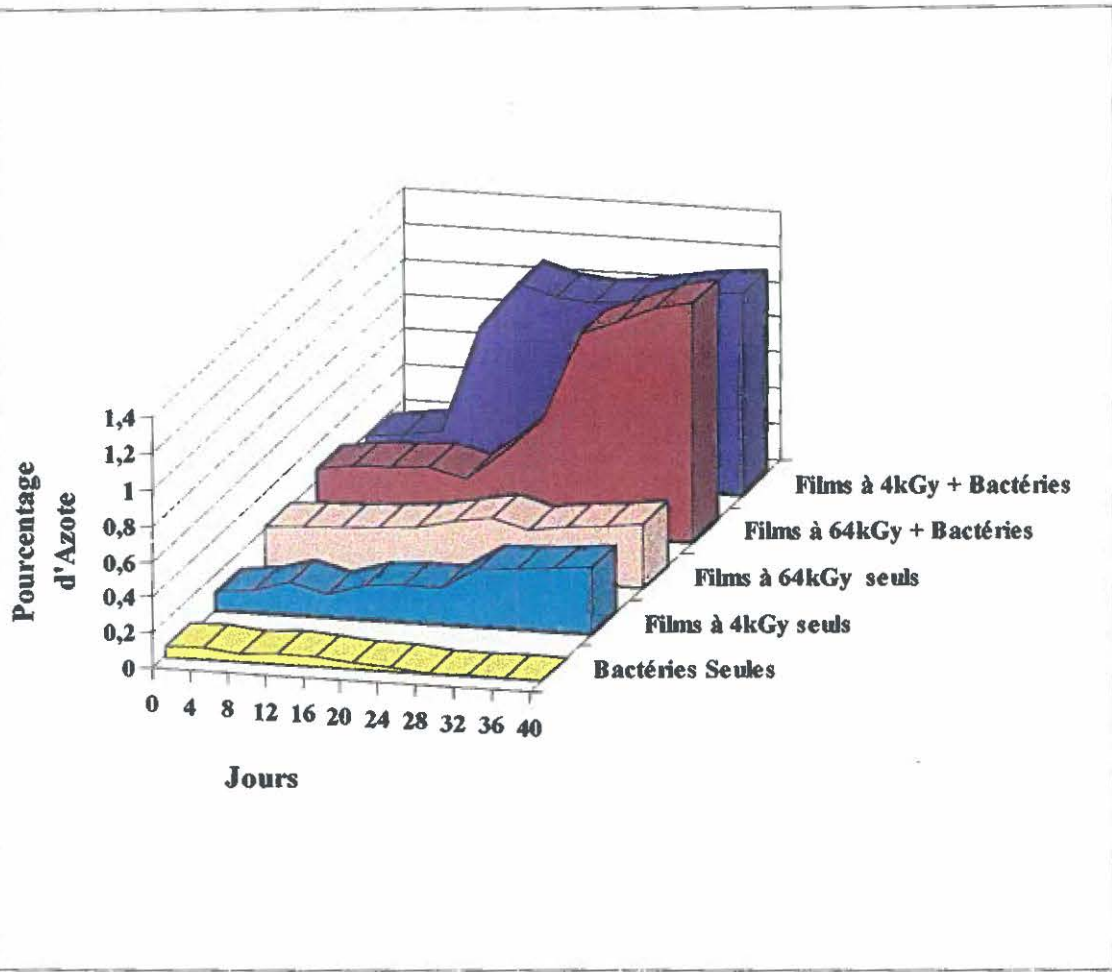


Figure 19: Pourcentage de l'azote soluble dans le milieu en présence et/ou en absence d'un échantillon des films (irradiés 4 ou à 64 kGy) à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol et en présence ou non de *Pseudomonas aeruginosa*.

Azote Net dû à l'activité bactérienne

Films à 64 kGy

Films à 4 kGy

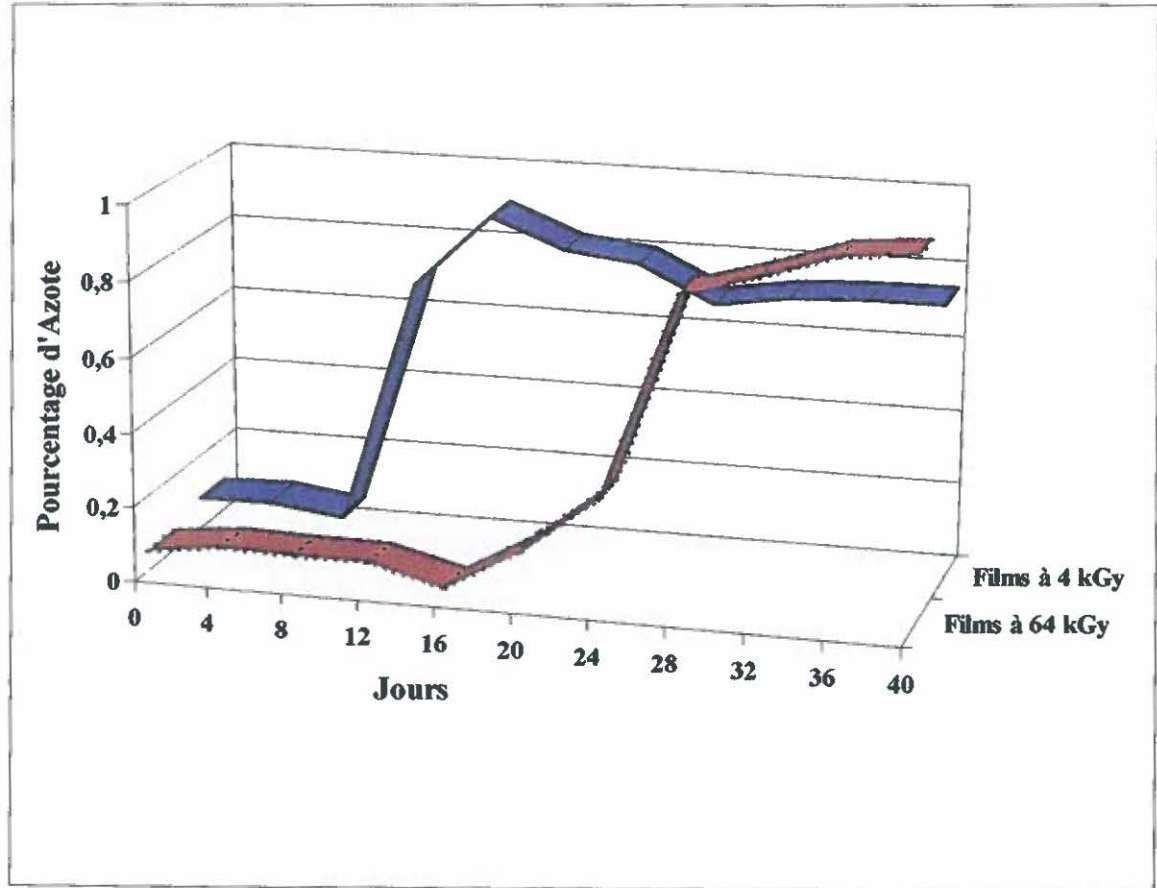


Figure 20: Pourcentage net d'azote dû à l'activité bactérienne sur des films irradiés à 4 et à 64 kGy.

2.3- Mesure des liens peptidiques

La densité optique mesurée à 210 nm dans la partie soluble du milieu permet d'évaluer l'évolution des liens peptidiques solubilisés au cours de la période de biodégradabilité. Les résultats de ces mesures sont représentés au tableau 18 et aux figures 21 et 22.

Lorsque les films irradiés à 4 kGy sont seuls dans le milieu, on observe une augmentation continue de la densité optique tout au long de l'expérience. La densité optique passe de 0,439 à 0,731 entre le jour de l'inoculation et le trente-sixième jour (tableau 18, figure 21).

Lorsque les films irradiés à 4 kGy sont mis en présence de bactéries, le nombre de liens peptidiques dans le milieu reste relativement stable autour de la valeur initiale de 0,434.

Lorsque les films irradiés à 64 kGy sont seuls dans le milieu, La densité optique augmente régulièrement jusqu'au vingtième jour rejoignant le maximum de 0,875. À partir de ce jour 20 et jusqu'au jour 40, on observe une stabilisation de la densité optique variant de 0,875 à 0,816 (tableau 18, figure 21).

Lorsque les films irradiés à 64 kGy sont mis en présence de bactéries, la densité optique augmente jusqu'au vingtième jour atteignant la valeur maximale de 0,756. C'est alors que commence une diminution jusqu'à la fin de la fermentation. Au jour 40, la densité optique est de 0,544.

En comparant les valeurs brutes de la densité optique des films irradiés à 4 et à 64 kGy, que ce soit en présence ou en absence de bactéries, il ressort qu'elles sont plus élevées dans le cas du film à 64 kGy. En effet, il y a moins de peptides à 4 kGy car ils sont utilisés plus facilement par les bactéries par rapport à 64 kGy.

La densité Optique Nette (Figure 22) est calculée en déduisant les valeurs obtenues des milieux en présence de bactéries de celles des films seuls. Elle nous renseigne sur la part des liens peptidiques affectée exclusivement par l'activité bactérienne. La comparaison des deux courbes (films à 4 et 64 kGy) nous indique un décalage dans le temps de quelque 12 jours en faveur des films moins irradiés.

Tableau 18 : Résultats de la densité optique des milieux contenant des films à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy en présence et/ou en absence de *Pseudomonas aeruginosa*.

Jours	Films seuls à 4kGy	Films à 4kGy + Bactéries	Films seuls à 64kGy	Films à 64kGy + Bactéries
0	0,439 ± 0,018	0,434 ± 0,062	0,403 ± 0,010	0,402 ± 0,003
4	0,466 ± 0,003	0,458 ± 0,004	0,523 ± 0,001	0,527 ± 0,035
8	0,475 ± 0,033	0,461 ± 0,003	0,671 ± 0,005	0,67 ± 0,025
12	0,532 ± 0,040	0,451 ± 0,009	0,734 ± 0,026	0,709 ± 0,017
16	0,540 ± 0,032	0,432 ± 0,013	0,785 ± 0,001	0,705 ± 0,023
20	0,650 ± 0,035	0,479 ± 0,008	0,875 ± 0,001	0,756 ± 0,010
24	0,615 ± 0,079	0,378 ± 0,044	0,815 ± 0,045	0,701 ± 0,017
28	0,657 ± 0,043	0,418 ± 0,027	0,733 ± 0,004	0,599 ± 0,006
32	0,715 ± 0,008	0,431 ± 0,018	0,749 ± 0,007	0,604 ± 0,056
36	0,731 ± 0,021	0,443 ± 0,014	0,788 ± 0,028	0,567 ± 0,042
40	0,712 ± 0,012	0,433 ± 0,015	0,816 ± 0,039	0,544 ± 0,030

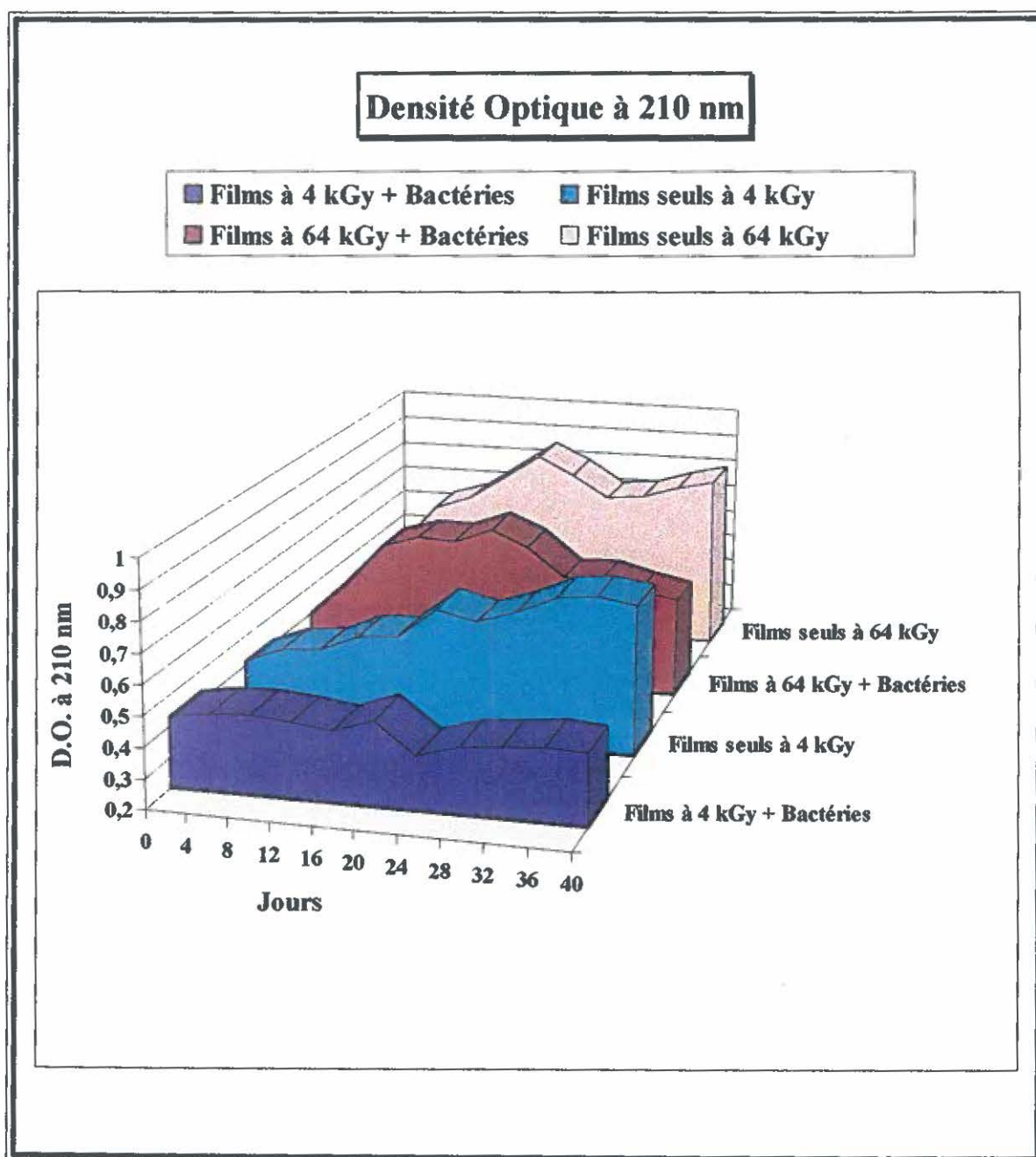


Figure 21: Densité Optique des milieux contenant des films à base de caséinate de calcium et 2,5% Propylène Glycol irradiés à 4 ou à 64 kGy en présence et/ou en absence de *Pseudomonas aeruginosa*.

Densité Optique Nette reflétant l'activité bactérienne

■ D.O. Nette des Films à 64 kGy ■ D.O. Nette des Films à 4 kGy

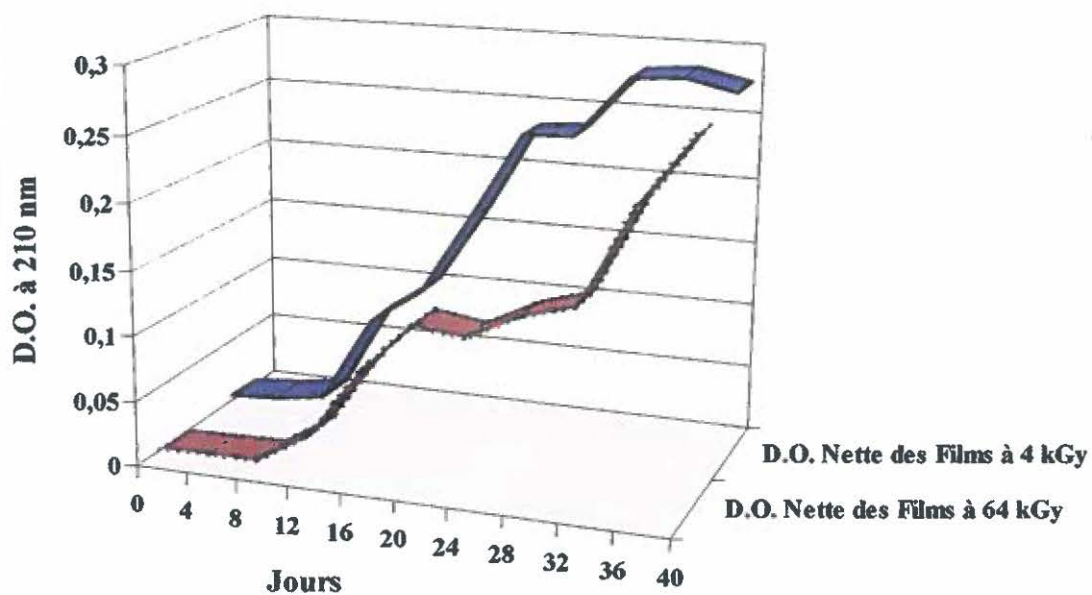


Figure 22 : Densité Optique Nette due à l'activité bactérienne en présence des films irradiés à 4 et à 64 kGy.

DISCUSSION

1- EFFETS DE L'IRRADIATION

1.1- Le taux de formation de bityrosine

Le taux de formation de bityrosine a été augmenté avec la dose d'irradiation administrée. L'optimum est atteint à une dose se situant entre 64 et 128 kGy, selon l'agent plastifiant utilisé.

Le taux de formation de bityrosine représente un facteur important dans le processus de réticulation induit par les radicaux hydroxyles (Davies, 1987 ; Davies et al., 1987a). D'ailleurs, l'effet de l'irradiation sur une molécule de protéine peut être une dénaturation, une dégradation, une réticulation ou un réarrangement moléculaire (Kraybill et al., 1959).

1.2- La force de rupture des gels

Les résultats de la force de rupture des gels, obtenus dans les présentes conditions d'expérimentation confirment que le traitement d'irradiation est essentiel pour la formation des gels dans les conditions de chauffages utilisées et que la présence de calcium à 0,125% le favorise à une dose minimale de 16 kGy.

1.3- Force et déformation à la rupture et viscoélasticité des films

Les résultats de mesure de la force de rupture des films ont montré qu'un traitement d'irradiation est bénéfique pour améliorer leur résistance. Une dose minimale se situant entre 16 et 32 kGy s'est avérée nécessaire.

En effet, Gontard et al. (1992) ont montré qu'une force de rupture élevée des films doit impliquer un nombre élevé ou une meilleure localisation des ponts entre les chaînes protéiques. Durant la période de séchage des solutions pour la formation des films, l'eau qui est responsable de la dispersion des protéines va être évaporée afin de permettre la formation de ponts entre les chaînes protéiques. Durant cette étape, la proximité des chaînes protéiques induites par l'irradiation peut faciliter la formation de tels ponts. De plus, l'irradiation de ces solutions favorise également les interactions entre les protéines qui se reflètent sur la rigidité des films.

D'ailleurs, en ce qui concerne la déformation à la rupture, l'irradiation a tendance à affaiblir le pouvoir déformant des films. Cette tendance a été atténuée par l'ajout d'agents plastifiants, notamment le TEG.

Quant à La viscoélasticité des films, elle a été améliorée avec la dose d'irradiation administrée. Les doses comprises entre 32 et 96 kGy ont donné des films plus élastiques.

Lors du processus de réticulation, toutes les chaînes polymériques ont été interreliées et regroupées en un gigantesque réseau. Si le nombre de points de contact n'est pas trop élevé, le réseau présente alors un pouvoir élastique appréciable tel que défini par Wunderlich (1981). Cette déformation réversible serait due à la présence d'embranchements flexibles.

2- EFFETS DU CALCIUM

2.1- Le taux de formation de bityrosine

Le taux de formation de bityrosine semble ne pas être affecté significativement ($p > 0,05$) par l'ajout de calcium à une solution protéique contenant 2,5% PG, exception faite du cas unique de 0,125% Calcium avec une dose d'irradiation de 128 kGy où on a relevé une faible augmentation significative ($p \leq 0,05$). En présence de 5% PG, le taux de formation de bityrosine n'a pas été affecté avec l'ajout de calcium et ce, pour toutes les doses d'irradiation.

En présence de 2,5% TEG, le taux de formation de bityrosine montre une faible augmentation particulièrement significative ($p \leq 0,05$) dans le cas de 96 kGy

avec 0,250% Ca. En présence de 5% TEG, il n'y a aucune variation significative ($p > 0,05$) du taux de formation de bityrosine avec l'ajout de calcium et ce, pour toutes les doses d'irradiation, à l'exception de la dose 16 kGy en présence de 0,125% calcium.

2.2- La force de rupture des gels

Les mesures de la force de rupture des gels montrent qu'il faut une concentration minimale de calcium de 0,125% pour pouvoir obtenir des gels. En doublant cette concentration minimale à 0,250%, on réduit la dose d'irradiation nécessaire à l'obtention de gels de 32 kGy à 16 kGy, en présence de TEG.

Quant à la force optimale de rupture des gels, elle est atteinte avec une concentration de 0,250% calcium et en absence d'agent plastifiant à la dose de 64 kGy.

En doublant la concentration de calcium (de 0,125% à 0,250%) en absence d'agent plastifiant, on obtient aussi une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des gels jusqu'à la dose d'irradiation de 64 kGy.

Cependant l'exposition de la solution protéique dans un bain-marie à 90°C pendant quatre heures est nécessaire. Le chauffage produit plus de conformation ouverte que la structure native de la protéine, d'où des interactions protéine-

protéine à différents degrés (Jeyarajah et Allen, 1994). Barbut et Foegeding (1993) ont rapporté que le traitement de préchauffage à la température de 70°C est nécessaire pour effectuer les changements structuraux suffisants afin que la protéine soit réceptive aux ions Ca^{2+} et favorise la formation de gels.

En doublant la concentration de calcium dans les mélanges à base de 2,5% PG, on observe une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des gels à partir de la dose de 96 kGy.

En comparant le cas sans agent plastifiant (0%_PG) avec le cas de 5% PG, on remarque une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des gels avec l'ajout de calcium et ce, pour toutes les doses d'irradiation. Toutefois, en se référant à la même concentration de PG (5%) dans l'intention de comparer les résultats des deux concentrations de calcium (0,125% et 0,250%), on constate une augmentation significative ($p \leq 0,05$) pour les doses 32 et 128 kGy.

En présence de TEG et en doublant la concentration de calcium (de 0,125% à 0,250%), on obtient une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des gels pour toutes les doses d'irradiation.

On peut donc conclure que le calcium combiné avec le TEG plutôt que le PG, a un effet plus étendu (quelle que soit la dose d'irradiation) sur la force de rupture des gels. Lin (1977) suggère que le rôle majeur des ions de calcium est de neutraliser les charges des groupes de sulfates de carragénine, ce qui élimine les forces répulsives et permet la formation d'hélices et de gels subséquents.

2.3- Force et déformation à la rupture et viscoélasticité des films

Les résultats obtenus de la force de rupture des films en absence d'agent plastifiant montrent que l'ajout de 0,125% de calcium augmente significativement ($p \leq 0,05$) cette force pour les doses de 8 et 96 kGy uniquement. Pour les autres doses d'irradiation, bien qu'il y ait une augmentation de la force de rupture des films, celle-ci n'est pas significative ($p > 0,05$). Cependant, à 0,250% de calcium, on observe une diminution significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des films pour les doses 0, 8 et 16 kGy. Ces résultats montrent que la concentration optimale de calcium pour la force de rupture des films est observée à 0,125% Ca et à la dose de 8kGy.

En ajoutant le calcium (0,125% et 0,250%) à une solution contenant 2,5%_PG, on note une diminution de la force de rupture des films pour toutes les doses d'irradiation.

En présence de 5% PG, l'ajout de calcium diminue significativement ($p \leq 0,05$) la force de rupture des films pour toutes les doses d'irradiation, par comparaison avec le cas sans agent plastifiant (0% PG). Toutefois, en se référant à la même concentration de PG (5%) pour comparer les résultats des trois concentrations de calcium (0 ; 0,125% et 0,250%), on constate une diminution qui est particulièrement significative ($p \leq 0,05$) pour les doses 0 kGy à 0,250% Ca, et 96 kGy à 0,125% Ca.

En ce qui concerne la déformation à la rupture, l'ajout de calcium a tendance à l'augmenter. Selon l'analyse statistique, cette tendance est d'autant plus marquée et significative ($p \leq 0,05$) en présence d'agents plastifiants. Une concentration de 0,125% de calcium génère une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du pouvoir déformant à la dose de 8 kGy en présence de 2,5% PG ou de 2,5% TEG ; et à la dose de 8 et 16 kGy en présence de 5% PG. Cependant, à la concentration de 0,250% calcium, l'augmentation du pouvoir déformant n'est significative ($p \leq 0,05$) pour toutes les doses d'irradiation qu'en présence de 2,5% TEG (en comparaison avec le cas sans calcium).

Quant à la viscoélasticité des films, l'ajout de calcium à une solution de 2,5% PG n'a pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur la viscoélasticité en ce qui

concerne les doses d'irradiation, à l'exception des doses 8 et 96 kGy où on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'élasticité des films avec l'ajout de 0,125% de calcium.

Selon l'analyse statistique, l'ajout de 0,125% de calcium a un effet favorable sur la viscoélasticité des films à 5% PG pour toutes les doses d'irradiation. Cet effet est particulièrement significatif pour les doses : 8, 16, 96 et 128 kGy. En outre, l'ajout de 0,250% Ca l'améliore significativement ($p \leq 0,05$) pour les deux doses de 96 et 128 kGy uniquement.

L'ajout de 0,125% de calcium à une solution de 2,5% TEG n'a pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur la viscoélasticité pour toutes les doses d'irradiation, à l'exception de la dose 64 kGy où on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de l'élasticité des films. Cependant, avec 5% TEG, cet ajout augmente significativement ($p \leq 0,05$) l'élasticité des films jusqu'à concurrence de 32 kGy.

Il ressort que l'ajout de calcium selon les conditions expérimentales utilisées a révélé un effet modeste sur la résistance et l'élasticité des films. Par ailleurs, son utilisation pourrait avoir d'autres effets aussi recherchés que la perméabilité à l'eau. L'étude menée par Krochta et al. (1988) a conclu que le trempage des films de caséine dans une solution aqueuse de chlorure de calcium

(0,75 M) suivie d'un trempage dans l'eau distillée a diminué la perméabilité à l'eau et la solubilité des films. D'autre part, Gennadios et al. (1993) ont montré qu'un film de gluten de blé trempé dans une solution aqueuse de chlorure de calcium (1M) durant 20 secondes a démontré qu'une force de rupture significativement plus élevée ($p \leq 0,05$) et une perméabilité à la vapeur d'eau plus faible qu'un film de gluten non trempé.

3- EFFETS DES AGENTS PLASTIFIANTS

3.1- Le taux de formation de bityrosine

L'ajout de l'agent plastifiant favorise significativement ($p \leq 0,05$) la formation de bityrosine pour les doses 16 et 32 kGy. En effet, cette augmentation peut être expliquée par le fait que la bityrosine est formée à partir de molécules de tyrosine qui sont des acides aminés aromatiques, donc hydrophobes, situées principalement en surface. Comme l'agent plastifiant est exclu des domaines hydrophobes de la protéine, ces derniers sont plus disponibles en comparaison au cas d'absence d'agents plastifiants. Ils sont alors aptes à réagir suite à leur exposition aux rayons Gamma.

Cependant, en doublant la concentration en agent plastifiant, le taux de formation de bityrosine n'augmente pas significativement ($p > 0,05$). En

comparant les deux agents plastifiants en absence de calcium, on ne note aucune différence significative sur le taux de formation de bityrosine. Par contre, en présence de 0,250% Calcium, le 2,5% TEG favorise la formation de bityrosine.

3.2- La force de rupture des gels

L'ajout d'agent plastifiant diminue la force de rupture des gels en présence de 0,125% de calcium dans tous les cas à l'exception des gels à base de 2,5% PG irradiés à la dose de 96 et 128 kGy. Par contre, en présence de 0,250% de calcium on note une augmentation de la force de rupture des gels en présence de 2,5% PG et ce, quelle que soit la dose d'irradiation.

En comparant les deux agents plastifiants, c'est le PG à 2,5% et à la dose d'irradiation de 96 kGy qui donne la meilleure force de rupture des gels.

3.3- Force et déformation à la rupture et viscoélasticité des films

Les résultats de la force de rupture des films montrent qu'en absence de calcium et en présence de 2,5% PG, on note une diminution significative ($p \leq 0,05$) jusqu'à concurrence de la dose 64 kGy. Au delà, on note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la force de rupture des films. En effet, l'agent plastifiant

diminue les forces intermoléculaires tout au long de la molécule protéique (Herald et al., 1995).

En comparant les deux agents plastifiants utilisés, le TEG donne la plus faible force de rupture des films mais la meilleure viscoélasticité. Par contre, le PG donne la meilleure force de rupture des films. Ceci peut être attribué à la taille relative la molécule de TEG et de PG. Théoriquement, l'agent plastifiant et le polymère forment un composé avec l'aide des forces covalentes secondaires. La molécule de TEG étant plus large que celle de PG, peut créer une structure plus ouverte en présence des macromolécules de protéine (Genevois et al., 1993). D'autre part, les groupes polaires de l'agent plastifiant développent des ponts de type polymère_plastifiant remplaçant ainsi les ponts de type polymère_polymère (Arnold, 1968).

En ce qui a trait à la déformation à la rupture, l'ajout d'agents plastifiants a un effet favorable sur le pouvoir déformant. En effet, l'ajout de 2,5% PG augmente significativement ($p \leq 0,05$) la déformation à la rupture jusqu'à la dose de 32 kGy (dans les 3 cas de concentrations de calcium). Par contre, l'ajout de TEG ou de 5% PG augmente significativement ($p \leq 0,05$) le pouvoir déformant,

pour toutes les doses d'irradiation. À même concentration, c'est le TEG qui donne de meilleurs résultats pour la déformation à la rupture.

Quant à la viscoélasticité des films, il est à rappeler qu'en absence d'agents plastifiants la viscoélasticité des films n'a pas pu être déterminée, car les films ne peuvent pas supporter une déformation de 3 mm pendant une minute.

Les agents plastifiants sont ajoutés pour les films afin d'obtenir une structure plus souple et d'augmenter leur flexibilité. Ils agissent en diminuant l'accumulation des forces intermoléculaires tout au long de la chaîne du polymère. En général, en augmentant la concentration de l'agent plastifiant, on diminue la force de rupture des films ; mais, en contre partie, on améliore la viscoélasticité (Genevois et al, 1993). Enfin, il est à rappeler qu'à la concentration de 5%, les films sont plus collants et difficiles à manipuler.

4- DISCUSSION DE LA BIODÉGRADABILITÉ :

4.1- Le dénombrement bactérien

La diminution de la croissance bactérienne durant les quatre premiers jours de fermentation est reliée à la phase d'adaptation que la souche *Pseudomonas aeruginosa* a dû subir après le transfert d'un milieu de culture riche

(le Nutrient Broth) à un milieu salin où le film était la seule source de carbone. En outre, seules les bactéries les plus résistantes pourront survivre la période nécessaire pour solubiliser les films par les enzymes exogènes avant de pouvoir se nourrir.

Après cette phase d'adaptation, la vigoureuse croissance qui s'en est suivie ne peut être due qu'à la capacité des bactéries à consommer les films, unique source de carbone disponible dans le milieu. La croissance plus rapide observée dans le milieu contenant les films irradiés à 4 kGy suppose qu'ils sont plus faciles à l'attaque microbienne que ceux irradiés à 64 kGy. L'irradiation des solutions protéiques produit donc des films plus résistants à la dégradation. Avec l'augmentation de la population bactérienne, la source de carbone que constitue le film finit par devenir insuffisant entraînant une lente décroissance microbienne. Cette décroissance est plus rapide pour les films irradiés à 4 kGy.

En absence de films, la population bactérienne a pu supporter un manque de source de carbone pendant vingt-huit jours avant d'être disséminée. Cette longue période met en relief une des qualités appréciables de *Pseudomonas aeruginosa* que constitue sa résistance aux chocs. On présume que durant cette longue période de résistance dans un milieu si inhospitalier, les bactéries ont

d'abord puisé dans leurs réserves internes, puis même éventuellement trouvé nutriments dans leurs semblables mortes.

4.2- Le dosage de l'azote soluble

En absence de *Pseudomonas aeruginosa*, la libération d'azote par les deux types de films reste relativement minime avoisinant un pourcentage de 0,15%. Elle ne peut être due qu'à la solubilisation naturelle et progressive des films.

En présence de bactéries, après une période d'adaptation variant de 8 jours pour les films irradiés à 4 kGy à 16 jours pour les films irradiés à 64 kGy, le pourcentage d'azote libéré au cours du temps indique que les bactéries se sont attaquées plus vigoureusement aux films irradiés à 4 kGy. Elles ont pu le faire d'autant plus rapidement et efficacement que le film est faiblement irradié. Les bactéries doivent hydrolyser le polymère en petites unités afin de pouvoir digérer la source de nutriments. Le processus est plus rapide à 4 kGy et plus lent à 64 kGy confirmant ainsi l'efficacité de l'irradiation à former des polymères réticulés, plus difficilement attaquant par les bactéries. Ceci est souhaitable vu l'objectif d'améliorer la stabilité (l'inertie) de ce film biodégradable. Des travaux

préliminaires par Filtration sur Gel Permeation Chromatographie ont également démontré que le poids moléculaire du polymère avait augmenté d'environ 10 fois par irradiation. Des travaux subséquents sont toutefois à réaliser afin de déterminer ce poids moléculaire avec plus de précision.

4.3- Les liens peptidiques

La densité optique évalue le nombre de liens peptidiques solubilisés. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par le dosage de l'azote soluble. On remarque qu'en absence de bactéries, elle augmente régulièrement surtout durant les 20 premiers jours, à une vitesse de 0,010 par jour pour le film à 4 kGy et de 0,024 par jour pour le film à 64 kGy. Ceci indique qu'il y a plus de peptides libérés par solubilisation avec les films irradiés à 64 kGy qu'avec ceux irradiés à 4 kGy. Ceci suppose qu'il y aurait une plus grande quantité de liens peptidiques solubles à 64 kGy. Il est possible qu'à 4 kGy, une plus grande quantité de molécules plus simples est solubilisée.

À 4 kGy les liens sont stables pendant la fermentation ce qui montre que les peptides sont utilisables plus rapidement (utilisé à mesure laissant la quantité stable au cours de la fermentation). Par contre, à 64 kGy une plus grande quantité

de peptides est d'abord solubilisé et une période de 16 jours d'incubation est nécessaire avant que ces peptides soient utilisés par les bactéries.

L'écart de mesures entre les deux milieux, avec ou sans bactéries, représente essentiellement le nombre de ces liens qui sont libérés par les bactéries (figure 21). En calculant le pourcentage de liens peptidiques utilisés par les bactéries au jour 20 par exemple, on constate qu'il est de 35,69% pour les films à 4 kGy, alors qu'il est de 15,74% pour les films à 64 kGy. Ceci est révélateur de la facilité d'utilisation par les bactéries des films moins irradiés.

5- POURSUITE DE FUTURS TRAVAUX

Bien que la production de films protéiques par irradiation gamma soit démontrée en milieu expérimental, certaines vérifications restent à poursuivre, notamment la perméabilité aux gaz et à l'humidité pour chaque recette sélectionnée selon l'usage visé.

Si le premier volet de la présente recherche s'est penché sur la pertinence d'utilisation de certains composants (PG, TEG, Ca) afin d'optimiser les propriétés physico-chimiques des films, il est souhaitable d'essayer d'autres agents plastifiants comme le carboxyméthylcellulose, le sorbitol, le mannitol et le polyéthylène glycol.

Dans la perspective d'un contrôle de qualité de formation des films, une meilleure compréhension du phénomène physico-chimique de la réticulation par irradiation serait utile. En mesurant l'énergie interne et externe des protéines, la méthode de Differential Scanning Calorimetry (DSC) nous permettrait de mieux suivre l'évolution des liens covalents. D'autre part, une étude en spectroscopie d'infrarouge permettrait de mettre en évidence les groupements fonctionnels impliqués ou modifiés lors de l'irradiation.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats démontre que la production de films à base de caséinate de calcium en utilisant l'irradiation gamma est une alternative tout à fait plausible. En effet, nous avons démontré l'effet bénéfique de l'irradiation sur la réticulation des protéines laitières. Quant à la résistance des films, les meilleurs résultats suggèrent une irradiation dans une plage de 32 à 96 kGy, selon la composition et l'usage envisagé.

D'autre part, l'ajout d'un agent plastifiant s'est avéré essentiel pour augmenter l'élasticité, le pouvoir déformant et la maniabilité des films bien que la force de rupture soit diminuée. Les meilleures améliorations ont été obtenues avec les concentrations de 2,5% PG et 5% TEG. Si le deuxième cas donne les meilleurs pouvoir déformant et élasticité, il est cependant collant. La préférence sera donc accordée selon l'utilisation.

En optant pour le critère de la résistance des films, notre choix a porté sur une composition de 2,5% PG sans calcium avec une irradiation à 64 kGy. La biodégradabilité complète de deux films irradiés à 4 et à 64 kGy par *Pseudomonas aeruginosa* a été vérifiée. Elle était plus rapide avec le film faiblement irradié.

En définitive, les films de caséinates cumulent les avantages précités des propriétés mécaniques, en plus de ce que nous avons déjà mentionné : leur comestibilité, leur aspect transparent et inodore. Avec un substrat de base abondant, économique et facilement accessible, nous avons les meilleures chances pour d'innombrables applications qui n'attendent qu'une synergie de recherche appliquée dans l'industrie.

REMERCIEMENTS

L'aboutissement du présent projet de recherche a été rendu possible grâce à la participation directe et indirecte de nombreux intéressés. Je voudrais les remercier tous très sincèrement. Ils se reconnaîtront sans aucun doute.

Je tiens à souligner particulièrement la contribution de certaines personnes qui m'ont accompagnée tout au long de ce projet, notamment :

♥ Ma directrice de recherche, Prof. Monique Lacroix, pour sa disponibilité, ses conseils et son encadrement ainsi que Michèle Jobin, agente de recherche, pour son assistance lors de l'utilisation des appareils, sans oublier Monsieur Guy Maxween pour sa disponibilité au laboratoire.

♥ L'équipe du centre d'irradiation du Canada pour leur implication.

♥ Louise Deschênes du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments, Agriculture Canada, pour ses conseils et suggestions.

♥ Marie Désy du service des statistiques pour sa bonne disponibilité en toute bonne humeur.

♥ Diane Sauvé de la bibliothèque de l'Institut pour sa bonne coopération.

♥ Ma famille, en particulier mon mari pour son soutien permanent et ses précieux conseils ainsi que mes fils Aymen et Yunes pour leurs sacrifices consentis, sans oublier mes ami(e)s, mes collègues et mon entourage pour l'encouragement.

Merci à tous.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, D.M. ; Barach, J.T. et Speck, M.L. 1976, Effect of psychotrophicobacteria from milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment, *J. Dairy Sci.*, Vol. 59, 5, 823-817.
- 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 psychotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescence* strain AR-11, *Biochem. Et Biophy Acta*, 485, 424-433.
- Alikonis, J.J. 1979, *Candy technology*, Westport, CT : AVI Publishing company.
- Anker, C.A.; Foster, G.A. et Loader, M.A. 1972, April 4, U.S. patent 3, 653, 925.
- Arnold, L.K. 1968, *Introduction to plastics*, Ames, IA : Iowa state University Press, 500.
- Avena-Bustillos, R.J. et Krochta, J.M. 1993, Water vapour permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content, *J. Food Sci.*, Vol. 58, 4, 904-907.
- Barbut, S. 1994, Protein gel ultrastructure and functionality, dans : *Protein functionality in food systems*, ed. By Navam Hettiarachchy et Gregory Ziegler, Marcel Dekker, N.Y., 383-434.
- Barbut, S. et Foegeding, E.A 1993, Ca²⁺-induced gelation of pre-heated whey protein isolate, *J. Food Sci.*, 58, 867-871.
- Bloomfield, V.A. et Morr, C.V. 1973, *J. Neth. Milk Dairy*, 27, 103-120.
- Brault, D. 1994, Formation d'un film biodégradable de caséinate de calcium ou de sodium par irradiation gamma, Mémoire présenté à l'IAF comme exigence partielle de la maîtrise en microbiologie appliquée, Université du Quebec, 1-133.
- Brunner, J.R. 1977. Milk proteins, In *food proteins*, Whitaket, J.R. et Tanneenbaum, S.R., eds., Westport, CT : AVI Publishing, Inc., 175-208.

- Bull, H.B. et Breese, K. 1968, Protein hydration, 1. Binding sites, Arch. Biochem. Biophys., 128, 488-496.
- Cain, R.B. 1992, Microbial degradation of synthetic polymers, Dans : Microbial control of pollution, (Eds), Fry, J.C., Gadd, G.M., Herbert, R.A., Jones, C.W. et Watson-Craik, I.A., Society of General Microbiology. 293-338.
- Callely, A.G. ; Jones, A.M. et Huhges, D.E. 1978, Microbial degradation of styrene copolymers, dans : Degradation of polymers and plastics, London, Plastics Institute, 13-21.
- Clark, A.H. 1992, Gels and gelling, dans : Physical Chemistry of Foods, (Eds), H.G. Schwartzberg; R.W. Hartel et Marcel. Dekker, N.Y., 263-305.
- Code of Federal Regulations (CFR) 1980, Title 21 : Foods and Drugs, Parts 170-199, Washington, DC : GPO.
- Cosler, H.B., May 7 1957, U.S. patent 2, 791, 509.
- Cosler, H.B. 1959, A new edible, nutritive, protective glaze for confections and nuts, Manuf. Confect., Vol.39, 5, 21-23.
- Dalgleish, D.G. 1989, Milk proteins-chemistry and physics, in food proteins, Kinsella,J.E. et Soucie, W.G., eds., Champagne, IL : American oil chemists society, 155-178.
- Damodaran, S. et Kinsella, J.E. 1982, Effects on ions on protein confirmation and functionality , Dans : Food protein deterioration mechanisms and functionality, American Chemical Society Symposium Series 206, ACS, N.Y., 327.
- 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.
- Doi, E. 1993, Gels and gelling of globular proteins, *Trends Food Sci.*, 4, 1-5
- Dziedzic, J.D. 1991, Special Report : a focus on gums, *Food Tech.*, 45,3, 116-132.
- Esen, A. 1987, A proposed Nomenclature for the alcohol-soluble proteins (Zeins) of Maize (*Zea mays* L.), *J. cereal Sci.*, 5, 117-125
- Ferradini, C. et Pucheault, J. 1983, Radiolyse de solution diluée, , dans : Biologie de l'action des rayonnements ionisants, Masson, Paris, (Ed), 31-61.
- Folk, J. E. 1980, Transglutaminase, *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 517-531.
- 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 albumine in polyhydric alcohol-water mixtures, *J. Biochem.*, 90, 39-50.
- Gekko, K. et Timasheff, N. 1981, Mechanism of protein stabilisation by glycerol : Preferential hydration in glycerol-water mixtures, *J. Biochemistry*, 20, 4667-4676.
- Gennadios, A., McHugh, T., Weller, C. et Krochta, J. 1994, Edible coating and films based on proteins, dans : Edible coating and films to improve food quality, Ed. By Elisabeth Baldwin et al., Technomic Publishing co. Inc. Lancaster, USA, 201-277.

- Gennadios, A. ; Weller, C.L. et Testin, R.F. 1993, Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films, *Cereal Chem.* Vol. 70, 4, 426-429.
- Gontard, N. 1994, Films comestibles et biodégradables : Étude des propriétés filmogènes du gluten de blé, *C. R. Acad. Agric. Fr.*, 1994, 80, 4, 109-117.
- 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.
- Gould, J. M. : Gordon, G. H. ; Dexter, L. B. et Swanson, C. L. 1990, ACS Symposium Series 433, American Chemical Society, Washington D.C., 65
- Green, D.R. ; Wong, C.S. et Cretmey, W.J. 1974, Quantitative Tare and plastic waste distribution M.S. in the pacific ocean, *Nature*, 247, 30-32.
- Gronlund, A.F. et Campbell, J.J. 1965, Enzymatic degradation of ribosomes during endogenous respiration of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bact.* 90, 1.
- Guilbert, S. ; Giannakopoulos, A. et Cheftel, J.C. 1985, Diffusivity of sorbic acid in food gels at high and intermediate water activities. Dans : Properties of water in foods in relation of quality and stability, (Ed), D. Simatos et J.L. Multon, 343-400.
- Guillet, J. E. ; Hubert, H. X. et Scott, J. 1992, Biodegradable polymers and plastics, dans : Studies of the biodegradation of synthetic plastics, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 55-70.
- Hagenmaier, R.D. et Shaw, P.E. 1990, Moisture permeability of edible films made with fatty acid and (hydroxypropyl) methylcellulose, *J. Agri. And food chem.*, 38, 1799.
- Hagenmaier, R.D. et Shaw, P.E. 1991, Permeability of shellac coating to gases and water vapour, *J. Agri. And food chem.*, Vol.39,5, 825.
- Harrington, W.F. 1966, Collagen, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology : Plastics, Resins, Rubbers, Fibers*, Vol. 4, Mark, H.F., Gaylord N.G. et Bikales, N.M. eds., New York, NY : Interscience Publishers, 1-16.

- Herald, T.J., Gnanasambandam, R., McGuire, B.H. et Hachmeister, K.A. 1995, Degradable wheat gluten films : preparation, properties and applications, *J. Food Sci.* Vol. 60, 5, 1147-1156.
- Ikura, K., Kometani, T., Yoshikawa, M., Sasaki, R. et Chiba, H. 1980, Crosslinking of casein components by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1567-1573.
- Jennes, R. 1988, Composition of milk, *Fundamentals of dairy chemistry*, Wong, N.P., Jennes, R., Keenny, M. et Marth, E.H., eds., New York, NY : Van Nostrand Reinhold, 1-38.
- Jeyarajah, S. et Allen, J.C. 1994, Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated β -lactoglobulin, *J. Agric. Food Chem.*, 42, 80-85.
- Johnson, R. 1987, An SPI overview of degradable plastics. Dans *Proceeding of Symposium on Degradable Plastics*, Washington DC : Society of the Plastics Industry, Inc., 6-12.
- Jones, H.W. et Whitmore, R.A. 1972, Septembre 26, U.S. patent 3, 694, 234.
- Kamper, S.L. et Fennema, O. 1984, Water vapor permeability of edible bilayer films, *J. Food Sci.*, Vol. 49, 1478-1481.
- Kamper, S.L. et Fennema, O. 1985, Use an edible film to maintain water vapor gradients in foods, *J. Food Sci.*, 50, 352.
- Kasarda, D.D., Bernardin, J.E. et Nimmo, C.C. 1976, Wheat proteins, In *Advances in cereals science and technology*, Vol. 1, Y. Pomeranz, ed., St. Paul, MN : American Association of Cereal Chemists, Inc., 158-236.
- Kester, J.J. et Fennema, O.R. 1986, Edible films and coatings : a review, *Food Technol.*, December, 47-59.
- Kester, J.J. et Fennema, O.R. 1989, The influence of polymorphic form on oxygen and water vapor transmission through lipid films, *J. Am. Oil Chem. Sci.*, Vol. 66, 8, 1147
- Kidney, A.J. 1970, April 7, U.S. patent 3, 505, 084.

- Kinsella, J.E. et Whitehead, D.M. 1989, Proteins in whey : chemical, physical and fonctional properties, *Adv. Food Nutr. Res.*, 33, 343-438.
- Klemchuk, P.P. 1990, Degradable plastics : a critical review, *Pol. Degra. Stab.*, 27, 183-202
- Kraybill, H. F. ; Linder, R. O. ; Read, M. S. ; Shaw, T. M. et Isaac, G. J. 1959, Effect of ionising radiation on the allergenicity of milk protein, *J. Dairy Sci.*, 42, 581-588.
- Krochta, J.M. 1991, Coatings for substrates including high moisture edible substrates, U.S. patent no : 5 019 403.
- Krochta, J.M. ; Hudson, J.S. ; Camirand' W. M. et Pavlath, A.E. 1988, Edible films for lightly processed fruits and vegetables, Paper 88-6523, American Society of Agricultural Engineers : St. Joseph, MI.
- Krumel, K.L. et Lindsay, T.A. 1976, Nonionic cellulose ethers, *Food Technol.*, Vol.30, 4, 36-43.
- Lanyi, B. et Bergan, T. 1978, Serogical characterization of *Pseudomonas aeruginosa*, dans : *Methods in microbiology*, Vol. 10, ed. Bergan, T. et Norris, J.R. Academic Press London, N.Y., San Francisco, 94-162.
- Lehrer, S.S. et Fasman, G.D. 1976, Ultraviolet irradiation effect in poly-L-tyrosine and model compounds, identification of bityrosine as a photoproduct, *Biochemistry*, Vol. 6, 3, 757-767.
- Lieberman, E.R. et Gilbert, S.G. 1973, Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture and plasticizer content, *J. poltmer sci.*, 41, 33-43.
- Lin, C.F. 1977, Interaction of sulphated polysaccharides with proteins, Dans : *Food Colloids*, H.D. Graham (Ed.), Avi Publishing Co., Westport, CT., 320.
- Lovegren, N.V. et Feuge, R.O. 1954, Permeability of acetostearin products to water vapor, *J. Agric. Food Chem.*, 2, 558.

- Mackelvie, R.M. ; Campbell, J.J. et Gronlund, A.F 1967, Absence of storage products in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* grown with excess carbon or nitrogen, *Can. J. .*, 14, 627.
- McDuffie, G. E ; Quin, R. G. et Litovitz, T. A. 1962, Dielectric properties of glycerol-water mixture, *J. Chem. Phys.*, 37, 239-242.
- McHugh, T.H., Aujard, J.F. et Krochta, M. 1994, Plasticized whey protein edible films : water vapor permeability properties, *J. food sci.*, 59.
- McHugh, T.H. et Krochta, J.M. 1994, Milk-protein-based edible films and coatings, *Food Technol.*, January, 97-103.
- McMahon, D.J. et Brown, R.J. 1984, composition, structure and integrity of casein micelles : a review, *J. Dairy Sci.*, 67, 499-523.
- 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.
- Mulvihill, D.M. et Kinsella, J.E. 1988, Gelation of β - lactoglobulin : Effect of sodium chloride and calcium chloride on the rheological and structural properties of gels, *J. Food Sci.*, 53, 231-236.
- Nelson, K.L. et Fennema, O.R. 1991, Methylcellulose films to prevent lipid migration in confectionery products, *J. Food Sci.*, Vol.56, 2, 504-509.
- Nisperos-Carriedo, M.O ; Shaw, P.E. et Baldwin, E.A. 1990, Changes in Volatil flavor components of pineapple orange juice as influenced by the application of lipid and composite coatings, *J. Agric. Food Chem.*, Vol.38, 6, 1382-1387.
- Okamoto, S. 1978, Factors affecting protein film formation, *Cereal Foods Word*, 23, 256.
- Park, H.J. 1991, Edible coating for fruits and vegetables : Determination of gas diffusivities, prediction of internal gas composition and effects of the coating on shelf life, PhD. dissertation, University of Georgia, 245.
- Peleg, M. 1979, Characterization of the stress relaxation curves of solid foods, *J. Food Sci.*, Vol. 44, 1, 277-281.

- Peyron, M. 1991, L'enrobage et les produits filmogènes : un nouveau mode d'emballage, *Viandes Prod. Carnés*, Vol. 12, 2, Mars-Avril, 41-46
- Piez, K.A., Bornstein, P. et Kang, A.H. 1968, The chemistry and biosynthesis of interchain crosslinks in collagen, *Symposium on fibrous proteins*, Crewther, W.G., ed., New York, NY : Plenum press, 205-211.
- Pommes, A.F. 1971, Zein, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology : Plastics, Resins, Rubbers, Fibers*, Vol. 15, Mark, H.F., Gaylord N.G. et Bikales, N.M. eds., New York, NY : Interscience Publishers, 125-132.
- Prütz, 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.
- Roediger, A. H. et Du Plessis, T. A. 1986, The gamma radiation modification of polymers at a contract radiation processing facility, *Radiat. Phys. Chem.*, Vol. 27, 6, 461-468.
- Sakamoto, H. ; Kumazawa, Y. et Motoki, M. 1994, Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions, *J. Food Sci.*, Vol. 59, 4, 866-871.
- Sharp, A.N. et Woodrow, M.N. 1972, *Biodegradation of materials*, Applied Science Publishers, London, 2, 233.
- Schmidt, D.G. 1982, Dans : *Developments in Dairy Chemistry* (Fox, P.F., ed.) *Appl. Sci. Publ.*, New York, Vol. 1, 61-86.
- Schmidt, R.H. ; Illingworth, B.L. ; Ahmed, E.M. et Richter, R.L. 1978, The effect of dialysis on heat-induced gelation of whey protein concentrates, *J. Food Process. Preserv.*, 2, 111-121.
- 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.

- Shewry, P.R. et Miflin, B.J. 1985, Seed Storage Proteins of Economically Important Cereals, dans : *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 7, (eds) Y. Pomeranz, St. Paul, MN : American Association of Cereal Chemists, Inc., 1-83.
- 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.
- Signorino, C.A. 1969, Non-candy coating enhance products in many ways, *Candy industry*, 133, 9, 5-24.
- Simic, 1983, in : *Preservation of food by ionising radiation*, ed. by E.S. Josephson et M.S. Peterson, Vol. II, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1-73.
- Singh, A. et Singh, H. 1982, Time-scale and nature of radiation-biological damage : approaches to radiation protection and post-irradiation therapy, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 39, 69-107.
- 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.
- Stokhausen, K. ; Bogel, K.W. et Weise, H.P. 1978, *Atomkerenergie*, 31, 184.
- Stokhausen, K.; Bogel, K.W.; Weise, H.P. et Lebensm, Z. 1988, *Forsch.*, 167, 256.
- Stuchell, Y. M. et Krochta, J. M. 1994, Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films, *J. of food Sci.*, 59, 6, 1332-1337.
- Torres, J.A. et Karel, M. 1985, Microbial stabilisation of intermediate moisture food surface III. Effects of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog, *J. Food Prod. Pre.*, 9, 107-119.

- 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.
- Vuillemard, J.C., Gauthier, S. et Paquin, P. 1989, Les ingrédients à base de protéines laitières : obtention, propriétés et utilisations, Lait, 69, 323-351.
- Zabik, M.E. et Dawson, L.E. 1963, The acceptability of cooked poultry protected by an edible acetylated monoglyceride coating during fresh and frozen storage. Food Technol., 17, 87.
- Wall, J.S. et Beckwith, A. C. 1969, Relationship between structure and rheological properties of gluten proteins. Cereal Sci. Today, 14-16.
- Wall, J.S. et Paulis, J.W. 1978, Corn and sorghum grain proteins, In Advances in cereal science and technology, Vol. 2, Y. Pomeranz, ed., St Paul, MN : American Association of Cereal Chemists, Inc., 135-219.
- Walsh, J.H. 1972, The plastic disposal problem, Biologist, 19, 141-148.
- Wolf, I.A. ; Davis, H.A. ; Cluskey, J.E. ; Gundrum, L.J. et Rist, C.E. 1951, Preparation of films from amylose, Ind. Chem. Eng., 915-919.
- Wunderlich, B. 1981, Thermal characterization of polymeric materials, Turi, E.A. (Ed), Academic Press, N.Y., 92-234.
- 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.