

---

# Estimation de la biodégradabilité d'un matériau d'emballage alimentaire à base de farine de maïs par voie enzymatique

**Fouzia Jbilou, Sophie Galland & Pascal Degraeve**

*IUTA – Université Claude Bernard Lyon 1- site de Bourg en Bresse  
Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire, EA n°3733  
Département de Génie Biologique  
Technopole Alimentec, Rue H. de Boissieu, 01060 Bourg en Bresse Cedex 09, France*

[fouzia.jbilou@iut.univ-lyon1.fr](mailto:fouzia.jbilou@iut.univ-lyon1.fr); [degraeve@iutbourg.univ-lyon1.fr](mailto:degraeve@iutbourg.univ-lyon1.fr);  
[sophie.galland@iut.univ-lyon1.fr](mailto:sophie.galland@iut.univ-lyon1.fr)

**Sections de rattachement : 62 & 64  
Secteur : Secondaire**

*RÉSUMÉ. La biodégradabilité de matériaux rigides à base de farine de maïs a été évaluée selon deux approches. La première de ces approches a consisté à soumettre ces matériaux à l'action d'enzymes amylolytiques ( $\alpha$ -amylase et amyloglucosidase) et cellulolytiques (hémicellulase et  $\beta$ -glucanase). L'hydrolyse des polymères de glucose constitutifs de la farine a été suivie par une méthode colorimétrique de dosage des sucres réducteurs. Cette méthodologie a permis de mettre en évidence que les traitements thermomécaniques (extrusion puis injection) appliqués à la farine de maïs facilitaient l'action des enzymes (en diminuant la proportion de grains d'amidon à l'état cristallin natif). Le mouillage préalable de ces matériaux présentant un caractère hygroscopique n'a augmenté que la vitesse initiale d'hydrolyse des matériaux et de façon limitée. Les dimensions des matériaux conditionnent leur cinétique d'hydrolyse de façon dépendante de l'aire spécifique. L'objectif à terme est d'évaluer la corrélation entre les cinétiques de biodégradation par voie enzymatique et microbienne (biodégradation aérobie ou anaérobie en milieu liquide ou compostage) de matériaux de différentes géométries élaborés avec différents couples « formulation- traitement thermomécanique » : ceci permettrait de juger de la pertinence des méthodes enzymatiques comme méthodes rapides pour disposer d'une première estimation des cinétiques de biodégradation correspondantes. En effet, à titre d'illustration, l'hydrolyse enzymatique du même matériau broyé avec une aire spécifique excédant à  $30 \text{ mm}^2$  est obtenue en 28 h contre 33 jours pour un test de biodégradation aérobie en respiromètre fermé pour déterminer sa demande biologique en oxygène (DBO).*

*MOTS-CLÉS : biodégradation, amidon, microorganismes, enzymes.*

## 1. Introduction

L'utilisation des emballages plastiques devient de plus en plus réglementée et est même condamnée à plus ou moins long terme dans certains domaines. La loi d'orientation votée en 2006 prévoit ainsi l'interdiction, dès 2010, de l'utilisation en France de sacs de caisse à usage unique en plastique non biodégradable. La mise au point de matériaux biodégradables fabriqués à base de ressources renouvelables apparaît donc comme une priorité majeure qui offre, d'une part, une alternative aux polymères synthétiques issus de la pétrochimie et d'autre part un nouveau débouché potentiel de valorisation non alimentaire de matières premières agricoles. Dans ce contexte il est devenu indispensable de mettre en place au laboratoire des méthodes pour l'évaluation de la biodégradabilité des matériaux d'emballages à base d'agro-ressources.

Le présent travail s'intéresse dans un premier temps à la compréhension des facteurs limitant l'attaque enzymatique de matériaux à base de farine de maïs. La farine de maïs est composée de 80 % d'amidon, 11 % de protéines (la zéine est la protéine majoritaire de l'endosperme de maïs (Agros P et al., 1982)) et de 9 % de cellulose. L'amidon de maïs est constitué de 20 à 30 % d'amylose (enchaînement linéaire de molécules de glucose associées par des liaisons  $\alpha$  (1-4)) et de 70 à 80 % d'amylopectine (polymère de molécules de glucose ramifiées grâce à des liaisons  $\alpha$  (1-6)) (M. Gaspar et al., 2005). La cellulose est aussi un polymère composé d'un enchaînement de molécules de glucose liées grâce à des liaisons  $\beta$  (1-4). De ce fait, de l' $\alpha$ -amylase, de l'amyloglucosidase et des hémicellulases et des  $\beta$ -glucanases fongiques hydrolysant les liaisons de type  $\alpha$  (1-4),  $\alpha$  (1-6),  $\beta$  (1-3) et (1-4) entre molécules de glucose ont été employées. Leur action hydrolytique a été évaluée en suivant la libération de sucres réducteurs par un dosage colorimétrique (avec de l'acide dinitrosalicylique (DNS)).

Des essais d'hydrolyse enzymatique de la farine de maïs et du matériau extrudé ont tout d'abord été conduits pour apprécier l'impact des traitements thermomécaniques, puis les effets d'un mouillage préalable de ces matériaux hygroscopiques, de leur géométrie sur la cinétique de leur hydrolyse enzymatique ont été évalués. Enfin, un premier essai de biodégradation aérobie en milieu liquide en présence de boues de station d'épuration a été conduit pour illustrer la durée d'un tel test. A terme, il est envisagé d'évaluer le degré de corrélation entre les cinétiques de dégradation par voies microbienne (aérobie ou anaérobie en milieu liquide, compostage) et enzymatique, pour apprécier la pertinence de tests enzymatiques en tant que méthode rapide de première estimation de la cinétique de biodégradation de matériaux.

## **2. Matériels et Méthodes**

### **2.1. Hydrolyse enzymatique**

#### *2.1.1. Enzymes utilisées pour l'hydrolyse*

Les enzymes utilisées au cours de ce travail sont une  $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* (Sigma, A6211) et une amyloglucosidase d'*Aspergillus niger* (Sigma A7420) ainsi que des préparations enzymatiques d' $\alpha$ -amylase et d'amyloglucosidase (Hazyme® DCL) et d'hémicellulase et de  $\beta$ -glucanase (Filtrase® BRL) fournies par la société DSM Food Specialties (Seclin, France). Une unité d' $\alpha$ -amylase (U) et une unité d'amyloglucosidase (U) sont définies respectivement comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1mg de maltose ou de glucose à partir d'amidon en 3 minutes.

#### *2.1.2. Farine de maïs et matériaux à base de farine de maïs*

La farine de maïs (fournie par la société Cérégrain (Bourg-en-Bresse, France)) qui est le composant majoritaire des matériaux rigides élaborés a été soumise à une hydrolyse enzymatique pour évaluer l'effet du traitement thermomécanique d'extrusion appliqué pour l'obtention de matériaux rigides sur sa cinétique d'hydrolyse. Les matériaux obtenus sont des éprouvettes de 4mm de diamètre et 15 mm de hauteur (aire spécifique :  $1,13 \text{ mm}^{-1}$  en considérant le matériau comme lisse) obtenues par extrusion d'un mélange de 92% de farine de maïs et 8% de glycérol.

#### *2.1.3. Traitement des échantillons*

Avant hydrolyse enzymatique, certains des matériaux ont été broyés avec un broyeur Polymix PX-MFC 90D réglé à une vitesse de 5000 tours par minute pendant 30 s. Les broyats ont ensuite été tamisés avec des tamis à différentes tailles afin d'étudier l'influence de leur granulométrie sur la vitesse d'hydrolyse (Q.Wu et al., 2007).

#### *2.1.3. Conditions de mise en œuvre de l'hydrolyse enzymatique*

Des suspensions à 30g/L de matériau broyé ont été préparées dans du tampon acétate de sodium à 0,05 mol/L (pH 5,5), de l'azide de sodium à 0,02 % pour éviter tout développement microbien et 50 ppm de chlorure de calcium pour stabiliser les enzymes d'origine fongique (Coma V et al., 1995). Les enzymes ont ensuite été ajoutées à la concentration finale désirée (5 ou 50 U/mL). Les tubes contenant le milieu réactionnel ont été incubés dans une enceinte thermostatée à 50°C (température optimale pour les enzymes utilisées) sous agitation rotative (6 tours par minutes).

#### *2.1.4. Suivi de la libération de sucres réducteurs au cours de l'hydrolyse*

L'hydrolyse enzymatique de la farine de maïs et du matériau correspondant a été suivie en mesurant la libération de sucres réducteurs (comme le maltose, le maltotriose et le glucose) dans le milieu réactionnel. Leur dosage a été effectué en employant la méthode colorimétrique de Miller (1959) (DNS). Des prélèvements de 400 $\mu$ L ont été

réalisés à intervalles de temps réguliers, suite auxquels 4 $\mu$ L d'HCl (0,01M) ont été immédiatement ajoutés pour stopper l'action de l'enzyme. Après 10 min de centrifugation à 10000 g et 4°C, 600 $\mu$ L de solution de DNS ont été ajoutés au surnageant avant chauffage à 100°C pendant 15 min. Après refroidissement, une lecture de l'absorbance à 640nm a été réalisée grâce à un spectrophotomètre (JENWAY 6300).

## **2.2. *Respiromètre***

Cette méthode (la norme ISO 14851) mesure la Demande Biologique en Oxygène (DBO) nécessaire pour la dégradation d'un matériau par des microorganismes dans des respiromètres fermés. Elle nécessite que le matériau soit la seule source de carbone dans un milieu d'essai composé de 10mL de la solution A (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,5g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21,75g/L, NH<sub>4</sub>Cl 0,5g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 33,4g/L) et de 1mL des solutions B (MgSO<sub>4</sub> 22,5g/L), C (CaCl<sub>2</sub> 6,1g/L) et D (FeCl<sub>3</sub> 0.25g/L) pour un litre de milieu d'essai.

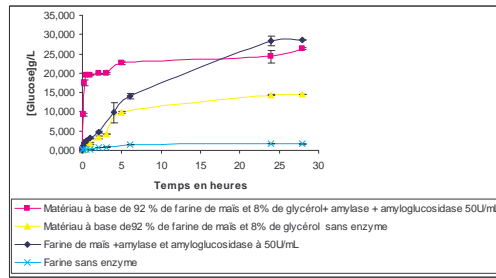
Dans chaque respiromètre une quantité de 0,1g de boue activée de la station d'épuration de la ville de Bourg en Bresse a été ajoutée en tant qu'inoculum. Une masse de 0,15g de matériau (broyé et tamisé à 0,2 mm) a été introduite dans les milieux d'essai sauf dans le témoin (pour évaluer la respiration endogène des microorganismes). Durant toute la période d'essai, les respiromètres ont été placés sous agitation à 23°C. Une aération d'environ 5 minutes des respiromètres a été réalisée pour introduire de l'oxygène dans les milieux d'essais.

## **3. Résultats et discussion**

### **3.1. *Effet d'enzymes amylo- et cellulo-lytiques sur l'hydrolyse de la farine de maïs***

Pour mieux comprendre les facteurs influençant la biodégradabilité d'un matériau à base de farine de maïs par voie enzymatique, un préalable a consisté à évaluer l'action de chacune des enzymes amylo- et cellulo-lytiques seules ou en mélange sur de la farine de maïs. Les résultats obtenus mettent en évidence que ces enzymes agissent en synergie et que seule l'association de l' $\alpha$ -amylase, l'amyloglucosidase et l'hémicellulase permet d'obtenir une hydrolyse quasi-totale de la farine après 6h. Kong et al. (2003) ont observé que l'hydrolyse de granules natifs d'amidon de maïs par l' $\alpha$ -amylase est plus élevée que celle de granules d'amidon de pomme de terre et de riz et justifient cette observation par l'existence de pores au niveau de la surface des grains d'amidon de maïs (Helbert et al., 1996) ce qui faciliterait l'attaque de ce substrat par l' $\alpha$  amylase.

### **3.2. *Effet d'un traitement thermomécanique sur la solubilisation et l'hydrolyse enzymatique d'un matériau extrudé à base de farine de maïs.***

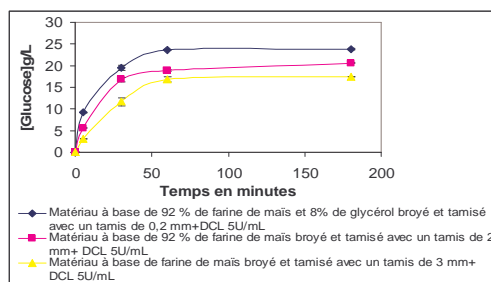


**Figure 1 : Evolution de la concentration en sucres réducteurs (en g équivalent glucose/L) au cours de la solubilisation ou de l'hydrolyse enzymatique (à 50°C pH 5,5) de suspensions à 30g/L de farine de maïs ou de matériau à base de farine de maïs broyé (tamisé à 0,2 mm)**

La figure 1 révèle que le traitement thermomécanique d'extrusion a un effet marqué sur le comportement de la farine de maïs dans un milieu liquide. Avant extrusion la farine est insoluble dans le tampon acétate de sodium, alors qu'après extrusion, on observe une augmentation importante de sa solubilité. Le stress mécanique (Wu et al., 2004) permet de réduire la taille des particules, de changer la morphologie des granules et de diminuer la cristallinité de l'amidon ce qui facilite à la fois l'érosion mécanique et l'hydrolyse enzymatique dont la vitesse initiale est multipliée par un facteur de 8.

### 3.3. Effet de la taille des matériaux sur leur vitesse d'hydrolyse enzymatique

L'aire spécifique des matériaux peut influencer de façon déterminante leur vitesse d'hydrolyse enzymatique. Pour évaluer l'effet de ce paramètre, des hydrolyses enzymatiques du matériau à base de farine de maïs ont été effectuées sur des suspensions de particules de matériaux plus ou moins fines obtenues par tamisage (sur des tamis de 3, 2 ou 0,2 mm de diamètre) après broyage. La figure 2 montre que la vitesse d'hydrolyse augmente avec la diminution de la taille des particules. Cela est lié à l'augmentation correspondante de la surface des zones de contact avec les enzymes comme le met en évidence le tableau 1 : la vitesse initiale de l'hydrolyse est multipliée par un facteur 3 en augmentant l'aire spécifique de plus de 2 à plus de 30 mm<sup>-1</sup> et un facteur 1,64 en passant de plus de 3 à plus de 30 mm<sup>-1</sup> (tableau1).



**Figure 2 : Evolution de la concentration en sucres réducteurs (en g équivalent glucose /L) au cours de l'hydrolyse à 50°C et pH 5.5 d'une suspension à 30g/L du matériau à base de 92 % de farine de maïs et 8 % de glycérol broyé (diamètre des particules < 0,2 mm, 2mm et 3mm) par une préparation enzymatique commerciale Hazyme® DCL (α-amyglase et amyloglucosidase à 5 U/mL).**

**Tableau 1 : Variation de la vitesse d'hydrolyse par des enzymes amylolytiques en fonction de l'aire spécifique du matériau à base de farine de maïs**

Aire spécifique du matériau (en mm <sup>-1</sup> )	Vitesse initiale (en g de glucose libéré/min /L)	Concentration en sucres réducteurs (en g équivalent glucose/L) après 6 h d'hydrolyse d'une suspension à 30 g de matériau /L
>30 (Ø <0,2mm)	1,81	23,83
>3 (Ø <2 mm)	1,10	20,63
>2 (Ø <3mm)	0,62	17,48

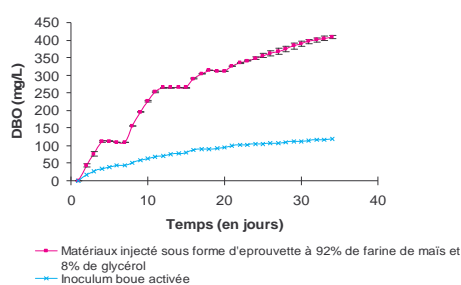
### 3.4. Influence du mouillage préalable du matériau sur l'hydrolyse enzymatique

Avant d'ajouter l' $\alpha$ -amylase, les suspensions à 30g/L de matériau broyé puis tamisé pour obtenir des particules de diamètre < 0,2mm ont été trempées dans du tampon acétate de sodium à pH 5,5 pendant 1 à 6 jours à température ambiante. Le tableau 2 montre une augmentation de la vitesse initiale d'hydrolyse d'un facteur de 1,32 après 6 jours de mouillage du matériau. Cependant, le mouillage préalable du matériau n'affecte pas la dégradation enzymatique du matériau après 24 h.

**Tableau 2 : Concentration en sucres réducteurs (en g équivalents glucose/L) libérée en fonction de la durée de mouillage préalable du matériau**

Temps de mouillage préalable (en jours)	Vi (en g L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	[Sucres réducteurs] (en g équivalents glucose /L) après 24h d'hydrolyse par l' $\alpha$ amylase
0	2,35 10 <sup>-3</sup>	15,9
1	2,87 10 <sup>-3</sup>	15,9
6	3,16 10 <sup>-3</sup>	15,9

### 3.5. Mesure de la demande biologique en oxygène de matériaux à base de farine de maïs



**Figure 3 : Evolution de la demande biologique en oxygène du matériau à base de farine de maïs et de glycérol broyé et tamisé avec un tamis de diamètre 0,2mm à 23°C.**

**Tableau 3 : DBO mesurée après 33 jours d'essai**

	<b>DBO mg/L</b>	<b>DBO<sub>s</sub> mg/g</b>	<b>D<sub>t</sub> %</b>
<b>Matériau</b>	409	857	72
<b>Inoculum</b>	118	-	-

A partir des valeurs de DBO obtenues il est possible de calculer le taux de biodégradation Dt% selon la formule [1].

$$Dt \% = \frac{DBO_s}{DThO} \times 100 \quad [1]$$

Dt % : taux de biodégradation du matériau

DThO : demande théorique en oxygène du matériau testé en mg/g (1185).

DBOs : demande biologique en oxygène spécifique formule [2].

$$DBO_s = \frac{DBOm}{\rho m} \quad [2]$$

DBOm : différence entre la demande biologique en oxygène du matériau testé en mg/L et la demande biologique en oxygène de l'inoculum

pm: concentration du matériau dans le milieu d'essai en g/L (0,34 g/L dans notre cas).

Les résultats obtenus correspondent à un taux de biodégradation du matériau de 72 % après 33 jours. Une étude sur un matériau à base d'amidon expansé (4mm x 4mm x 0,12mm) a donné 73% de biodégradation après une durée de 31 jours (thèse Andréa 2006), ce qui est du même ordre de grandeur. Il convient désormais de faire également varier la granulométrie du matériau lors des essais de biodégradation aérobie pour évaluer si l'effet de la variation de l'aire spécifique du matériau est similaire à celui sur la vitesse d'hydrolyse enzymatique.

#### **4. Conclusion**

L'étude de la sensibilité des matériaux à base de farine de maïs à l'attaque enzymatique pourrait constituer une méthode accélérée d'évaluation de la vitesse de processus de biodégradation par voie microbienne. L'hydrolyse enzymatique de matériaux à base de farine de maïs est apparue plus rapide que celle de la farine de maïs (probablement en raison du passage de l'état cristallin à l'état amorphe de l'amidon suite au traitement thermomécanique d'extrusion). Le mouillage préalable du matériau relativement hygroscopique considéré (26 g d'eau absorbée pour 100 g de matériau dans une ambiance à 80% d'humidité relative à 23°C) n'a affecté que la vitesse initiale d'hydrolyse et ce de façon limitée. L'aire spécifique du matériau est apparue comme un paramètre déterminant pour sa cinétique d'érosion enzymatique.

Afin d'évaluer le caractère potentiellement prédictif de la cinétique de biodégradation par voie microbienne (qui conditionne l'emploi du qualificatif biodégradable dans de nombreuses normes) des hydrolyses enzymatiques, il convient

désormais d'évaluer les corrélations entre les cinétiques d'hydrolyse enzymatique et de biodégradation par voie microbienne de matériaux avec des couples « formulation - traitement thermomécanique » et des aires spécifiques variables.

### **Remerciements :**

Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet collaboratif EMABIO : Emballages Alimentaires Actifs et Biodégradables labellisé par le pôle de compétitivité Plastipolis. Les matériaux étudiés ont été fournis par l'UMR INRA-Université de Reims Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement (FARE) et le Pôle Européen de Plasturgie (PEP, Oyonnax). Nos remerciements vont aux Drs Patrice DOLE (FARE), Charlyse POUTEAU (PEP), Laurent BELARD (PEP), M. Farouk AYADI (FARE) et la Région Rhône Alpes.

### **Bibliographie**

Agros P., Pederson K., Marks MD., Larkins BA., «A structural model for maize zein proteins», *Journal of Biology and Chemistry*, vol.257, 1982, p. 998-1102.

Kong BW., Kim JI., Kim MJ., Kim JC., «Porcine Pancreatic  $\alpha$  amylase Hydrolysis of native Starch Granules as a function of granule Surface Area», *Biotechnology Progress*, vol. 19, 2003, 1162-116.

Coma V., «Proposition d'une méthodologie pour l'estimation de la biodégradabilité de matériaux d'emballage», Thèse de l'Université Champagne-Ardennes, 1992.

Gàspàr M., Benko Z., Dogossy G., Réczey K., Czigány T., «Reducing water absorption in compostable starch-based plastics», *Polymer Degradation and Stability*, vol. 90, 2005, p. 563-569.

Helbert W., Schüle M., Henrissat B., «Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$  amylase into corn starch granules» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 19, 1996, p. 165-169.

Miller G.L., «Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar» *Analytical Chemistry*, vol. 31, 1959, p. 426-428.

Stanojlovic A., «Matériaux biodégradables à base d'amidon expansé renforcé de fibres naturelles – Application à l'emballage alimentaire», Thèse de l'université du Sud de Toulon-Var, 2006.

Wu Q., Miao Y., «Mechanochemical effects of micronization on enzymatic hydrolysis of corn flour» *Carbohydrate Polymers*, vol. 72, 2007, p. 398-402.

Wu J., Li B., Su X., Xie B., «Granularity effects in microcosmic shape and property: An investigation on corn starch» *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, vol. 19 (5), 2004, p. 23