



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 36329 B1** (51) Cl. internationale : **C08L 5/00; C08L 5/08; C08L 5/02**
- (43) Date de publication : **31.05.2016**

-
- (21) N° Dépôt : **36329**
- (22) Date de Dépôt : **10.10.2013**
- (71) Demandeur(s) : **MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH), RUE MOHAMED EL JAZOULI, MADINAT AL IRFANE RABAT 10100 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **BENHIMA REDOUANE ; ELKADIB ABDELKRIM ; BOUHFID RACHID ; WAHBY IMANE ; MEFTAH KADMIRI ISSAM**
- (74) Mandataire : **ABDELHAQ AMMANI**

-
- (54) Titre : **PROCEDE DE FABRICATION DE BIO-FILM PAR UTILISATION DE PLYMERE AGRO-RESSOURCE COMME EMBALLAGE INTELLIGENT POUR L'AGROALIMENTAIRE**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne le procédé de fabrication de bio film composites utilisables dans le domaine de l'emballage agroalimentaire à base de bio polymère et de molécules biologiquement actives liés par des liaisons covalents de type imine (C=N); le matériaux est renforcé par différents charges inorganique (argile: montmorillonite; sépiolite, hallyosite,...) ou organique (amidon, fibre de cellulose, nanocellulose...). Ces biomatériaux présentent des propriétés antibactériennes et antifongiques vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques indicatrice de contamination des produits alimentaires.

2015 0195
30 JUIN 2015

36329B1

**Procédé de fabrication de bio-film par utilisation de polymère agro-ressource
comme emballage intelligent pour l'agroalimentaire**

ABREGE

La présente invention concerne le procédé de fabrication de bio film composites utilisables dans le domaine de l'emballage agroalimentaire à base de bio polymère et de molécules biologiquement actives liés par des liaisons covalents de type imine (C=N); le matériaux est renforcé par différents charges inorganique (argile : montmorillonite; sépiolite, hallyosite,...) ou organique (amidon, fibre de cellulose, nanocellulose...). Ces biomatériaux présentent des propriétés antibactériennes et antifongiques vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques indicatrice de contamination des produits alimentaires.

Procédé de fabrication de bio-film par utilisation de polymère agro-ressource comme emballage intelligent pour l'agroalimentaire

Domaine de l'invention :

La présente invention décrit la méthode de préparation de biomatériaux à base de molécules biologiquement actives greffés par des liaisons covalents sur de bio-polymères renforcés par des charges naturelles. Ces matériaux offrent un réel potentiel pour des applications dans l'industrie de l'emballage alimentaires en raison de ses propriétés particulières : physicochimiques, biodégradables, biocompatibles, ayant des activités antibactériennes et antifongiques.

Etat de la technique :

L'industrie alimentaire moderne est confrontée à des défis et nécessite des approches spécifiques pour les surmonter. Un de ces défis est lié à l'emballage de produits alimentaires avec une période de courte durée de vie. Bien que l'utilisation de matériaux d'emballage conventionnel comme les plastiques et leurs dérivés, est efficace pour la conservation des aliments, ils créent de graves problèmes environnementaux qui continuent de présenter l'industrie alimentaire comme source de pollution et les préoccupations sociales. Cette problématique exige à chercher des alternatives pour résoudre ce grave problème qui est lié à des matériaux d'emballage. Un aspect non négligeable qui est le coût total du produit final est également lié à des matériaux d'emballage, car il est bien connu que la contribution de l'emballage pour le coût total du produit est hautement significative. Ainsi, la recherche de matériaux d'emballage plus économique est un sujet très important dans l'industrie alimentaire.

Les films à base de bio-polymère ont été étudiés pour leur capacité à éviter la perte d'humidité ou l'absorption d'eau par les aliments, la pénétration de l'oxygène à la matière alimentaire. Jusqu'à présent, les films à base de bio-polymère biodégradable ne sont pas toujours destinés à remplacer totalement les matériaux d'emballage traditionnels. Cependant, l'utilisation de films à base de bio-polymère bio-actives comme matériaux d'emballage est encore l'un des moyens les plus prometteurs pour

des méthodes efficaces de maintien de la qualité de la nourriture. Parmi les bio-films les plus actifs, on cite celui basé sur le chitosane combiné avec des matériaux différents, tels que les protéines végétales et animales, des polysaccharides et les peptides antimicrobiens. (Tahiri et al. 2004, *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 123–136 ; Tahiri et al. 2009, *LWT – Food Science and Technology*, 42(2), 624–632).

Ainsi, l'utilisation de films pour prolonger la durée de vie et améliorer la qualité des aliments frais, surgelés et fabriqués a été examinée au cours des dernières années en raison de leur nature respectueux de l'environnement et biodégradabilité. Ces films peuvent fournir des moyens supplémentaires et parfois essentiels de contrôle des changements physiologiques, morphologiques et physico-chimiques dans les produits alimentaires. Le polyéthylène à haute densité est le matériau d'emballage couramment utilisé pour protéger les aliments, mais ce matériau présente des inconvénients comme la fermentation et la condensation de l'eau ce qui favorise la croissance des champignons. Il existe de nombreux mécanismes impliqués dans l'extension de la durée de conservation des aliments par le revêtement de films. Ceux-ci incluent le transfert d'humidité contrôlé entre l'alimentation et son environnement, une libération contrôlée d'agents chimiques tels que des substances antimicrobiennes, les antioxydants, réduction de la pression partielle d'oxygène dans l'emballage qui se traduit par une diminution du taux de métabolisme, la vitesse contrôlée de la respiration, une grande imperméabilité à certaines substances telles que les graisses et les huiles et le contrôle de la température.

En raison de leurs propriétés filmogènes, le chitosane a été utilisé avec succès comme emballages alimentaires. L'utilisation de *N*-, *O*-carboxyméthylchitine films pour conserver des fruits pendant de longues périodes a été approuvé au Canada et aux États-Unis. En raison de sa capacité à former des films semi-perméables, le revêtement de chitosane peut être prévu de modifier l'atmosphère interne ainsi que de diminuer la perte de transpiration et de retarder la maturation des fruits. Les films de chitosane rigides peuvent être formés en utilisant des agents de réticulation tels que le glutaraldéhyde, des ions métalliques divalents, des polyélectrolytes, ou même des polysaccharides anioniques. La préparation de films laminés chitosane et le chitosane avec d'autres polysaccharides a été rapporté par plusieurs auteurs, ceux-ci comprennent les films de chitosane, des films de chitosane / pectine stratifiés et des films de chitosane/méthylcellulose.

Description de l'invention :

Selon un aspect de l'invention, il est prévu la préparation d'un bio-film à base de bio polymère tel que le chitosane. La présence des groupements NH_2 confère à ce polymère un potentiel pour une utilisation dans différents applications. Il s'agit notamment de la biodégradabilité, la biocompatibilité et une bonne réactivité chimique vis-à-vis des groupements aldéhydes et cétones pour former des liaisons imines ($\text{C}=\text{N}$).

Selon un deuxième aspect de l'invention, il est prévu une molécule organique ayant un groupement aldéhyde ou cétone conjugué avec des doubles, triples liaisons ou des noyaux aromatiques et présente également des propriétés biologiques, notamment des activités antibactériennes et antifongiques.

Selon un troisième aspect de l'invention, il est prévu que la réaction entre la groupement amine du chitosane et la fonction aldéhyde est réalisée en milieu acide contenant l'eau et l'acétone, conduit à la formation d'une liaison imine stable par conjugaison avec le noyau aromatique de la molécule active, et que empêche la diffusion dans les aliments.

Selon un quatrième aspect de l'invention, il est prévu l'addition d'une charge organique tel que l'amidon, la cellulose et la nanocellulose, compatible avec la matrice (chitosane) à fin de renforcer le bio matériau.

Selon un cinquième aspect de l'invention, il est prévu l'ajout d'une charge inorganique micrométrique ou nanométrique, pour renforcer le film et donner plus d'imperméabilité à l'oxygène.

Selon un sixième aspect de l'invention, il est prévu que le matériau présente une stabilité chimique à différents pH (milieu acide et basique) et aux agents chimiques.

Selon un septième aspect de l'invention, il est prévu que la préparation de biofilm permet le contrôle de l'épaisseur.

Selon un huitième aspect, il est prévu que le matériau présente une activité antibactérienne vis avis des bactéries gram positif et gram négatif.

Selon un neuvième aspect, il est prévu que le bio film présente une activité antifongique vis-à-vis des champignons et des levures.

Brève description des figures

Figure 1: schéma du procédé de préparation de bio film

Tableau 1 : composition de film préparé

Tableau 2: évaluation de la concentration minimale de la molécule Bzt vis-à-vis des souches de référence. (-) : absence de croissance confirmée par la densité optique ; (+) croissance bactérienne confirmée par la densité optique

Tableau 3 : Retard de croissance des souches de références par les 5 types de films élaborés à la base de la molécule Bzt

Exemple de préparation de bio-film

Des films de bio composites à base de bio polymère contenant en poids 80% à 95% de chitosane, entre 1-5 équivalent de $-NH_2$ /-CHO en molécule biologiquement active et entre 0 à 10% de charges sont préparés comme suite :

Le chitosane est solubilisé dans l'eau distillée acidifiée à 1% par ajout d'acide acétique. La solution acide permet de transformer les groupements « amine » du chitosane en groupement « ammonium » ce qui facilite la solubilisation du polymère de chitosane (solution 1).

Une solution de molécule biologiquement active est préparée dans l'acétone (solution 2).

Une suspension de charges est préparée dans l'eau distillée est subie à une sonification pendant 15 minutes (solution 3).

Dans un premier temps, la solution 2 est ajoutée avec la solution 1 sous une forte agitation magnétique, ensuite, y sont ajoutés la solution 3. Après agitation pendant 24 heures pour bien homogénéiser la solution, cette dernière est coulée dans des boîtes pétris et laissée sans agitation pendant trois jours. L'évaporation du solvant permet de générer des films.

Les films biocomposites obtenus sont caractérisés par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier et les propriétés thermiques ont été analysées par analyse thermogravimétrique (TGA) et par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

Exemple d'évaluation de l'activité antimicrobienne de molécules biologiquement actives et des films élaborés à la base de cette molécule

Dans cet exemple, la détermination de la concentration minimale inhibitrice de la molécule utilisée dans les biofilms est évaluée. La microdilution de la molécule dans une microplaque de 96 puits permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice. La molécule est dissoute dans le DMSO de telle sorte que la concentration finale de ce dernier ne dépasse pas 1% dans chaque puits de la microplaque. Les dilutions testés sont 1mg/mL ; 500µg/mL ; 400µg/mL ; 200µg/mL ; 100µg/mL ; 50µg/mL et 25µg/mL.

L'activité antimicrobienne de la molécule **Bzt** est évaluée contre des souches de référence indicatrice de la contamination des aliments et recherchées dans le cadre du contrôle de qualité des aliments conservés (normes marocaines NM 08.0.112 ; NM 08.0.107 ; NM 08.0.137 et NM 08.0.127)

Il s'agit des souches bactériennes gram négative *Escherichia coli* (#ATCC8739), et *Staphylococcus aureus coagulase positif* (#ATCC6538), la souche bactérienne gram positive *Bacillus subtilis* (#ATCC 6633) et la levure *Candida albicans* (#ATCC10231)

Le bouillon Mueller Hinton (BK048HA) est utilisé pour les essais de la microdilution selon les recommandations de la NCCLS, méthode de référence pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (2006).

La croissance bactérienne dans les puits de la microplaque est évaluée par la présence de turbidité visuelle, et confirmée par la lecture de la DO de la plaque à 585nm. Un témoin positif indique le maximum de croissance et le chloramphénicol est utilisé comme témoin négatif de la croissance microbienne.

Les résultats sont représentés sur le tableau 2.

D'après le tableau, la molécule **Bzt** possède une activité antimicrobienne contre plusieurs groupes de microorganismes à une concentration de 500µg/mL. Cette activité antimicrobienne prouve son application comme agents antimicrobiens pour les emballages bioactifs.

La molécule **Bzt** est greffée sur 5 types de films naturels. Les tests de l'efficacité des films élaborés sur les souches microbiennes de référence citées dans le paragraphe précédent sont réalisés sur la gélose Mueller Hinton selon les recommandations de la NCCLS. Les 5 types de film élaboré sont **Bf1**; **Bf2**; **Bf3**; **Bf4** et **Bf5**. Plusieurs

échantillons de chaque film sont testés et la zone de retard de croissance est mesurée à partir du bord du film. L'efficacité de chaque type de film élaboré est classée comme suit : (-) aucun retard de la croissance, (+) retard de croissance <1mm du bord du film, (++) retard de croissance entre 1 et 3 mm et (+++) retard de croissance > 3mm

A partir des résultats du tableau 2, les films contrôle n'ont produit aucune zone d'inhibition. Les films greffés avec la molécule **Bzt** ont par contre produit des zones d'inhibition variables en fonction de la nature du film et de la souche microbienne testée. Ainsi, le film **Bf1** a démontré une activité antibactérienne intéressante. Ceci suggère la possibilité d'utiliser la molécule **Bzt** pour envelopper des films à base de bio-polymères et de les utiliser comme emballage intelligent en agro-alimentaire.

Revendications modifiées :

1. Biomatérial composite comportant : un bio-polymère utilisé comme matrice, une molécule biologiquement active et une charge organique ou inorganique **caractérisé en ce que** la molécule biologiquement active est dérivée de E-4-(2-benzothiazol-2-yl)vinyl)benzaldéhyde.
2. Biomatérial selon la revendication 1, caractérisé en ce que le bio polymère est tel que le : le chitosane, chitine, alginate, dextrine, carraghénane.
3. Biomatérial selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** la charge organique est tel que : la cellulose, la nanocellulose, l'amidon
4. Biomatérial selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** la charge inorganique est tel que : montmorillonite, hallyosite, beidellite, talc, stevensite, sépiolite, saponite, pyrophyllite, kaolinite.
5. Biomatérial selon les revendications 1 et 2, **caractérisé en ce que** la molécule biologiquement active ayant une fonction permettra le greffage de cette molécule sur le bio polymère par une liaison covalente.
6. Biomatérial selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** la liaison entre la matrice et la molécule biologiquement active est stable en milieu acide, et en milieu basique.
7. Biomatérial selon l'une quelconque des revendications **caractérisé en ce que** l'épaisseur de biofilm est comprise entre 20 et 1000µm.
8. Biomatérial selon les revendications 1 à 7, **caractérisé en ce que** le biomatérial présente une activité antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes gram positif et gram négatif.
9. Biomatérial selon les revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il présente une activité antifongique sur différents champignons et levures.

1/2

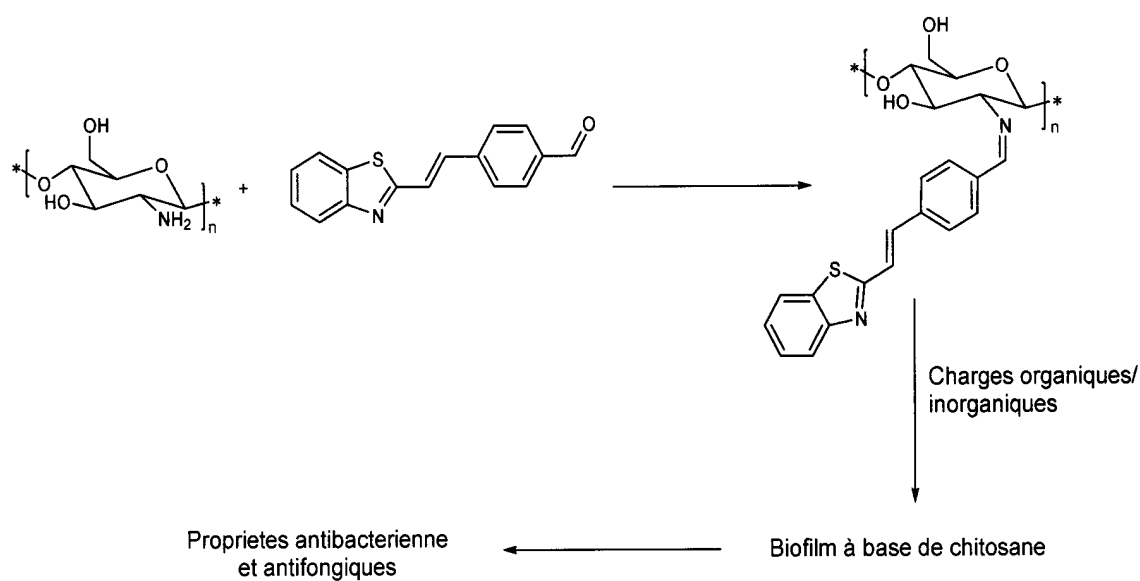


Figure 1: schéma du procédé de préparation de bio film

Tableau 1 : composition de film préparé

Référence	Bio-polymère	Molécule active	Charges
Bf1	Chitosane	Bzt	-
Bf2	Chitosane	Bzt	Montmorillonite
Bf3	Chitosane	Bzt	Sepiolite
Bf4	Chitosane	Bzt	Amidon
Bf5	Chitosane	Bzt	Cellulose

Tableau 2 : évaluation de la concentration minimale des la molécule Bzt vis-à-vis des souches de référence. (-) : absence de croissance confirmée par la densité optique ; (+) croissance bactérienne confirmée par la densité optique

Concentration de la molécule Bzt	<i>Escherichia coli</i> (#ATCC8739)	<i>Staphylococcus aureus</i> (#ATCC6538),	<i>Bacillus subtilis</i> (#ATCC 6633)	<i>Candida albicans</i> (#ATCC10231)
1mg/mL	-	-	-	-
500µg/mL	-	-	-	-
400µg/mL	+	+	+	+
200µg/mL	+	+	+	+
100µg/mL	+	+	+	+
50µg/mL	+	+	+	+
25µg/mL	+	+	+	+

Tableau 3 : Retard de croissance des souches de références par les 5 types de films élaborés à la base de la molécule Bzt

Films	<i>Escherichia coli</i> (#ATCC8739)	<i>Staphylococcus aureus</i> (#ATCC6538),	<i>Bacillus subtilis</i> (#ATCC 6633)	<i>Candida albicans</i> (#ATCC10231)
Films élaborés				
Bf1	++	++	++	-
Bf2	-	-	-	-
Bf3	++	-	-	-
Bf4	++	-	+	-
Bf5	-	++	-	-
Films contrôles				
CS-MMT 80-20	-	-	-	-
CS-MMT 90-10	-	-	-	-
CS-MMT 95-5	-	-	-	-
CS-MMT 98-02	-	-	-	-

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

**RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION
SUR LA BREVETABILITE**

*Établi conformément à l'article 43.2 de la loi 17/97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13*

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 36329	Date de dépôt : 10/10/2013 ;
Déposant : MASCIR (MORROCAN FOUNDATION FOR ADVANCED SCIENCE INNOVATION & RESEARCH)	Date d'entrée en phase nationale : 10/10/2013
Intitulé de l'invention : PROCEDE DE FABRICATION DE BIO-FILM PAR UTILISATION DE PLYMERE AGRO-RESSOURCE COMME EMBALLAGE INTELLIGENT POUR L'AGROALIMENTAIRE	
Classement de l'objet de la demande : CIB : C 08L 5/00, C 08L 5/02, C 08L 5/08	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: S.BENCHEKROUN	Date d'établissement du rapport : 12/05/2016
Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14	

Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
- Description/ Description limitée
7 Pages
 - Revendications
9
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités :
- Suite à la recherche complémentaire (Couvrant les documents de l'état de la technique qui n'étaient pas disponibles à la date de la recherche préliminaire)
 - Suite à la recherche additionnelle (couvrant les éléments n'ayant pas fait l'objet de la recherche préliminaire)

Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 4 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

Nouveauté (N)	Revendications 1-9 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-9 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-9 Revendications aucune	Oui Non

D1 : WO 2010016034

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques des revendications 1-9, d'où l'objet desdites revendications est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive (AI) :

Le document D1 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication

1 décrit un procédé pour la réalisation d'un bio-composite, qui peut être utilisé dans des applications comme emballage alimentaire. Le matériau composite comprend :

- Polymère parmi les chitines, les chitosanes et la dextrine.
- Des composés inorganiques dispersés à l'intérieur de la matrice
- Une substance active choisie parmi l'acide benzoïque, dioxyde de soufre.....
- Bio-film à base de bio-polymère et de molécule biologiquement active liés par des liaisons ioniques renforcées par des charges inorganiques ou organiques.

Par conséquent l'objet de la revendication 1 diffère de D1 par la molécule biologiquement active dérivé de E-4-(2-benzothiazol-5yl) vinyl) benzaldéhyde.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme de fournir un procédé alternatif pour la réalisation d'un biomatériau.

La solution à ce problème, n'est pas évidente pour l'homme du métier, aucun document ne décrit, ni ne suggère la réalisation d'un biomatériau avec des dérivés de E-4-(2-benzothiazol-5yl) vinyl) benzaldéhyde.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 implique une activité inventive conformément à l'article 28 de la loi 17-97 modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les revendications 2-9 satisfont donc, en tant que telles, aux exigences de l'article 28 de la loi 17-97 modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.