

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

**MODIFICATIONS DE SURFACE DE PAPIER POUR LA FABRICATION DE
PAPIERS BIOACTIFS**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN SCIENCES ET GÉNIE DES MATÉRIAUX
LIGNOCELLULOSIQUES**

**PAR
CHARLES FORT**

13 JANVIER 2025

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
DU DOCTORAT EN SCIENCES ET GÉNIE DES MATÉRIAUX
LIGNOCELLULOIQUES
(PH.D.)

Direction de recherche :

Simon Barnabé Ph.D

Université du Québec à Trois-Rivières

Directeur de recherche

François Brouillette Ph.D

Université du Québec à Trois-Rivières

Co-directeur de recherche

Jury d'évaluation

Bruno Chabot Ph.D

Université du Québec à Trois-Rivières

Président du Jury

David Myja Ph.D

Innofibre

Évaluateur externe

Martin Dubé Ph.D

Innofibre

Évaluateur externe

Simon Barnabé Ph.D

Université du Québec à Trois-Rivières

Directeur de recherche

*Quant à moi, si j'ai vu un tout petit peu mieux, c'est
parce que je me tenais sur les épaules des géants*

– Isaac Newton¹

¹ Isaac Newton (1642-1727) mathématicien, physicien et philosophe Britannique.
Reconnu pour sa théorie de la gravitation universelle et la mécanique classique.

Remerciements

La décision de quitter la France pour entreprendre un doctorat a été l'un des choix les plus audacieux et déterminants de ma vie. Ce parcours s'inscrit dans un cheminement académique nourri par ma passion pour les sciences. Bien que la recherche soit souvent une aventure solitaire, j'ai vite compris que je ne pouvais pas mener ce projet seul. L'aboutissement de cette thèse n'aurait pas été possible sans les rencontres inspirantes et sans le soutien indéfectible de personnes exceptionnelles.

Un immense merci au professeur Simon Barnabé, mon directeur de thèse, pour son soutien constant et son accueil chaleureux au sein de son laboratoire. Merci pour votre enthousiasme, votre confiance et toutes les opportunités offertes tout au long de ce doctorat.

Aux collaborateurs, Thi Thanh Ha Pham et Thanh Tung Lai. Merci pour votre encadrement et pour avoir partagé votre savoir-faire tout au long de ces quatre années de travail.

Aux membres du jury : le professeur Bruno Chabot et le chercheur David Myja. Je vous exprime toute ma gratitude pour avoir accepté de relire cette thèse et pour votre précieuse collaboration à différentes étapes de ce parcours doctoral.

Aux amis et collègues de laboratoire, dont l'aide précieuse à différentes étapes ont enrichi mon travail. Sabrina Grenier, Paul Pillet, Oumy Ndao et Karine Oostdijk, merci pour le temps infini passé sous la hotte de sécurité microbiologique.

Aux chercheurs et professeurs de L'I2E3 et d'Innofibre : Isabelle Boulan, Tarik Jabrane, Benoît Bideau et Frédéric Richard. Merci pour les conseils, et la mise à disposition des équipements.

Aux personnes qui ont croisé ma route lors des congrès, et qui, de près ou de loin, ont contribué à l'avancement de mes réflexions.

Je tiens également à souligner la précieuse contribution de mon ami et collègue, Younès Bareha, avec qui j'ai eu le privilège de collaborer étroitement pour la rédaction et la publication de mes articles scientifiques. Ta générosité et ton expertise ont été essentiels à la réalisation de ce travail. Sans toi, cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

À mes parents, vous avez toujours cru en moi, même lorsque j'ai pris la décision de partir au Québec pour poursuivre mes études. Maman, merci de m'avoir offert cette chance et cette liberté dans le choix de mon parcours, ainsi que les moyens de le réaliser.

Je n'oublie pas non plus mes grands-parents, dont les valeurs de persévérance, de détermination et de sacrifice m'ont guidé tout au long de cette aventure. Je suis ici grâce à vous.

À mes frères, Clément et Corentin, pour votre présence, même à distance. Vous avez toujours été là pour m'écouter, pour me motiver, et pour m'encourager tout au long de ce parcours. Vous êtes mes piliers.

Enfin, un merci tout particulier à toi, Jessica. Pendant ces années difficiles, tu as été là et tu n'as jamais flanché, même si tout n'était pas si simple. Ta patience et ton amour ont fait toute la différence. Sans toi, rien n'aurait été pareil.

Résumé

La population mondiale a connu une croissance spectaculaire, passant de près de 2,6 milliards en 1950 à environ 7,7 milliards en 2019. Cette explosion démographique met en péril la stabilité des écosystèmes, essentiels pour la survie des organismes vivants, y compris l'homme. Cette pression accrue a des répercussions sur la santé publique, avec l'émergence et la réémergence de maladies infectieuses. Parmi celles-ci, les maladies d'origine alimentaire sont particulièrement préoccupantes. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les pathogènes alimentaires sont responsables de plus de 600 millions d'infections, 420 000 décès. Au Canada, les maladies d'origine alimentaire affectent environ une personne sur huit, soit quatre millions de Canadiens par an. Cela se traduit par plus de 11 500 hospitalisations et 240 décès chaque année.

Face à ces défis, les procédés de transformation alimentaire et l'utilisation d'emballages jouent un rôle crucial dans la conservation des aliments. Depuis plus d'une décennie le développement de stratégie alternative dans la conservation des aliments progresse. Des emballages à propriétés antibactérienne se développent dans la littérature scientifique. Ils peuvent incorporer différents types d'agent bioactif, comme des nanoparticules, des huiles essentielles, des bactériophages.

C'est dans cette démarche de recherche de solution nouvelle que le projet de doctorat a vu le jour, de développer un emballage à propriété antibactérienne. Fruit d'une collaboration entre l'UQTR, Innofibre et l'entreprise papetière Kruger. Le projet se concentre sur le développement d'un revêtement à base de biopolymères pour stabiliser

l'activité des bactériophages dirigés contre la souche *Listeria monocytogenes*, principale responsable du plus grand nombre de décès d'infection alimentaire au Canada.

Deux problématiques principales ont été abordées : la modification de la surface du papier pour améliorer la stabilité des bactériophages et la protection des bactériophages lors des procédés de séchage. Afin de répondre à la problématique la thèse a été divisée en trois parties

Dans une première partie, l'application d'un revêtement de biopolymères pour augmenter la stabilité des bactériophages a été exploré. Le papier, avec sa faible humidité, sa rugosité et ses interactions électrostatiques, constituait un environnement hostile pour les bactériophages. L'application d'une couche hydratante à base de carboxyméthylcellulose, d'amidon cationique et de glycérol avait été étudiée. Parmi les 17 mélanges testés, une formulation de 2% de carboxyméthylcellulose, 2% d'amidon cationique et 5% de glycérol avait été identifiée comme la plus efficace. Ce revêtement, a permis de prolonger la conservation de l'activité antibactérienne des bactériophages jusqu'à 14 jours à 4°C, contre quelques heures sur un papier non traité.

Dans la deuxième partie, le séchage des bactériophages sur le support a été étudié. Le principal défi est de réaliser le séchage des bactériophages sur une durée considérée comme acceptable. Jusqu'à présent les exemples cités dans la littérature, le séchage de phage sur des couchage s'effectue sur plusieurs heures et à basse température. Or la température des procédés industriels avoisine les 80°C pour le séchage du papier, et à plusieurs centaines de degrés pour certains revêtements. L'utilisation d'excipients protecteurs, comme le lactose et la leucine, avait été testée pour préserver la stabilité des

bactériophages durant le séchage. Les résultats avaient montré que les bactériophages pouvaient être protégés à des températures allant jusqu'à 80°C pendant 2 minutes grâce à une solution contenant 12 g/L de lactose et 8 g/L de leucine. L'activité antibactérienne avait été maintenue jusqu'à 14 jours après le séchage à 4°C et à des niveaux d'humidité ambiante de 33% et 50%.

Enfin, des essais sur un équipement pilote ont été réalisés pour évaluer la mise à l'échelle des techniques développées. Les manipulations ont été réalisées sur une coucheuse cylindrique. Le revêtement avait été appliqué à l'aide d'un réservoir à 500 m/min, puis séché avec des lampes infrarouges. Les résultats morphologiques et les propriétés physiques ont été considérés comme similaires à celles obtenues à une échelle inférieure. Les mesures thermiques avaient fourni des informations sur la répartition et l'homogénéité de la température en surface en fonction de l'intensité des infrarouges. Des modèles numériques sur le taux de séchage en fonction de la vitesse de rotation et l'intensité de séchage ont été établis. Néanmoins des difficultés techniques étaient apparues, notamment des temps morts sur l'équipement, une faible quantité de solution pulvérisée et un séchage excessif, empêchant l'obtention d'un produit fonctionnel.

En conclusion, cette thèse a démontré la faisabilité technique du développement d'un revêtement antibactérien pour papier, en prenant en compte les contraintes industrielles. Le revêtement est léger et compatible avec les équipements papetiers, les excipients permettent de protéger les bactériophages des températures élevées tout en conservant leur activité après le séchage. Toutefois, des essais pilotes supplémentaires sont nécessaires pour optimiser le processus. Il est essentiel d'augmenter les quantités de

solution pulvérisée, d'adapter les paramètres de séchage, et d'étudier plus en détail le phénomène de convection. Un plus grand nombre de données expérimentales contribuerait à affiner le modèle prédictif numérique et à établir les conditions optimales pour la production d'un papier bioactif stable.

Mots-clés :

Bactériophages, *L.monocytogenes*, emballage, biopolymère, infrarouge, échelle pilote

Table des matières

Remerciements	v
Résumé	vii
Table des matières	xi
Liste des figures	xv
Liste de tableaux.....	xviii
Liste des équations	xix
Liste des Abréviations.....	xxi
Chapitre 1 – Introduction.....	22
1.1. <i>Populations, santé et Alimentation</i>	22
1.2. <i>Les pertinences scientifique et sociale de la thèse</i>	26
1.3. <i>Les objectifs et hypothèses de la thèse</i>	27
Chapitre 2 – État de l’art	30
2.1. <i>Lutte contre les contaminations alimentaires</i>	30
2.1.1. Les bactéries.....	33
2.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.1.3. Les agents antimicrobiens	39
2.1.4. Les nanotechnologies dans l’alimentation	40
2.1.5. Les huiles essentielles et extraits.....	43
2.1.6. Les peptides antibactériens	44
2.1.6.1. Les bactériophages	45
2.1.6.2. Bactériophage P100	49
2.1.7. Récapitulation	51
2.2. <i>Stabilisation des bactériophages.....</i>	52
2.2.1. Adsorption des bactériophages sur un support de biopolymères	52
2.2.1.1. Procédés de chimiosorption	52
2.2.1.2. Procédés de physiosorption.....	53
2.2.1.3. Comparaison entre chimiosorption et physiosorption	55
2.2.2. Stabilisation des bactériophages sans support.....	57
2.2.2.1. Lyophilisation	57
2.2.2.2. L’atomisation	58

2.2.3.	Récapitulation	59
2.3.	<i>Revêtement à base de biopolymères</i>	60
2.3.1.	Contact alimentaire et réglementation	60
2.3.2.	Biopolymères de revêtement.....	61
2.3.2.1.	L'amidon	61
2.3.2.2.	La pectine	65
2.3.2.3.	La carboxyméthylcellulose	67
2.3.2.4.	L'alginate	68
2.3.2.5.	Les carraghénanes	69
2.3.2.6.	Le chitosane	71
2.3.3.	Additifs au biopolymère de revêtement	72
2.3.3.1.	Composées plastifiants.....	72
2.3.3.2.	Les cires	74
2.3.3.3.	Les charges minérales	75
2.3.4.	Récapitulation	76
2.4.	<i>Les technologies papetières d'application de revêtement et de séchage</i> 77	
2.4.1.	Production mondiale	77
2.4.2.	Les techniques de couchage	78
2.4.3.	Le séchage	83
2.4.3.1.	Le séchage par conduction	84
2.4.3.2.	Le séchage convectif.....	87
2.4.3.3.	Le séchage radiatif	88
2.4.4.	Récapitulation	90
Chapitre 3 : Matériels et méthodes.....		91
3.1.	<i>Matériels</i>	91
3.2.	<i>Méthodologie</i>	92
Chapitre 4 : Article scientifique 1 :		93
4.1.	<i>Avant-propos</i>	93
4.2.	<i>Résumé</i>	95
4.3.	<i>Abstract</i>	96
4.4.	<i>Introduction</i>	97
4.5.	<i>Materials and Methods</i>	101
4.5.1.	Overview of the methodology.....	101
4.5.2.	Chemical and biological materials	102
4.5.3.	Coating solutions and coating process	103
4.5.4.	Coated paper characterization	105
4.5.4.1	Grammage	105

4.5.4.2. Thickness and permeability of the coating papers	105
4.5.4.3. Morphological characterization of coated paper.....	106
4.5.4.4. Optical characterization: transparency and color	106
4.5.4.5. Fourier transformation infrared (FTIR) – attenuated total reflectance (ATR) spectrosocopy	107
4.5.4.6. Water absorption as a function of the coatings constituents	107
4.5.4.6. Phage coating and phage coated paper storage	109
4.5.5. Assessment of the antibacterial performance of phage-coated paper	110
4.5.6. Statistical analysis	111
4.6. <i>Results and discussion</i>	112
4.6.1. Effect of coating formulation on the physical properties of coated papers..	112
4.6.2. Color properties of coatings	120
4.6.3. FTIR spectra results	122
4.6.4. Water absorption as a function of coating polymers.....	125
4.6.5. Antibacterial activity of bioactive papers	130
4.7. <i>Conclusion</i>	136
4.8. <i>Acknowledgements</i>	136
4.9 <i>References</i>	137
Chapitre 5 : Article scientifique 2 :	143
5.1. <i>Avant-propos</i>	143
5.2. <i>Résumé</i>	145
5.3. <i>Abstract</i>	145
5.4. <i>Introduction</i>	146
5.5. <i>Materials and Methods</i>	150
5.5.1. Overview of the methodology.....	150
5.5.2. Bacterial and chemical materials	151
5.5.3. Base coating	152
5.5.4. Bacteriophage drying	154
5.5.4. Bacteriophage desorption and enumeration	156
5.6. <i>Results and discussion</i>	157
5.6.1. Drying step	157
5.6.2. Antibacterial activity of bioactive paper	161
5.7. <i>Conclusion</i>	164
5.8. <i>Acknowledgments</i>	164
5.9. <i>References</i>	165
Chapitre 6 : Article scientifique 3 :	169

6.1. <i>Avant-propos</i>	169
6.2. <i>Résumé</i>	171
6.3. <i>Abstract</i>	172
6.4. <i>Introduction</i>	173
6.5. <i>Experimental</i>	175
6.5.1. Chemical and microbiologic material	175
6.5.2. Pilot equipment	176
6.5.3. Base coating	176
6.5.4. Experimental setup	177
6.5.5. Impact of IR and rotational speed on drying rate	178
6.5.5.1. Rotation effect on drying rate	178
6.5.5.2. Infrared efficiency	179
6.5.6. Theoretical evaporation rate	180
6.6. <i>Results and discussion</i>	183
6.6.1. Empirical drying rate	183
6.6.1.1. Rotation effect	183
6.6.1.2. Radiation effect	185
6.6.2. Drying experiments by numerical approach	189
6.7. <i>Conclusion</i>	193
6.8. <i>Acknowledgements</i>	194
6.9. <i>References</i>	194
Chapitre 7 : Conclusions et perspectives	198
Bibliographie	203

Liste des figures

Figure 2-1. Distribution des types de pathogènes responsable des infections gastro-intestinales au Canada.....	32
Figure 2-2. Distribution des pathogènes bactériens responsables des maladies gastro-intestinales au Canada.....	35
Figure 2-3. Mécanisme d'absorption et de prolifération de <i>Listeria monocytogenes</i>	38
Figure 2-4. Bactériophage T4 de la famille des Myoviridae	46
Figure 2-5. Mécanismes d'actions des bactériophages.....	48
Figure 2-6. Structure de l'amylose et de l'amylopectine	61
Figure 2-7. Synthèse d'amidon cationique par CHPTAC en milieu alcalin.....	64
Figure 2-8. Structure chimique de l'homogalacturonan	65
Figure 2-9. Synthèse et Structure de la carboxyméthylcellulose (CMC).....	67
Figure 2-10. Structure de l'alginate	68
Figure 2-11. Structure des carraghénanes, iota, kappa et lambda	70
Figure 2-12. Préparation du chitosane à partir de la chitine	71
Figure 2-13. Évolution de la production mondiale des types différents types de produits papetiers	77
Figure 2-14. Techniques d'application directe de revêtement	79
Figure 2-15. Techniques de dosage du couchage appliqué en surface	79
Figure 2-16. Application d'un couchage sur les deux faces par méthode indirect Exemple d'un montage type d'application de revêtement de deux faces simultanément par couchage indirect.	81
Figure 2-17. Techniques d'application de couchage sans contacts	82
Figure 2-18. Séchoir multicylindres.....	86
Figure 2-19. Séchage par soufflage d'air chaud « impingement »	87

Figure 2-20. Séchage par infrarouge	88
Figure 3-1. Synthèse de la méthodologie appliquée dans ce travail	92
Figure 4-1. Schematic overview of the methodology used in this study.	102
Figure 4-2. Comparison of the Mass of Dry Coatings and Coatings at 50% Relative Humidity	114
Figure 4-3. Distribution of sample masses based calendering step.	116
Figure 4-4. Distribution and comparisons of thicknesses before and after calendering.	118
Figure 4-5. SEM observation of Kruger based paper (a) and coating paper surfaces (b)	120
Figure 4-6. FTIR spectra of control C0, Gly5%, CMC2% and CS2% (a) and coated papers C0, C1, C2, C3, C4, C5, C6 (b), C0, C7, C8, C9, C10, C11, C12 (c), C0, C13, C14, C15, C16 and C17 (d).....	125
Figure 4-7. Dispersion of water mass absorbed per square meter based on storage humidity.....	127
Figure 4-8. Water absorption as a function of the solids content in the coatings	128
Figure 4-9. Comparison of observed values and model-predicted values describing water absorption capacity as a function of biopolymers.	129
Figure 4-10. Effect of components and humidity on water absorption by the Coatings	130
Figure 4-11. Antimicrobial activity of bioactive papers at (a) 42% RH, (b) 75% RH, and (c) 96% RH.	133
Figure 5-1. Schematic overview of the methodology used in this study	151
Figure 5-2. Customized Infra-red drying system.	154
Figure 5-3. Evolution of surface temperature, mass of samples with and without of phage solution (a) coated paper without solution (KC), (b) coated paper with SP0, (c) SP1, (d) SP2, and (e) SP3.....	159
Figure 5-4. Evolution of moisture content and drying rate. (a) coated paper without solution (KC) and with solution SP0, (b) coated paper with solution SP1, SP2, and SP3.....	160

Figure 5-5. Antimicrobial activity of bioactive paper with different phages solutions at 4°C and 33%, 60% and 90% RH. Three storage conditions—33%, 60%, and 90%.....	162
Figure 6-1. experimental device CLC 7000.....	178
Figure 6-2. Moisture content as a function of rotation speed	184
Figure 6-3. Zone of temperature	186
Figure 6-4. Example of temperature variation in different zones a) changes in temperature as a function of zones A, B and C. b) Characteristic temperature variation in zone A.	187
Figure 6-5. Surface temperature as a function of IR speed and intensity	188
Figure 6-6. Drying rate as a function of radiation and rotation speed	191

Liste de tableaux

Tableau 2-1. Températures théoriques de dénaturation des protéines du phage P100	50
Tableau 2-2. Résumé des techniques d'adsorption.....	56
Tableau 2-3. Composition de l'amidon en fonction de l'origine botanique	62
Tableau 2-4. Comparaisons des techniques de séchage.....	84
Table 4-1. Composition of each coating solution in percent	104
Table 4-2. Storage conditions of temperature and humidity of biopolymer-coated papers	108
Table 4-3. Conditions of temperature and humidity of storage conditions of phage-coated paper	110
Table 4-4. Statistical comparison of mass of dry coatings and coatings at 50%RH.....	112
Table 4-5. Comparison of coating mass at 50%RH before and after calendering steps and coatings.....	115
Table 4-6. Comparison of thickness before and after calendering steps.....	117
Table 4-7. Comparison of permeability before and after calendering steps	119
Table 4-8. Optical characterization of coated paper	121
Table 4-9. Amount of water absorbed by biopolymer-coated papers and Kruger paper control at different humidity conditions.....	126
Table 5-1. Formulation of bacteriophage solution.....	153
Table 5-2. Conditions of temperature and humidity of bioactive papers.....	155
Table 6-1. selected parameters for surface temperature evolution	179
Table 6-2. Antoine's equation parameters.....	183
Table 6-3. Data on surface temperature rise.	188
Table 6-4. Rotation effect data.....	190

Liste des équations

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

Equation 4-1106

$$m_w = \left(\frac{m_f - m_s}{S} \right)$$

Equation 4-2108

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \dots + \beta_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 + e_i$$

Equation 4-3109

$$MC(\%) = \frac{((W_0 - W) - W_i)}{W_i}$$

Equation 5-1155

$$MR = \frac{(MC_t - MC_e)}{(MC_0 - MC_e)}$$

Equation 5-2155

$$DR = \frac{(MC_0 - MC_t)}{\Delta t} \times \frac{1}{L_s}$$

Equation 5-3156

$$MC(\%) = \frac{((W_0 - W) - W_i)}{W_i}$$

Equation 6-1178

$$MR = \frac{(MC_t - MC_e)}{(MC_0 - MC_e)}$$

Equation 6-2179

$$DR_{tot} = F_m + m_{evap}$$

Equation 6-3180

$$q_{emit} = \varepsilon \cdot \sigma \cdot T^4$$

Equation 6-4180

$$m_{evap} = \frac{q_{emit}}{\Delta H_{coating}} \quad \text{Equation 6-5181}$$

$$F_m = \frac{K_m \cdot M_w \cdot P}{R \cdot (T_p + 273)} \ln \left[\frac{P - P_{air}}{P - P_p} \right] \quad \text{Equation 6-6181}$$

$$Re_{\omega} = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot \omega}{v} \quad \text{Equation 6-7182}$$

$$K_m = \frac{Sh \cdot D}{L} = 0,037 \cdot Re_{\omega}^{0.8} \cdot Sc^{1/3} \quad \text{Equation 6-8182}$$

$$Sc = \frac{v}{D} \quad \text{Equation 6-9182}$$

$$P_p = 10^{A - \left(\frac{B}{(T+C)} \right)} \quad \text{Equation 6-10183}$$

$$P_{air} = \frac{HS}{\frac{18}{29} + HS} \quad \text{Equation 6-11183}$$

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CFU	Colony forming unit
CLC	Cylindrical laboratory coater
CMC	Carboxyméthylcellulose
CS	Cationic starch (amidon cationique)
DAES	Département des affaires économiques et sociales des Nations Unies
FDA	Food and Drug Administration
GLY	Glycérol
IR	Infrarouge
OMS	Organisation mondiale de la santé
PFU	Plaque forming unit
RAM	Résistance aux antimicrobiens
RPM	Rotation par minute

Chapitre 1 – Introduction

1.1. Populations, santé et Alimentation

La population mondiale était estimée à près de 2,6 milliards de personnes en 1950, puis à 5 milliards en 1987 et atteint 7,7 milliards en 2019 [1]. Le département des affaires économiques et sociales des Nations Unies (DAES) dont les dernières prévisions datent de 2019, établit une projection d'une population mondiale atteignant les 9,7 milliard en 2050 [2]. L'augmentation de la population et les besoins croissants sont responsables de la diminution des terres jusque-là non exploitées [3]. La réduction des habitats naturels au détriment des villes et des industries accroît la pression sur les organismes y vivant. La stabilité des écosystèmes est nécessaire à l'équilibre de ces organismes notamment, l'être humain [4, 5]. Depuis plusieurs années de grandes maladies infectieuses et pathogènes pour l'homme font leur apparition ; d'autres réapparaissent tels la rage ou encore la tuberculose. Les réémergences sont dues à plusieurs facteurs ; citons la détérioration de l'environnement pour subvenir aux besoins d'une population mondiale croissante et toujours plus gourmande [6-8]. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les pathogènes alimentaires sont responsables de plus de 600 millions cas de d'infection, 420000 décès et 33 millions d'années de vie perdue (DALY) à travers le monde.

Les maladies d'origine alimentaire entravent le développement socio-économique en sollicitant fortement les systèmes des pays touchés, portant aussi préjudice, à des degrés différents aux économies nationales, mais aussi au tourisme et au commerce. Les différences entre les systèmes de santé et la mise en place de solution rapide par les

gouvernements en cas de crise, renforcent les inégalités face au développement de maladie. Les maladies sont causées par des bactéries, virus parasites ou substances chimiques. Les souches et substances varient également en fonction des pays.

Ces dernières années, on observe une émergence de bactéries multi-résistantes [9, 10]. La résistance aux antimicrobiens (RAM) survient lorsque les microorganismes évoluent au fil du temps et ne réagissent plus aux médicaments. Cela rend plus difficile le traitement des infections et augmente le risque de propagation des maladies, parfois sous des formes graves de celles-ci. Le développement des résistances bactériennes est multifactoriel, mais les raisons sont mal connues

L'OMS a lancé le Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (RAM) et de leur usage (Global antimicrobial resistance and use surveillance system - GLASS) en 2015 pour faire avancer les connaissances et étayer les stratégies à tous les niveaux. En 2024 dans un rapport des Nations Unies sur la mise à jour de la liste des agents pathogènes bactériens prioritaire de l'OMS pour la lutte contre les résistance antimicrobiennes est alarmant [11]. Il est estimé que 4,95 millions de décès sont associés à des bactérie résistantes [12]. La Banque mondiale a estimé que jusqu'à 3,8 % du produit intérieur brut mondial pourrait être perdu à cause de la RAM d'ici 2050 [13]. Par ailleurs, cette résistance fragilise la sécurité sanitaire alimentaire lors de procédés industriels [14, 15].

Au Canada une personne sur huit, soit quatre millions de Canadiens est malade chaque année à cause d'aliments contaminés [16]. Plus de 11500 hospitalisations et 240 décès surviennent de maladies d'origine alimentaire. Les microorganismes responsable

des maladies entériques sont des bactéries appartenant au genre *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria* et *Escherichia* (spécifiquement *E.coli* O157), ainsi que les virus du genre *Norovirus* [17]. Le nombre de cas de contamination par un norovirus est d'environ 1 million de personnes par année, seul 0,1% nécessite une hospitalisation et la part de décès est de 0,002%. À l'inverse la Listériose, maladie provoquée par *Listeria* représente 178 cas, mais dans 84% des cas une hospitalisation est nécessaire, 20% des personnes atteintes en décèdent. Elle est la principale cause de décès liés aux maladies d'origine alimentaire chaque année [18].

Les procédés de transformation alimentaire et l'utilisation de l'emballage sont des moyens de préservation grâce aux propriétés barrière de ce dernier aux micro-organismes et aux gaz. Les aliments doivent être conformes en sortie d'usine et stables jusqu'à leur consommation. Plusieurs stratégies sont adoptées par les industriels pour la conservation des denrées alimentaires. La première approche est l'ajout de conservateurs permettant de contrôler la stabilité des produits. Des acides organiques servent à réguler le pH pour limiter la croissance bactérienne, par exemple l'acide sorbique, benzoïque, acide laurique, acide propionique... On retrouve également des substances inhibitrices de croissance bactérienne comme l'EDTA (éthylènediaminetétraacétique) un chélateur ionique très souvent associé à la nisine une bactériocine peptidique [19, 20]. L'ajout de chlorure de sodium (NaCl) ou de nitrite (exemple KNO_3) pour limiter le développement microbien est très largement utilisé. Cependant, la très grande consommation de produit riche en sels et nitrates engendre un risque de maladie cardiovasculaire [21, 22]. De plus, dans un cas général, la consommation d'aliments ultra-transformés (Ultra processed food - UPF) a été

associée à un risque plus élevé d'obésité, d'hypertension, de diabète de type 2, de cancers et de maladies cardiovasculaires [23, 24].

La deuxième approche consiste à utiliser les emballages comme moyen de conservation. Les fonctions de l'emballage sont multiples, c'est d'abord un contenant, un support d'informations pour le marketing, mais aussi un moyen de préservation de la denrée alimentaire. L'atmosphère de l'emballage est composée le plus souvent d'oxygène, de dioxyde de carbone et d'azote ; les proportions diffèrent selon le type de viande (rouge, volailles, produits de la mer). Il est possible d'ajouter un coussinet pour absorber ou libérer certains gaz (O_2 , CO_2). Le contrôle des gaz dans l'emballage permet de limiter le développement de microorganisme [25]. Cependant, les emballages alimentaires produits par les industries sont principalement formés à partir de plastique issu du pétrole et sont non recyclables [26]. La pollution par les plastiques et microplastiques provenant de l'emballage est un fléau du XXème siècle qui a de lourdes conséquences. En 2019 la production de plastique pour les emballages était estimée à 460 millions de tonnes. Seulement 9 % des déchets plastiques ont été finalement recyclés, tandis que 19 % ont été incinérés et près de 50 % ont été envoyés dans des décharges sanitaires. Les 22 % restants ont été éliminés dans des décharges incontrôlées, brûlés dans des fosses ouvertes ou se sont échappés dans l'environnement.[27, 28].

Les consommateurs sont de plus en plus sensibles à la composition des aliments. La tendance du mieux manger s'inscrit dans le temps. Les populations développent aussi une conscience de l'impact carbone des produits qu'ils consomment, mais aussi de l'emballage utilisé. La mise au point d'emballages biosourcés et biodégradables propose

des solutions face aux enjeux environnementaux. Or, si l'utilisation à base de fibre cellulosique nécessite différentes modifications pour aboutir à des propriétés compétitives avec le plastique ; il est néanmoins une base intéressante pour l'application de composé antibactérien [29, 30]

1.2. Les pertinences scientifique et sociale de la thèse

Ce projet de doctorat s'inscrit dans un champ de recherche majeur, en collaboration avec Innofibre et en partenariat avec l'entreprise papetière Kruger Inc. Il s'intitule : « développement de prototypes d'un nouveau produit d'emballage bioactif ». L'objectif est de développer un emballage ayant des propriétés antimicrobiennes, utilisable dans le secteur alimentaire pour répondre aux attentes des consommateurs et aux évolutions d'un marché en plein expansion. En ce sens, le développement d'emballages alimentaires antimicrobiens devrait répondre à deux prérequis fonctionnels essentiels. Premièrement, ils doivent démontrer une efficacité antibactérienne significative contre les micro-organismes pathogènes pour l'homme, tout en préservant les propriétés organoleptiques du produit, telles que le goût, la texture et l'arôme. Deuxièmement, pour garantir la sécurité du consommateur, les composants et agents antibactériens utilisés doivent être approuvés par les organismes de réglementation sanitaire, tels que la FDA, Santé Canada ou l'EFSA.

1.3. Les objectifs et hypothèses de la thèse

Comme mentionné précédemment, l'objectif principal de ce travail est de développer une stratégie pour la production d'emballage à propriétés antibactérienne dirigée contre *Listeria monocytogenes*. Cette souche bactérienne représente la principale cause de décès liés aux maladies d'origine alimentaire au Canada. D'une part, la mise au point du produit doit répondre à plusieurs critères de faisabilité industrielle pour l'entreprise partenaire Kruger. D'autre part, la production doit être réalisable avec les équipements présents dans les usines papetières de l'entreprise pour en limiter les coûts d'achats (CAPEX) et la production doit être économiquement viable (OPEX). Enfin, l'emballage doit être stable, de sa fabrication à la mise en contact avec un aliment et jusqu'à son traitement en tant que déchet.

Par conséquent, parmi les agents antibactériens proposés, les bactériophages apparaissent comme une stratégie réalisable pour un industriel. Leur grande spécificité pour les cibles bactériennes et leur cycle de vie sont des atouts majeurs. Néanmoins, la stabilisation de l'activité des bactériophages sur un emballage comporte de nombreux défis. L'humidité faible de l'emballage est la grande fragilité des bactériophages à la chaleur et la dessiccation sont des obstacles à franchir. Par conséquent, trois problématiques se dégagent, à savoir :

- (i) Comment modifier la surface de l'emballage pour améliorer la stabilité des bactériophages en surface.
- (ii) Comment protéger les bactériophages lors des procédés de séchage.

- (iii) Comment augmenter la vitesse de séchage des bactériophages pour atteindre des vitesses proches de celle de l'industrie papetière.

De ces constats, découlent trois objectifs spécifiques et trois hypothèses à lever, au cours de la thèse afin de comprendre et permettre le développement d'emballage bioactif.

Objectif spécifique 1 : Modifier la surface du papier par ajout d'un couchage afin d'améliorer la stabilité des bactériophages appliqués en surface.

Hypothèse 1 : Les biopolymères modifieront les caractéristiques physiques de surface. Le but est de comprendre l'impact des modifications de surface sur l'activité des phages envers *Listeria monocytogenes*. Les phénomènes d'absorption d'eau avec l'action des bactériophages seront étudiés. Une relation entre la variation des caractères hydrophiles des couchages sur l'adsorption et désorption des phages dans le temps et en fonction des conditions de conservation sera étudié.

Objectif spécifique 2 : Développer une approche pour le séchage des bactériophages sur les papiers couchés.

Hypothèse 2 : Les phages appliqués en surface de l'emballage seront soumis à des procédés de séchage, de changement d'humidité, ainsi donc des conditions de stress pouvant inhiber leurs actions. Pour maintenir la stabilité des bactériophages des excipients comme le lactose et la leucine seront ajoutés à la solution avant le séchage pour améliorer leurs résistances au procédé. L'utilisation d'infrarouge permet un séchage rapide et optimal des solutions de bactériophage en surface des papiers couchés.

Objectif spécifique 3 : Évaluer les impacts d'un changement d'échelle sur les stratégies développées pour la modification de surface et de séchage des bactériophages.

Hypothèse 3 : Lors d'un changement d'échelle, Les procédés qui fonctionnent bien à petite échelle ne se comportent pas toujours de la même manière à grande échelle. L'équipement d'infrarouge utilisé possède une puissance bien plus élevée et donc un impact sur la température. À cela s'ajoute des phénomènes de convection et cisaillement. Le suivis des expérimentaux permettront de faire des projections en vue d'un changement d'échelle.

La présente thèse repose sur trois articles scientifiques et elle est divisée en huit chapitres.

Le premier chapitre aborde le contexte général, les pertinences sociale et scientifiques, la problématique ainsi que les objectifs auxquelles s'adressent ce sujet de recherche.

Le deuxième chapitre est consacré à la revue de littérature. Il évoque les différents agents antimicrobiens et leurs stabilisations. Dans ce chapitre sont aussi détaillés les biopolymères pouvant être utilisés pour le développement du revêtement fonctionnel et support des agents antimicrobiens. Enfin les techniques de séchage utilisées dans l'industrie papetière sont également présentés

Le troisième chapitre présente la démarche méthodologique adoptés ainsi que les différents produits utilisés.

Les principales réalisations et résultats obtenus durant la thèse seront présentés aux chapitres 4, 5 et 6 sous la forme de trois articles scientifiques

Chapitre 2 – État de l’art

Pour une bonne compréhension et l’acquisition des connaissances nécessaires à la conduite du projet de recherche, ce chapitre sera divisé en quatre parties. Après avoir présentés les agents pathogènes de contamination alimentaire et les agents antibactériens, nous aborderons les techniques de l’industrie papetière pour l’application de couchage et le séchage. Les différents biopolymères d’intérêt pour le développement de revêtements fonctionnels garantissant la stabilité des bactériophages seront détaillés en troisième partie. Enfin, dans la dernière partie, seront présentées plusieurs stratégies de stabilisation des bactériophages à l’état déshydraté.

2.1. Lutte contre les contaminations alimentaires

Le Canada utilise différents systèmes de surveillance pour suivre les cas de maladie d’origine alimentaire. L’Agence de la Santé Publique du Canada (ASPC) est à l’origine de plusieurs programmes et initiatives. Le Programme National de Surveillance des Maladies Entériques (PNSME) est axé sur la collaboration entre l’ASPC et les laboratoires provinciaux de santé publique. Il recueille les données sur le nombre de bactéries, de parasites et de virus signalés par les laboratoires provinciaux. Bon nombre de maladies rentrent dans le Système Canadien de Surveillance des Maladies à Déclaration Obligatoire (SCSMDO).

L’initiative FoodNet Canada, dirigée par l’Agence de la Santé Publique du Canada, a pour but de soutenir des activités visant à réduire la charge des maladies entériques sur le système de santé. Fondée sur un partenariat multiple, elle s’appuie sur une surveillance

exhaustive des sites sentinelles, sur une collaboration avec les services locaux de santé publique et sur les laboratoires de santé publique provinciaux. Les données épidémiologiques et de surveillance recueillies dénombrent une trentaine de pathogènes responsables des contaminations au Canada.

Les agents pathogènes responsables des contaminations alimentaires regroupent de nombreux organismes différents telles les bactéries, les virus et les parasites, tous naturellement présents dans l'environnement.

Les vecteurs de contamination sont nombreux. Les contaminations peuvent avoir lieu lors de contacts d'aliments avec une zone contaminée, de non-respect des règles d'hygiène ou des bonnes pratiques lors de la préparation des denrées alimentaires ou simplement de transmissions entre êtres vivants, via le bétail, les animaux de compagnie ou entre humains. Au Canada, une trentaine d'agents différents sont à l'origine des maladies. Mais dans seulement 1,6 million des cas, les pathogènes responsables sont identifiés. A contrario, l'agent pathogène n'est pas identifié pour 2,4 millions de cas de contamination. La distribution des types des pathogènes responsables des infections gastro-intestinales au Canada sont présentés dans la Figure 2-1 à la page suivante.

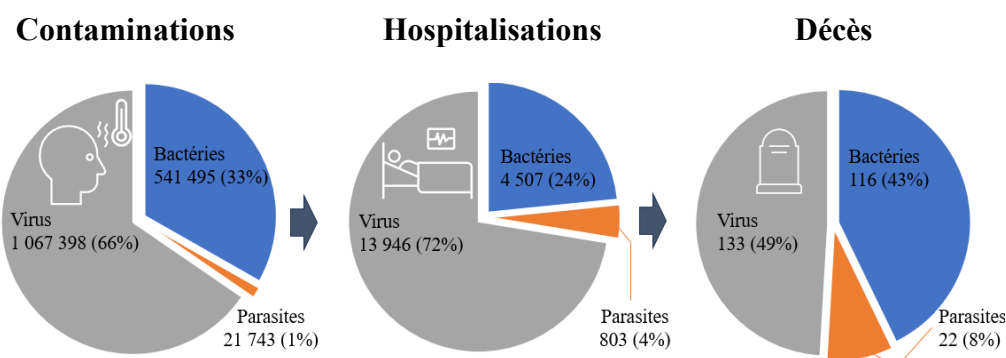


Figure 2-1. Distribution des types de pathogènes responsable des infections gastro-intestinales au Canada [15, 17].

Les virus, entités biologiques considérées comme à la limite du vivant, sont des parasites intracellulaires obligatoires. Ils se répliquent dans les cellules hôtes vivantes aux dépens de ces dernières ; leur réplication s'accomplit en usurpant le contrôle de la machinerie biomoléculaire de celles-ci. Les virus possèdent un génome composé d'acide ribonucléique (ARN) ou d'acide désoxyribonucléique (ADN). De quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres, ils sont de structures géométriques très variables : hélicoïdale, icosaédrique, enveloppe lipidique [31, 32]. Les virus sont responsables de plus d'un million de contaminations de type gastro-intestinal soit les deux tiers des cas identifiés et de la moitié des décès. Le norovirus est le principal virus mis en cause ; il représente à lui seul la majeure partie des contaminations et des décès. Les bactéries représentent un tiers seulement des contaminations, soit plus d'un demi-million de cas, mais plus de 40% des décès. Les parasites alimentaires regroupent différents organismes vivants comme les protozoaires tel *Cryptosporidium* et *Giardia*, les sporozoaires comme *Cyclospora* et *Toxoplasma* ou encore les nematodes pour les genres *Trichinella* et *Plasmodium*. Les protozoaires et sporozoaires sont des organismes unicellulaires

eucaryotes de quelques micromètres appartenant au règne des protistes ; les nematoda sont des vers microscopiques pluricellulaires. En règle générale, les parasites sont capables d'infecter de nombreux animaux (mammifères, oiseaux...). Une fois ingérés, ils se développent et se multiplient à l'intérieur de l'hôte. Excrétés, ils contaminent de nouvelles surfaces. Leurs multiples résistances leur permettent de rester stables de nombreuses semaines dans l'environnement augmentant ainsi le risque de nouvelles ingestions conduisant à de nouvelles contaminations [33, 34]. Enfin, si la contamination par *Toxoplasma gondii* provoquant la toxoplasmose représente moins de 1 % des cas de contamination, elle génère 8 % des décès.

Bien que les contaminations alimentaires d'origine bactérienne soient deux fois moins élevées que celles des virus, leur taux de mortalité est relativement similaire. Le taux d'incidence de la mortalité est donc deux fois plus élevé pour les bactéries que pour les virus.

2.1.1. Les bactéries

Le nombre de cas d'infections, d'hospitalisations et de décès varie significativement d'une espèce à une autre. Neuf familles différentes regroupant onze genres bactériens sont responsables de la majeure partie des cas.

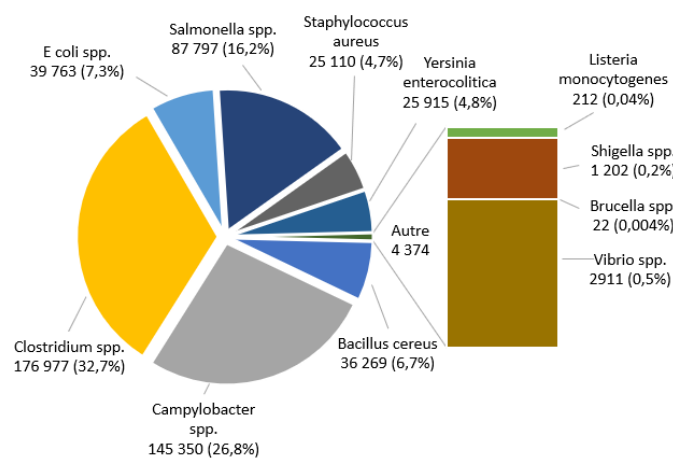
Appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, trois genres bactériens sont mis en cause : *Shigella*, *salmonella*, *Escherichia* (diarrhéagénique, vérotoxines (VTEC) O157, VTEC non-O157 et entérotoxinogènes (ETEC)).

Dans la famille des *Vibrionaceae*, en particulier *Vibrio cholerae* et spp. Les *Yersiniaceae* comprennent *Yersinia enterocolitica*, tandis que les *Staphylococcaceae* incluent *Staphylococcus aureus*. Parmi les *Clostridiaceae*, on retrouve les espèces du genre *Clostridium* spp, et les *Campylobacteriaceae* incluent les bactéries du genre *Campylobacter*. La famille des *Brucellaceae* est représentée par les espèces du genre *Brucella* spp, et celle des *Bacillaceae* par les espèces du genre *Bacillus* spp. Enfin, la famille des *Listeriaceae* comprend *Listeria monocytogenes*. Les données présentées ci-dessous proviennent de Santé Publique du Canada ; elles ne concernent que les cas de maladies gastro-intestinales développées sur le territoire et non importées par des voyageurs [16, 18]. Dans la classification utilisée au Canada, les contaminations, hospitalisations et décès associés à *E coli* sont catégorisés en fonction des sous-types en quatre catégories utilisées dans ces estimations : *Escherichia coli* producteurs de toxines et *Escherichia coli* diarrhéagéniques autres que les VTEC ou ETEC.

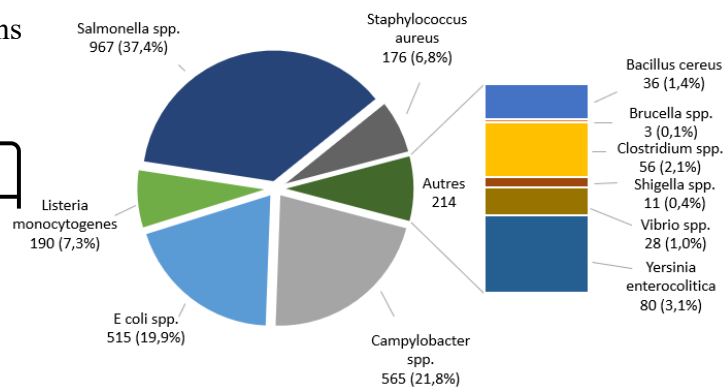
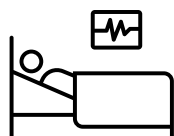
Les bactéries représentent un tiers seulement des contaminations totales (cf Figure 2-1), soit plus d'un demi-million de cas imputés au genre *Clostridium*. Plus de 40 % de la totalité des décès sont liés à *Listeria monocytogenes*, pourtant responsable de seulement 0,04% (212 cas) des contaminations. Sur les 212 cas recensés chaque année, on dénombre 35 décès soit 16% des cas de contamination de *Listeria monocytogenes* et 44,9% de la totalité des décès.

Au vu de ces données, le suivi et la traçabilité des cas sont nécessaires pour limiter la propagation de cette souche.

Contaminations



Hospitalisations



Décès

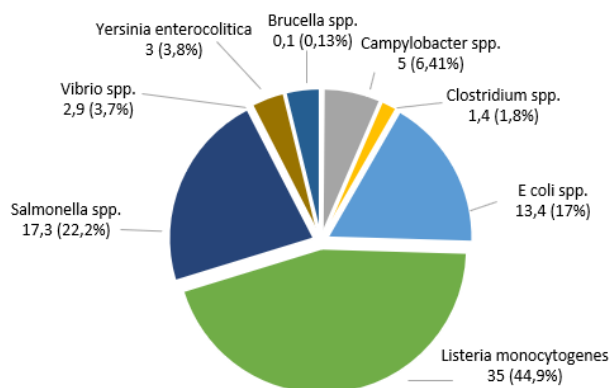


Figure 2-2. Distribution des pathogènes bactériens responsables des maladies gastro-intestinales au Canada.

2.1.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquitaire présente dans le sol, l'eau et l'air. Capable de se développer à des températures comprises entre + 1°C et +45°C, elle contamine les êtres humains mais également les animaux sauvages et domestiques. De plus, cette bactérie peut survivre pendant des mois, voire des années, dans les environnements des usines de transformation des aliments. Certaines denrées ou préparations alimentaires sont considérées à haut risque de contamination par la bactérie : les plats à base de viande prêts à consommer, les fromages à pâte molle, les produits de la pêche fumés à froid et les charcuteries [35, 36]. La consommation d'aliments contaminés par *Listeria monocytogenes* peut provoquer la listériose. Deux formes de listériose sont décrites, une forme non invasive observée chez les individus en bonne santé (responsable de gastro-entérite, fièvre, céphalée et myalgie). Une forme invasive, plus grave, touchant des groupes de personnes à risque (femme enceinte, immunodéprimé, personnes âgées et nourrissons). Dans sa forme invasive la listériose est responsable de méningite, de déshydratation, de septicémie et de décès. Chez la femme enceinte cela peut aboutir à un avortement spontané ou à une mortinaissance [37, 38].

En tant que pathogène opportuniste, *Listeria. monocytogenes* pénètre principalement les organismes hôtes en traversant le tractus gastro-intestinal. *Listeria monocytogenes* peut envahir et se multiplier à l'intérieur des cellules hôtes comme les cellules épithéliales. La Figure 2-3 présente un schéma de synthèse des mécanismes d'action de pénétration et de prolifération de la souche bactérienne. Pour entrer dans les cellules, les molécules bactériennes de surface (InlA, InlB) se lient à des ligands

également en surface ; cette association déclenche alors des cascades de signalisation qui entraînent l'internalisation du pathogène et la pénétration de la cellule. La modulation du cytosquelette d'actine et les réarrangements de la membrane plasmique conduisent à l'englobement bactérien et à l'internalisation dans une vacuole [39]. La vacuole est, par la suite, lysée par plusieurs mécanismes : les phospholipases bactériennes (PlcB, PlcA), la métalloprotéase Mpl et la toxine LLO (Listeriolysin O) [40]. Une fois dans le cytoplasme, la bactérie va s'adapter métaboliquement au milieu. Les bactéries tirent parti des métabolites de l'hôte via le transporteur de phosphate Hpt et la ligase de protéines lipoïques LplA. Le métabolisme cytosolique de *Listeria monocytogenes* utilise les phosphates d'hexose et le glycérol comme principales sources de carbone puisé dans l'hôte. Il en va de même pour les facteurs de croissance essentiels telles la thiamine, la biotine, la riboflavine...[41]. Dans le cytoplasme, la bactérie utilise des filaments d'actine pour se déplacer.

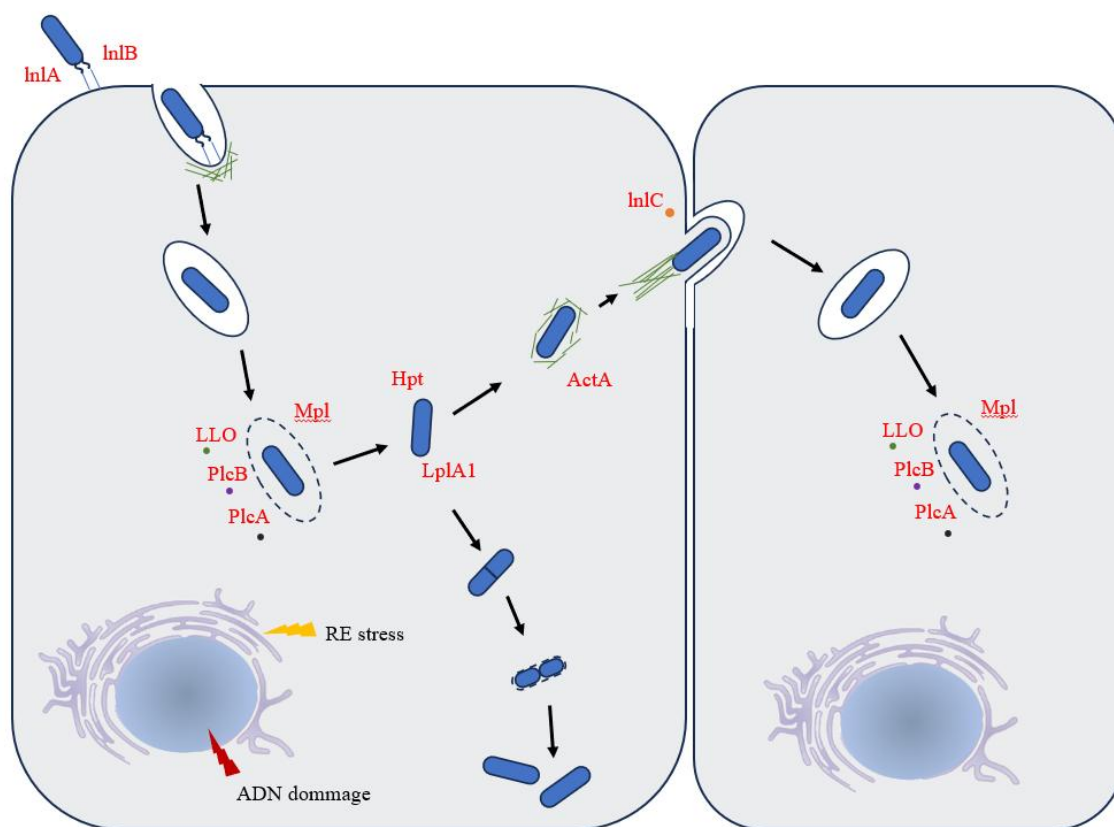


Figure 2-3. Mécanisme d'absorption et de prolifération de *Listeria monocytogenes*

La protéine de surface ActA favorise la motilité basée sur l'actine, tandis que la protéine sécrétée InlC contribue à réduire la tension corticale de la membrane plasmique, permettant ainsi à *L. monocytogenes* de former des protrusions et d'envahir les cellules voisines [42].

La population de *Listeria monocytogenes* double environ toutes les 40 minutes. Le développement de stratégie de contrôle et de diminution du risque des contaminations bactériennes est nécessaire. Les approches pour maîtriser le risque en industrie lors de transformation ou de manutention sont nombreuses.

2.1.3. Les agents antimicrobiens

Pour maintenir la qualité des denrées alimentaires de la production, à la transformation jusqu'à la consommation, les industries agroalimentaires disposent de plusieurs outils. La modification de l'atmosphère de l'emballage et l'utilisation de conservateurs sont couramment mobilisées pour la conservation des aliments. Les conservateurs utilisés sont considérés comme sans effets indésirables aux doses maximales fixées et sont classifiés comme GRAS (Generally Recognized As Safe - 21CFR182 - Code of Federal Regulations – FDA – USA). Certains additifs comme le benzoate de sodium ou le sorbate de potassium peuvent provoquer une sensibilisation, une inflammation des tissus et représentent potentiellement des facteurs de risque dans le développement de plusieurs maladies chroniques [43]. Les additifs alimentaires tels que les nitrates et les nitrites sont associés de manière positive aux risques de développement des cancers du sein et de la prostate [21, 44].

En vue de préparer les évolutions des réglementations et de faire face à l'augmentation des résistances bactériennes, le développement de nouvelles technologies et de procédés innovants est primordial.

2.1.4. Les nanotechnologies dans l'alimentation

Bien qu'utilisées dans de nombreux domaines, les nanotechnologies le sont encore très peu dans le domaine alimentaire. L'emploi des nanoparticules est aussi soumis à des régulations. En Europe, l'Observatoire des Nanomatériaux de l'Union Européen (EUON) en partenariat avec EFSA réglemente leur utilisation. Les nanomatériaux dans les matériaux actifs et intelligents destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires sont encadrés par la réglementation Novel Foods Regulation (EC) 2015/2283. Aux États-Unis, la FDA a créé, en 2006, un groupe de travail sur les nanotechnologies (Nanotechnology Task Force – NTF). L'organisme est chargé d'évaluer la toxicité et les quantités limites d'utilisation dans les différents domaines d'application (matériels, ingrédients, santé...). Les régulations sur les nanoparticules sont consignées dans le 21CFR182.

Dans l'industrie agro-alimentaire, les nanotechnologies sont utilisées pour la dispersion de substances insolubles dans l'eau ou la protection de molécules sensibles par nano-encapsulation [45, 46]. Le domaine des matériaux en contact avec les aliments est celui où la majorité des applications nanotechnologiques a déjà été mise en œuvre à l'échelle commerciale. On y trouve, par exemple, des matériaux libérant des nanoparticules avec des effets antibactériens, des nanocapteurs permettant de détecter des contaminations microbiennes ou des indicateurs de la maturité des produits [47, 48].

Il existe une grande diversité d'ions métalliques pouvant être transformés en nanoparticules. Cependant, peu d'entre eux ont un intérêt dans le développement d'actions

antibactériennes dans le secteur de l'emballage et de l'agroalimentaire. Dans la littérature, on trouve l'argent, le zinc, le titane, le magnésium, le cuivre et le nickel [49, 50]. La synthèse de nanoparticules est réalisable par différentes méthodes physiques (micro-ondes, photo réduction, laser...), chimiques (sonochimie, électrolyse, réduction chimique...) ou « vertes » comme la synthèse via des organismes biologiques (bactérie, mycètes) [51].

L'action des nanoparticules sur les bactéries résulte de plusieurs mécanismes. Les nanoparticules peuvent se lier à la paroi bactérienne par liaisons électrostatiques et ainsi la désorganiser. La paroi cellulaire étant différente entre les Gram positifs et négatifs, la fixation ne s'effectue pas de la même manière. Chez les bactéries Gram positives, la paroi cellulaire est un peptidoglycane chargé négativement ce qui facilite l'attraction des nanoparticules chargées positivement. Pour les bactéries Gram négatives, les lipopolysaccharides (LPS) chargés négativement fixent les nanoparticules. Ces dernières induisent des changements de forme, de fonction et de perméabilité pour aboutir à la mort de la cellule. Les nanoparticules d'argent peuvent affecter les mécanismes de traduction aboutissant à la synthèse de protéines. Les AgNPs interagissent avec les groupements sulfures et phosphorylés des ribosomes et perturbent le processus [52, 53]. De plus, les nanoparticules induisent la formation d'espèces actives de l'oxygène (ROS) lors de la restructuration des cristaux. Les ROS formées peuvent être l'ion superoxide (O_2^-), des radicaux hydroxyle ($\bullet OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou un singulet d'hydrogène (1O_2) [54, 55]. Les espèces actives de l'oxygène accumulées dans la cellule contribuent à augmenter le stress oxydatif générateur d'impacts multiples dans la cellule bactérienne.

Par ailleurs, elles perturbent la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries, diminuant la production d'ATP nécessaire à de très nombreuses réactions métaboliques. Les ROS endommagent l'ADN ; par exemple la guanine, à potentiel redox bas, est très affectée et forme par oxydation le 8-hydroxyguanine [49].

La toxicité des nanoparticules est très débattue dans la littérature scientifique. De nombreux articles soulignent le manque de compréhension approfondie concernant le sort gastro-intestinal, ainsi que les incohérences fréquemment observées entre les études. Les modèles animaux et humains testés ne prennent que rarement en compte la matrice alimentaire alors que celle-ci peut avoir un impact significatif sur le comportement des nanoparticules dans le tractus gastro-intestinal [56, 57]. À cela s'ajoutent l'effet de bioaccumulation des différentes nanoparticules et leurs effets sur le long terme [58, 59]. D'autres résultats indiquent que les nanoparticules d'argent pourraient entraîner des effets indésirables en affectant de manière sélective le microbiote intestinal [60].

Il apparaît nécessaire et urgent de mener des recherches systématiques en utilisant des nanoparticules et des méthodes de test bien définies. Le principe de précaution doit être considéré dans le but d'éviter de potentiels problèmes de santé à venir.

2.1.5. Les huiles essentielles et extraits

Au vu des problèmes de santé probables que certains agents de conservation d'origine chimique peuvent causer, l'attention se tourne de plus en plus vers des agents naturels telles les huiles essentielles (HE) aux propriétés antibactériennes reconnues et considérées comme sûres par de nombreuses autorités sanitaires [61].

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans les plantes en tant que protecteur contre les pathogènes, les herbivores et contribuent à la communication entre les plantes [62, 63]. Les huiles essentielles varient d'une espèce végétale à une autre, et d'une partie à une autre de la plante elle-même. Les extraits de plantes proviennent de différentes parties : feuilles, bourgeons, fleurs, tiges, racines et graines. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles sont nombreuses : pressage à froid, hydrodistillation, distillation à la vapeur, extraction solvant ou CO_2 supercritique ; toutes ces méthodes sont développées à un niveau industriel. Les composés dans les huiles extraites se divisent en deux catégories : la fraction volatile représentant 90% du poids, riche en terpènes, alcool aliphatique, aldéhyde et esters ; la fraction non volatile, composée d'acides gras, de stérols, de flavonoïde, de cires et de caroténoïdes [64].

Pour leurs propriétés antibactériennes, l'incorporation d'huiles dans les emballages, dans les films à contact alimentaire ou directement sur les aliments a été très étudiée. Les sources de ces huiles sont variées : gingembre, origan, cannelle, thym, romarin [65-67]. L'action des huiles sur la bactérie entraîne la perméabilisation de sa membrane puis la perte de toutes ses fonctions cellulaires et de toutes ses activités métaboliques [68, 69].

L'incorporation dans les emballages présente de nombreux avantages ; cependant l'utilisation des huiles essentielles comportent quelques freins. La possibilité d'une migration des substances de l'emballage vers les aliments et leur absorption par les consommateurs sont encore mal connues [70]. Un encadrement du dosage dans les produits alimentaires se révèle nécessaire eu égard à une relative toxicité de certains extraits [71]. Enfin, la stabilité de l'approvisionnement en matières premières et la variabilité des coûts de production selon la technique utilisée peuvent présenter des différences significatives. Ces coûts peuvent varier considérablement d'une méthode d'extraction à une autre, en incluant les dépenses associées, telles que les coûts d'investissement (CAPEX) et d'exploitation (OPEX) [72].

2.1.6. Les peptides antibactériens

Les peptides antimicrobiens (AMPs pour antimicrobial peptides) sont de courtes chaînes d'acides aminés, généralement moins de 100 unités d'acide aminé. Ils sont produits naturellement par les systèmes immunitaires des organismes vivants pour se défendre contre les agents pathogènes microbiens [73]. Les AMPs ont une activité antimicrobienne à large spectre avec une efficacité marquée contre les bactéries Gram-négatives. De plus, ils possèdent une faible propension à induire une résistance aux médicaments. [74]. Les peptides antimicrobiens (AMPs) se caractérisent généralement par une charge nette positive et une structure amphiphile, leur conférant une forte affinité pour les surfaces et membranes hydrophobes. En outre, au niveau intracellulaire, les AMPs ciblent des composants clés, inhibant ainsi la synthèse des parois cellulaires, des acides nucléiques et

des protéines, perturbant efficacement les fonctions essentielles des micro-organismes. [75, 76]. Ils ont été approuvés par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis [77]. Les AMPs peuvent être utilisés dans le secteur de la santé, de l'agriculture, de l'alimentation et de l'emballage [78, 79]. Les peptides antimicrobiens peuvent être intégrés dans un film pour produire un emballage antimicrobien. L'AMP le plus fréquemment mentionné pour l'emballage actif est la nisine. Des études récentes ont montré qu'un film antimicrobien à base de nisine restait stable pendant jusqu'à 14 jours dans des conditions physiologiques. [80]. Les recherches font état principalement d'une utilisation des AMPs dans un milieu aqueux [81]. La stabilité de ces petits fragments de peptides en dehors des conditions physiologiques est questionnable. De plus, les procédés de production et de purification des AMPs les rendent très coûteux, et les éloignent leur intérêt pour des produits comme les emballages ou les aliments [82]. Enfin à cela s'ajoute le risque en cas d'exposition à haute dose des maladies inflammatoires secondaires telles que la rosacée, la dermatite atopique ou le psoriasis peuvent être déclenchées par des réponses immunitaires excessives ou dysrégulées [83].

2.1.6.1. *Les bactériophages*

Les bactériophages, virus dont le nombre est estimé 10^{31} dans la biosphère, sont des organismes procaryotes, ubiquitaires et prédateurs naturels des bactéries. Leurs utilisations pour des applications alimentaires sont encadrées par différentes instances à l'international. Aux États-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) valide leur utilisation dans le 21 CFR§172.785 et limite la concentration en bactériophages à 10^9 PFU/mL/500cm². En Europe, l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne

Alimentaire (AFSCA) valide leur utilisation dans la production alimentaire conformément au règlement N°853/2004.

Plus de 5000 bactériophages ont été identifiés ; ils sont principalement répartis en trois familles, *Siphoviridae* (61%), *Myoviridae* (25%) et *Podoviridae* (14%). La vaste majorité des bactériophages mesure entre 20nm et 200nm. Leur classification dépend de la physiologie de la capside, lieu de stockage du génome (icosaédrique, pléomorphique, polyédrale), du type de gaine intermédiaire, des fibres et du matériel génétique (ARNss+, ARNs, ADNss ou ADNds) (cf Figure 2-4 ci-dessous) [32, 33]. Les bactériophages sont monovalents, ils ont pour cible un à deux types d'espèces bactériennes. Cette spécificité constitue un atout de précision dans l'élimination d'espèces cibles.

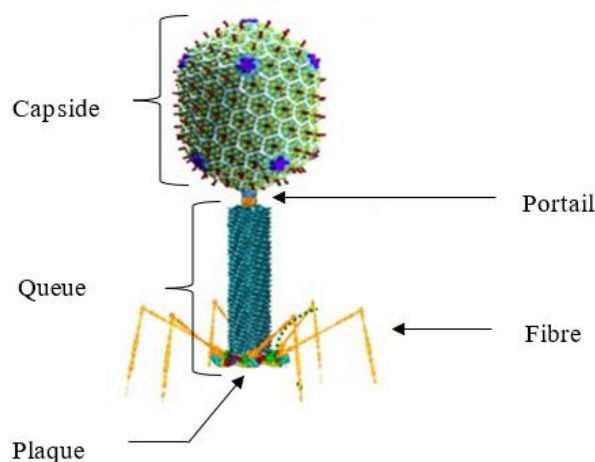


Figure 2-4. Bactériophage T4 de la famille des Myoviridae

Les bactériophages, parasites obligatoires des cellules bactériennes se propagent uniquement par parasitisme. La reconnaissance des molécules de surface des cellules bactériennes s'effectue par des marqueurs présents sur les fibres des phages. Chez les bactéries gram négatives, un lipo-polysaccharide de surface (LPS) et des protéines

membranaires (OmpC) jouent le rôle de marqueurs de surface. Pour les bactéries gram positives, les acides téichoïques et lipotéichoïques permettent la reconnaissance des bactériophages. Le processus de pénétration du matériel génique phagique dépend de la famille du virus. Les *Myoviridae* insèrent leur matériel génétique en perçant la membrane alors que les *Podoviridae* utilisent des enzymes pour altérer la membrane avant l'injection de leur génome. Après injection, le matériel génétique se recircularise ; deux types de cycle sont possibles : le cycle lysogénique et le cycle lytique. Dans le premier cas, il y a intégration du génome viral au génome bactérien. Cette construction appelée prophage est non létale et permet d'utiliser la réplication bactérienne pour dupliquer les nucléotides viraux intégrés au génome. Parfois, il est possible que le matériel génétique du bactériophage se sépare de l'ADN bactérien pour lancer un cycle lytique. Dans le cycle lytique, le génome viral présent dans le cytoplasme détourne les fonctions de réplication et de synthèse à son avantage. De multiples copies du matériel génétique et des composants du squelette formant les bactériophages vont être synthétisés. Par la suite les phages vont s'assembler et intégrer les génomes copiés. Enfin, les phages produisent une enzyme qui va détruire la bactérie hôte et aboutir à leur libération [34, 35]. Les différents mécanismes sont résumés dans la Figure 2-5 ci-dessous.

L'action lytique des bactériophages est recherchée pour le contrôle des populations bactériennes. Néanmoins leur utilisation comporte plusieurs défis selon le domaine cible. Il existe une relation de quantité entre les bactériophages et leurs hôtes. Une bactérie infectée libère, après lyse, environ 100 à 300 bactériophages. C'est pourquoi la quantité de bactéries ne doit pas trop dépasser la quantité de bactériophages au risque de voir la

croissance de la population bactérienne prendre le dessus par rapport à la vitesse de cycle de réplication des bactériophages [36].

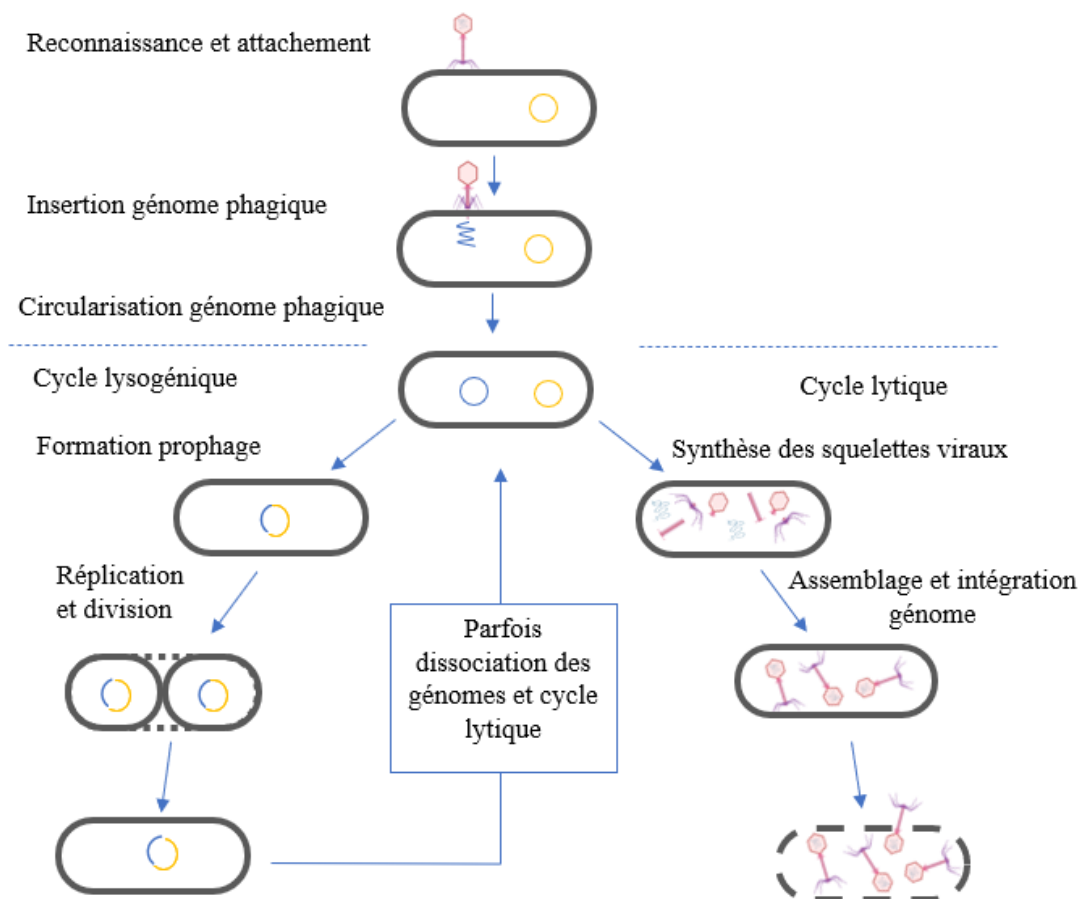


Figure 2-5. Mécanismes d'actions des bactériophages

Tout comme les bactéries, les bactériophages sont sensibles aux variations de pH, de température, de salinité et de force ionique.

La sensibilité à des pH trop acides ou trop basiques est connue depuis longtemps. En 1946, lors d'une étude, Sharp et ses collaborateurs ont démontré ce phénomène sur les bactériophages T2. Les pH testés par les auteurs allaient de pH2 à pH11 ; les résultats modélisaient une courbe en cloche avec un maximum d'activité autour de pH7 et une

stabilité de pH5 à pH9. Les auteurs ont conclu à une perte d'activité aux pH extrêmes par agglomération des virus [84]. La température limite des bactériophages est propre à chaque espèce. Certaines espèces ont été détectées dans des sources d'eau chaude en Californie. Les températures des sites de prélèvement étaient d'environ 40°C à 90°C. Les phages étaient très actifs, avec un temps de renouvellement de la population de 1 à 2 jours [85]. Certains phages, tels que T4, T5 et T7, spécifique d'*Escherichia coli* sont restés viables entre 10 à 20 ans à 4 °C [86]. Enfin, les bactériophages peuvent être rendu inactifs suite à un stress osmotique. Dans une étude réalisée par Whitman et al., une solution de saccharose à 2 mol/L a réduit l'activité de PS1 spécifique à *Pseudomonas* de 50 % ; on atteint une réduction de 99 % lorsqu'il est dilué dans une solution de NaCl à 4 mol/L [87].

2.1.6.2. Bactériophage P100

En raison de leur spécificité inhérente, les bactériophages possèdent le potentiel de cibler précisément une contamination bactérienne, sans compromettre la viabilité d'autres micro-organismes dans le milieu d'action. Dans ce travail le bactériophage P100 spécifique de *Listeria monocytogenes* provient d'une solution commerciale. Le P100 est l'un des rares phages virulents connus pour être strictement lytique et donc invariablement létaux pour une cellule bactérienne une fois l'infection établie [88]. La bactériophage P100 appartient à la famille des *Myoviridae*, son génome est un ADN double brins d'environ 134kb codant pour 193 gènes, 3 nucléotides et 348 protéines [89, 90]. La structure de P100 et son mode d'actions sont similaire à celle présenté par la Figure 2-4 et 2-5 à la page 45 et 47. Néanmoins l'activité antibactérienne des bactériophages dépend de la stabilité des protéines qui les composent.

La température de conservation des bactériophages est un autre facteur essentiel dans la stabilité de leur activité dans le temps. L'intégration des phages dans un emballage sous-entend un passage d'un milieu liquide à un dépôt en surface d'un solide par un séchage. La compréhension des résistances des bactériophages au changement physicochimique du milieu permettra sa stabilisation pour conserver son infectivité.

Dans une étude réalisée par Ahmadi et al. (2017), les auteurs ont étudié l'effet de la température sur la réduction de la population de phages (en PFU/mL) [91]. Une série d'expériences sur la récupération de l'activité après traitement thermique a démontré que les phages se régénèrent mieux à des températures qui tendent vers 4°C que 25°C et plus. Enfin, les auteurs ont théorisé une température de fusion (T_m) qui correspondait à la perte de configuration tridimensionnelle de 50% des protéines après choc thermique. Les températures théoriques en fonction de différentes protéines sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2-1. Températures théoriques de dénaturation des protéines du phage P100

Fonction	Protéine	T_m (°C)
Protéine de liaison tête queue	gp18	>65
Composant de la queue liée aux fibres latérales	gp19	≈58
Moyeu de l'hydrolase	gp29	55-65
Protéine de liaison fibres/queue	gp30	≈59
Protéine de plaque	gp32	55-65
Protéine de liaison récepteur/fibres	gp39	55-65
Protéine portail	gp14	55-60

Ces analyses se basent sur la séquence en acides aminés de chaque protéine. Les températures de résistance indiquées sont purement théoriques et ne tiennent pas compte

du microenvironnement dans lequel le bactériophage évolue mais donnent néanmoins des indications sur de potentielles limites.

Dans une étude de 2016, réalisée sur le bactériophage P100 et analysant différents facteurs influençant l'efficacité d'infectivité phagique, les auteurs ont testé différents pH (2,3,4,5-10,11 et 12) et mesuré le nombre de log de réduction sur 24h. Les résultats ont montré que P100 n'avait pas subi de réduction significative (baisse d'environ 0,5log) lors des incubations à des pH compris entre 5 et 10 [92]. La concentration des ions hydrogène modifiait l'agrégation des phages lorsque le pH était inférieur ou égal au point isoélectrique des phages [86, 93].

Les bactériophages sont très sensibles à la déshydratation, la couche d'eau liée à la protéine qui les compose permet de conserver sa structure tridimensionnelle. Un changement dans la quantité d'eau dans le proche environnement conduira à une atteinte de l'intégrité physique et ainsi à son infectivité. La question de la résistance à la déshydratation est abordée à la partie 2.2.2 Stabilisation des bactériophages sans support.

2.1.7. Récapitulation

La lutte contre les pathogènes alimentaires impose un constant développement pour assurer une sécurité sanitaire pérenne. L'utilisation des nanoparticules est prometteuse mais ne possède pas suffisamment de recul sur la toxicité à long terme. Les huiles essentielles sont confrontées principalement à leur coût de production. Les bactériophages se démarquent par leur très haute spécificité envers les cibles, la diversité des souches et leurs limites de viabilité pour une élimination en fin de vie.

2.2. Stabilisation des bactériophages

Dans cette partie, les stratégies de stabilisation des bactériophages sont présentées. Précédemment, il a été décrit que les différences de stabilité des phages sont fonction des conditions physicochimiques du milieu ou du support.

2.2.1. *Adsorption des bactériophages sur un support de biopolymères*

L'adsorption des bactériophages peut être réalisée par plusieurs techniques. La stabilité des bactériophages sur un support présente aussi des variations en fonction des caractéristiques physicochimiques de la surface de dépôt. L'immobilisation des bactériophages peut être réalisée par des méthodes dites de chimiosorption ou physiosorption. [94, 95].

2.2.1.1. *Procédés de chimiosorption*

L'immobilisation de bactériophages par protéine ligand est irréversible. Par exemple, la straptavidine est une protéine ayant une grande affinité pour la biotine ; celle-ci peut être activée par du N-hydroxysuccinimide (NHS) et liée à un aminé terminal d'une protéine composant le bactériophage [96, 97]. D'autres approches de liaisons protéine - ligand font appel à l'ingénierie génétique. L'objectif est de modifier une séquence pour créer un site de fixation dans la capsid du bactériophage [98].

Les bactériophages peuvent être aussi immobilisés sur un support par liaison covalente avec un acide aminé de la capsid tel que la lysine, l'acide glutamique, l'acide aspartique ou la cystéine. Les ancrages du support sont généralement des groupements acides carboxyliques. La liaison covalente peut être réalisée par activation des

groupements de surface du support via un composé chimique, exemple EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride), par changement de pH ou par dépôt de groupements ionisés par un plasma [99-101].

Les techniques de chimiosorption d'immobilisation par protéine ligand et par liaisons covalentes sont très précises et conduisent à une stabilité durable de l'activité des bactériophages. Cependant, elles restent très coûteuses pour le développement d'un produit à faible valeur ajoutée comme un emballage alimentaire. Des techniques moins onéreuses d'adsorption de bactériophages sont plus adaptées au développement d'un emballage.

2.2.1.2. Procédés de physiosorption

Les techniques d'adsorption physique et de charges optimisées du support sont aussi appelées physiosorption. Elles sont plus simples à mettre en œuvre que les techniques de chimiosorption citées précédemment ; cependant différents inconvénients demeurent. Ces procédés reposent sur l'attraction charge – charge entre un support et le bactériophage. L'adhésion s'effectue à la surface par la force de Van der Waals, par des interactions hydrophobes et par des moments dipôle – dipôle. Ces dernières sont réversibles, la qualité de l'attraction dépend des conditions physicochimiques du milieu. Les changements de pH, de température et de force ionique sont susceptibles de perturber les interactions d'immobilisation [102, 103]. L'optimisation des charges de surface permet de renforcer l'adsorption des bactériophages sur le support. Des travaux font état de l'activité de bactériophages en fonction de leurs interactions électrostatiques avec des polymères de surface. Les phages sont considérés comme chargés positivement aux fibres

d'accroche et négativement à la capside. En se basant sur ces caractéristiques, il est possible de choisir l'orientation des virus sur le support. En 2011, Anany et al. ont réalisé l'immobilisation d'un cocktail de phages contre *E.coli* et *Listeria* sur de la cellulose modifiée à 0,5% de PVA (polyvinylamine). Les auteurs ont conclu à l'efficacité de l'immobilisation des bactériophages lors d'un ajout de charge cationique [104]. L'application d'une couche de polymère présentant une surface cationique permet l'ancrage par la capside et l'orientation des bactériophages. Dans ses travaux, Vonasek et ses collaborateurs ont étudié l'effet d'orientation des bactériophages grâce à un revêtement de PEI/chitosane [105]. Dans une étude parue en 2017 sur la stabilisation de bactériophages T4, les auteurs ont mis en évidence une meilleure activité antibactérienne des phages déposés sur des papiers à caractère acide que sur des papiers fonctionnalisés basiques (CMC et chitosane). Les résultats obtenus correspondaient à l'inverse de ceux observés sur des bactériophages en solution. Dans leur conclusion, Meyer et ses collaborateurs ont souligné l'importance de l'adsorption/désorption des bactériophages pour obtenir une activité antibactérienne optimale [106]. De plus, il est observé dans d'autres travaux que l'ajout d'ions cationiques en solution permet de désagréger les bactériophages entre eux par un phénomène de répulsion entre les charges. L'état dispersé présente un meilleur résultat sur l'activité antibactérienne [92, 107].

2.2.1.3. *Comparaison entre chimiosorption et physiosorption*

Les différences d'efficacité d'immobilisation entre les chimiosorptions et physiosorptions ont été étudiées. Dans une étude publiée en 2018, Stéphanie Bone et ses collaborateurs étudièrent le rendement de fixation en fonction de ces différentes stratégies de sorption sur des particules de silicium. Les auteurs conclurent à une fixation des bactériophages 2,5 fois supérieure dans le cas de chimiosorption. Cependant, la publication ne fait pas état d'une quelconque activité antibactérienne des constructions bactériophages – particules [108]. En 2021, une équipe de chercheurs de l'Université de Corée à Séoul a également étudié les différentes attractions (chimiosorption et physiosorption) du polycaprolactone fonctionnalisé. Les auteurs ont réalisé des essais de bioactivité sur de la viande de bœuf. Les résultats ont démontré que l'adsorption chimique permet une meilleure activité antibactérienne que l'adsorption physique. Les auteurs ont également souligné l'importance de l'orientation des bactériophages : ils ont estimé qu'environ 30% des bactériophages sont mal orientés et ne possèdent pas d'activité [109]. Dans le Tableau 2-2 sont résumées les différentes stratégies d'immobilisation sur support des bactériophages [95].

Tableau 2-2. Résumé des techniques d'adsorption

Techniques	Avantages	Inconvénients
Protéines ligand	Adsorption forte et efficace Orientation optimisée	Procédé compliqué et coûteux
Liaisons covalentes	Adsorption forte et très bonne stabilité dans le temps Orientation optimisée	Procédé pouvant être coûteux et complexe
Adsorption physique	Simple et peu coûteux désorption facilitée	Faiblement adsorbé Faible contrôle
Charge optimisée du support	Maîtrise de l'orientation des bactériophages Adsorption forte et efficace	Charge de surface peut être non désirée

Dans les études citées précédemment, les supports des bactériophages sont conservés immergés dans un tampon. La conservation dans un milieu liquide est un moyen de conservation optimal, mais non réaliste lors d'application réel pour l'emballage. L'humidité est un facteur connu ayant un impact sur l'activité des bactériophages. Sur un support, le séchage lent conduit à une diminution de l'activité [110].

La stabilité des bactériophages lors d'un séchage sur support est plus largement décrite dans la littérature pour les techniques de physiosorption. Les polymères additionnés en surface permettent de modifier les propriétés de base du papier. Ils offrent plusieurs avantages : protection et stabilité des bactériophages, augmentation des propriétés du papier de base.

2.2.2. Stabilisation des bactériophages sans support

Les phages peuvent aussi être conservés sans adsorption sur un support optimisé décrit précédemment. Dans ce cas, les bactériophages sont conditionnés sous forme de poudre conservant leur intégrité physique et fonctionnelle. Les techniques utilisées peuvent être la lyophilisation et l'atomisation.

2.2.2.1. Lyophilisation

Très utilisée pour la conservation de produits pharmaceutiques, de vaccin, de souche bactérienne et virale, la lyophilisation est faite sous de multiples formes. La lyophilisation (freeze drying en anglais) est un procédé qui consiste à éliminer l'eau d'un échantillon en le congelant dans un premier temps, puis en sublimant la glace à une pression réduite [111]. Le procédé permet de maintenir les phages stables plusieurs mois à des températures d'entreposage comprises entre 4°C et 20°C [112, 113]. Une étude réalisée en 1988 sur la conservation de phages anti *S.aureus* fait état d'une stabilité de 12 à 18 ans sous vide à -20°C [114].

La durée de l'opération est généralement comprise entre 20 et 40 heures. À titre d'exemple, dans l'étude de Slíwka *et al.* (2023), les auteurs ont réalisé la lyophilisation de bactériophages T4. Dans un premier temps, l'enceinte est refroidie jusqu'à -36°C (0,5°C/min, soit environ 2h), puis maintenue pendant 19h à 0,20 mbar. Dans un deuxième temps, maintien de l'enceinte à -10°C et 0,18 mbar pendant 1h30. Pour terminer, maintien à une température de 5°C et 0,16 mbar pendant 4 heures [115].

Autre méthode possible, la lyophilisation couplée à une pulvérisation atmosphérique, en anglais ASFD, pour *Atmospheric Spray Freeze-Drying*. Bien que relativement récente, l'ASFD est une technique décrite comme prometteuse pour la conservation d'échantillons fragiles comme les protéines, les virus et les vaccins [116-118]. La solution est atomisée vers le bas dans un courant de gaz inerte froid et sec. Les gouttelettes, rapidement congelées, se déposent au fond de la chambre formant une couche de poudre. Contrairement à la lyophilisation classique formant un solide nécessitant un broyage, dans le cas de l'ASFD le produit fini est une fine poudre [119].

Pour optimiser la stabilité des bactériophages lors de la formation de glace, des excipients sont ajoutés à la solution avant la lyophilisation. Différents sucres, acides aminés et polymères tels que le tréhalose, le saccharose, le mannitol, la leucine ou le PEG sont fréquemment utilisés. [120-122]. Les excipients sont le plus souvent constitués d'un sucre et d'un acide aminé. Les polysaccharides réduisent l'activité de l'eau, tandis que les acides aminés diminuent l'absorption d'eau à la surface des poudres [123, 124].

2.2.2.2. *L'atomisation*

Le liquide contenant les bactériophages et les excipients est pulvérisé dans une chambre, vers le bas sous forme de microgouttelettes. Un flux d'air chaud ascendant d'environ 60°C sèche l'ensemble pour aboutir à la formation d'une poudre [125, 126].

Les excipients utilisés pour l'atomisation sont les mêmes que pour la technique de lyophilisation. Les excipients choisis ne cristallisent pas sous l'action de la chaleur. La conservation de l'eau liée aux phages dépend de la présence de sucre à l'état amorphe. La stabilité optimale des bactériophages dans le temps relève plus d'une humidité basse

($\leq 60\%RH$) que de la température (entre 4°C et 25°C) [127]. Les travaux de Leung *et al.* (2017) font état d'une perte de seulement presque 2 log en 12 mois de conservation à 4°C et 22% d'humidité [128]. Selon plusieurs études, la perte d'activité des bactériophages dans une matrice initialement déshydratée est due au stress mécanique induit par une augmentation d'humidité. Pour limiter ce stress, la réhydratation doit être instantanée. Ainsi, l'adsorption d'eau conduit à une recristallisation causant une expulsion de l'eau liée au réseau. La faible granulométrie des poudres permet une réhydratation instantanée, limitant le stress de la réhydratation lente [129, 130].

2.2.3. Récapitulation

Les méthodes de stabilisation des bactériophages sont multiples, mais bon nombre d'entre elles présentent des freins technologiques liés au domaine papetier. L'application d'un couchage est maîtrisée par cette industrie, mais les bactériophages sont sensibles au changement physicochimique du milieu. Les techniques de lyophilisation et d'atomisation bien que présentées comme très efficaces sont loin de l'équipement des papetiers. De plus, les durées des opérations et les coûts élevés associés aux matériels et consommables sont des freins majeurs pour ce domaine. Néanmoins, les excipients ajoutés aux solutions d'atomisation et de lyophilisation peuvent être adaptés lors d'un couchage. La stabilité de la conformation des bactériophages lors du séchage sur un support pourrait être augmentée grâce à l'ajout d'excipients aux solutions.

2.3. Revêtement à base de biopolymères

L'application directe d'agents antimicrobiens sur la surface de produits alimentaires présente des résultats controversés tant sur la stabilité des agents que sur leur efficacité. Leur protection au sein d'une matrice est donc une stratégie importante pour résoudre ces problèmes [131, 132].

2.3.1. Contact alimentaire et réglementation

La majorité des additifs indirects et des polymères est réglementée par la FDA et consignée dans le 21CFR174 à 178. Dans la partie 175, on trouve les adhésifs et les composants de revêtement ; dans la 176, les composants des papiers et cartons ; les polymères apparaissent dans la partie 177 ; les adjuvants et les substances de désinfection dans la partie 178. À cela s'ajoute la partie 180 listant les additifs alimentaires entrant aussi dans la composition d'emballages. En 21CFR182, on trouve la liste des substances reconnues comme sûres, GRAS en anglais (Generally Recognized as Safe). De plus les annexes 184 et 186 au 21CFR182 répertorient les substances directes et indirectes au contact alimentaire.

La FDA fixe également l'apport maximum quotidien cumulé de substances GRAS (CEDIs -cumulative estimated daily intakes). Les doses limites d'exposition et d'utilisation sont consultables en ligne dans leur base de données. Pour les législations européennes, la réglementation N°1935/2004 encadre les matériaux et les objets destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires.

Dans le cadre de ces réglementations, une présentation des biopolymères considérés comme sûrs pour la santé des consommateurs est abordée.

2.3.2. *Biopolymères de revêtement*

Les polymères d'origine animale sont exclus pour des raisons éthiques. Les polymères présentés tiennent compte de la réalité technico-économique de l'industrie papetière et notamment la sécurisation de l'approvisionnement en matières premières, facteur important dans le développement des procédés industriels.

2.3.2.1. *L'amidon*

L'amidon est présent dans la plupart des plantes et tissus végétaux ; sa grande abondance en fait un produit bon marché. Présent sous forme de granules, il constitue une réserve glucidique pour les cellules végétales. La quantité et la taille de ses grains sont variables selon les espèces végétales. L'amidon est constitué principalement de deux composants : l'amylose et l'amylopectine. Leurs structures sont présentées dans la Figure 2-6. L'amylose est un polysaccharide de glucose non ramifié lié par liaison $\alpha(1\rightarrow4)$; l'amylopectine a le même enchaînement mais avec des ramifications en $\alpha(1\rightarrow6)$ [133].

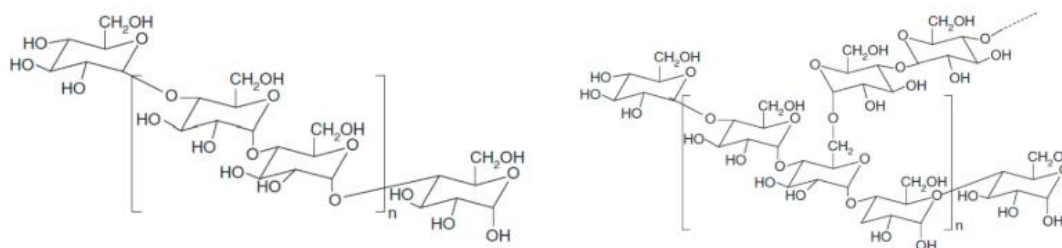


Figure 2-6. Structure de l'amylose et de l'amylopectine

L'amidon est une molécule très hydrophile ; la formation de film est basée sur la propriété de gélification dont les caractéristiques finales dépendent des proportions d'amylose et d'amylopectine. Lors de la gélification de l'amidon, la viscosité dépend de la quantité en amylopectine : plus la concentration est élevée, plus la viscosité est haute. L'amylopectine impacte favorablement la solubilité et l'absorption d'eau. L'amylose apporte une résistance grâce aux régions cristallines ; l'augmentation de l'amylose rend les films plus rigides, plus résistants mais moins extensibles et donc plus cassants [134, 135]. Les différentes proportions d'amylose et d'amylopectine ainsi que leurs cristallinités, présentées dans le Tableau 2-3 varient d'une espèce végétale à une autre.

Tableau 2-3. Composition de l'amidon en fonction de l'origine botanique [123]

Source	Cristallinité (%)	Amylose (%)	Amylopectine (%)
Riz	38	20-30	80-70
Pomme de terre	23-53	23-31	77-69
Manioc	31-59	16-25	84-75
Blé	36-39	30	70
Maïs	43-48	28	72
Sorgho	22-28	24-27	76-73

La gélification de l'amidon peut être réalisée par méthode thermique. La température de gélification est comprise entre 60°C et 80°C selon sa composition. Les grains d'amidon en solution gonflent ; la température agit comme un catalyseur dans la désorganisation tridimensionnelle initiale des chaînes d'amylose et d'amylopectine ; on

observe ainsi une perte de cristallinité. Les chaînes vont s'étendre et former un réseau emprisonnant de l'eau. La gélification de l'amidon a lieu lors de l'étape de refroidissement où les chaînes se réarrangent ; l'amylose regagne sa cristallinité et conserve de l'eau entre les chaînes. L'amidon gélifié subit dans le temps un phénomène de rétrogradation, les chaînes se réorganisent, la structure se modifie et provoque une sortie d'eau du réseau [136, 137].

Il est possible d'augmenter la stabilité du gel d'amidon en effectuant une réticulation avec certains acides. Si l'acide citrique est le plus utilisé, l'acide malonique est également présent. L'ajout d'acide citrique permet une réticulation et des interactions entre les groupements alcools des chaînes d'amylose et d'amylopectine, et une meilleure rétention d'eau dans le réseau. Les liaisons hydrogènes confèrent au gel en formation une meilleure résistance mécanique que l'amidon gélifié sans acide citrique [138, 139]. L'acide citrique, à température élevée, est susceptible de dégrader partiellement l'amidon. Olsson et collaborateurs ont proposé de l'ajouter après le début de la gélification pour protéger l'amidon [140]. Lors du séchage, l'eau emprisonnée va sortir et former des espaces de vide dans la couche déposée. Le caractère hydrophile de l'amidon et la porosité induite permettront d'absorber l'eau de son environnement.

Ce caractère hydrophile de l'amidon peut être ajusté par réaction chimique. Dans le domaine papetier, les industriels utilisent de l'amidon cationique pour augmenter la résistance du papier, favoriser l'accroche d'une couche supérieure et faciliter le drainage. Il est possible de synthétiser l'amidon cationique par éthérification de l'amidon avec du 3-chloro-2-hydroxy-propyl trimethyl ammonium chloride (CHPTAC) ou le 2,3-

epoxypropyl trimethyl ammonium chloride (EPTAC) en milieu alcalin et par réaction d'estérification avec l'hydrochloride de betaine ou le N-chlorobetainylchloride, en présence de réactifs tels le disopropylcarbodiimide, de 4-diméthylaminopyrimidine. Pour la synthèse de l'amidon cationique, les réactifs les plus utilisées sont le CHPTAC ou l'EPTAC. En solution alcaline, le CHPTAC forme l'EPTAC qui va ensuite réagir avec une unité d'anhydroglucose (AGU) et former un alkoxide. Enfin, par substitution nucléophile, le 2-hydroxypropyltriméthylammonium s'attache à la chaîne d'amidon comme le montre la Figure 2-7 [141].

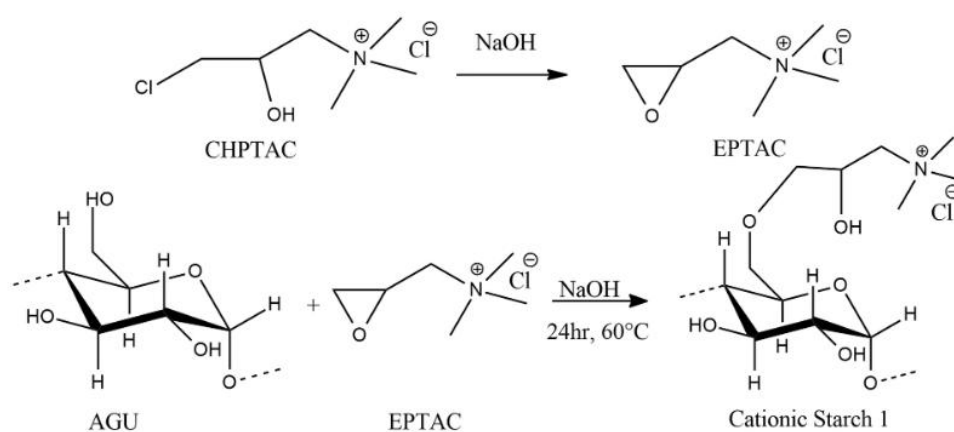


Figure 2-7. Synthèse d'amidon cationique par CHPTAC en milieu alcalin

L'amidon cationique entre dans la composition de film ; on retrouve des assemblages avec de la cellulose ou de l'alginate [142, 143].

2.3.2.2. *La pectine*

La pectine est un polymère naturel structurel présent dans toutes les plantes. Elle sert de renfort et de cohésion dans les parois cellulaires en association avec la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Très utilisée dans l'industrie agroalimentaire comme épaississant, stabilisant ou émulsifiant, la pectine est composée principalement d'un enchaînement d'homogalacturonan (environ 65%) lié par des liaisons α (1 $\rightarrow$ 4). Le groupe carboxyle du sixième carbone est parfois méthylé. En fonction du degré d'estérification, on parle de pectine faiblement méthoxylé (LMP - Low methoxyl pectine) ou hautement méthoxylé (HDP - High methoxyl pectine). La structure est présentée dans la Figure 2-8. À cela s'ajoute le rhamnogalacturonan-I (RG-I environ 20-35%) et le rhamnogalacturonan-II (RG-II environ 10%). Les rhamnogalacturonans I et II ont des ramifications de différents sucres tels l'arabinose, le galactose, le fructose [144]. Les pectines sont classées en deux groupes HMP et LMP ; la gélification de la pectine est dépendante du degré d'estérification (DE) des groupes carboxyles [145].

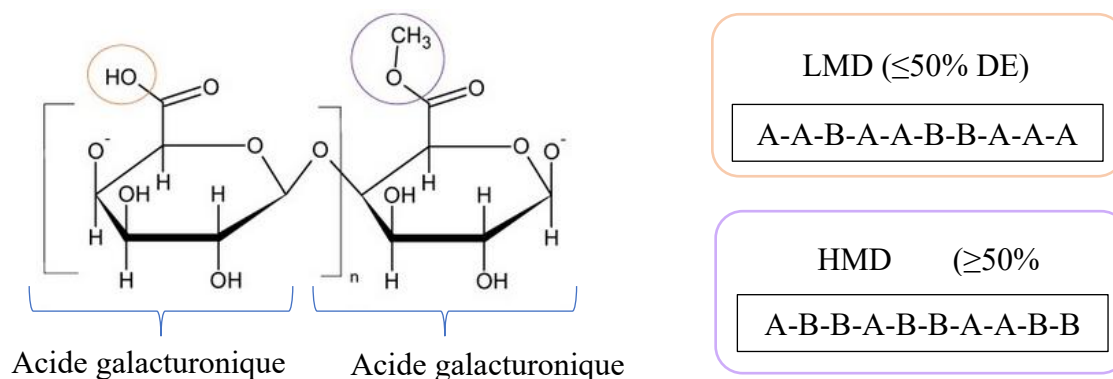


Figure 2-8. Structure chimique de l'homogalacturonan

Les pectines HMP possèdent un degré d'estérification comprise entre 50-80%. La gélification est préférentiellement effectuée à pH acide (2,5-3,5). Ce pH favorise la

réaction de gélification par la présence de liaisons hydrogènes entre les chaînes de pectine. La présence des oses diminue l'activité de l'eau et stabilise les interactions hydrophobes facilitant ainsi la gélification. Dans le cas de pectine LMP, l'estérification est inférieure à 50% et la gélification est dépendante de cations divalents (le calcium, le sodium, le potassium...). En présence de cations, les groupements carboxylés des homogalacturonan vont créer des liaisons ioniques entre eux. La géométrie adoptée par la réaction de gélification est décrite comme une structure de « boîte d'œuf » [146]. Pour une optimisation de la réaction de gélification, il est aussi possible de faire varier plusieurs facteurs : la température, le pH, la quantité d'oses en solution ou la concentration de cations divalents [147]. En se basant sur les propriétés de réticulation, il est possible de fabriquer des emballages à partir de films mono-polymériques ou multi-polymériques. [148]. Dans une publication de 2019, Mazyar Makameri et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la pectine sur le caractère hydrophobe dans la formation d'emballages et observé une légère augmentation de l'hydrophobie de surface [149]. On relève dans la littérature plusieurs exemples d'incorporation d'agents bioactifs tels que des antioxydants, des huiles essentielles à action antibactérienne et des bactériophages [150-152].

2.3.2.3. *La carboxyméthylcellulose*

La carboxyméthylcellulose (CMC) est obtenue à partir de la cellulose par transformation chimique. D'après les travaux de Heinze en 1999 sur la synthèse et la caractérisation de la CMC, il faut 5 grammes de cellulose placés dans 150mL d'isopropanol, sous agitation continue, auxquels on ajoute, par goutte à goutte, 13.5mL d'hydroxyde de sodium (5 à 30%). Après une heure de réaction, on ajoute 6g de sodium chloroacétate ; le mélange est alors chauffé à 55°C pendant 5h. La solution est ensuite filtrée, neutralisée et nettoyée par des lavages à l'éthanol et à l'acide acétique. Enfin le produit, purifié, est séché à 60°C. Un résumé de réaction est présenté par la Figure 2-9.

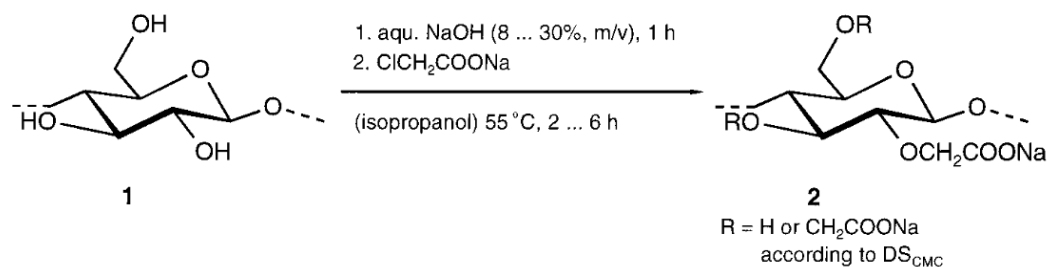


Figure 2-9. Synthèse et Structure de la carboxyméthylcellulose (CMC)

Le greffage des groupements carboxyméthyl sur la cellulose augmente le caractère hydrophile. Plus le degré de substitution est élevé, plus le caractère hydrophile est important. L'absorption d'eau et le gonflement sont des caractéristiques intéressantes pour différentes industries. La CMC est sélectionnée dans l'industrie agroalimentaire comme épaississant. Elle est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour réaliser des encapsulations de substance dans des hydrogels [153]. La carboxyméthylcellulose sert aussi de composant dans la formation de films à contact alimentaire [154, 155].

2.3.2.4. L'alginate

L'alginate est un polysaccharide qui peut être produit à partir de plusieurs algues brunes, principalement *Laminaria hyperborean*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* [156]. Certaines bactéries sont capables de synthétiser l'alginate comme exopolysaccharide ; c'est le cas de *Azotobacter vinelandii* ou de *Pseudomonas aeruginosa* [157]. La production mondiale d'acide alginique représente, en 2013, l'équivalent de 30000 tonnes sèches provenant des fermes algales de *Laminaria* et *Macrocystis*. L'alginate représente environ 40% du poids sec des algues [92]. Elle est composée d'un ratio variable d'acide β -D-mannuronique lié par une liaison osidique $\alpha 1 \rightarrow 4$ à l'acide α -L-mannuronique. Leurs structures sont présentées dans la Figure 2-10.

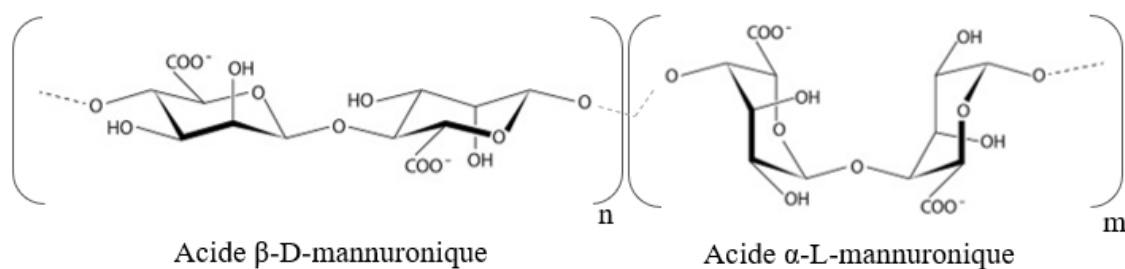


Figure 2-10. Structure de l'alginate [147]

L'alginate, en présence de cations divalents tel le Ca^{2+} , est capable de construire par réticulation (crosslinking) des réseaux tridimensionnels appelés « boîte d'œuf ». L'induction de la gélation de l'alginate peut être réalisée par induction ionique ou par changement de pH. À pH acide, les groupements carboxylates vont se protoner et former un groupe d'acides carboxyliques favorisant la formation d'un réseau par liaison

hydrogène. Cependant si le pH devient trop acide, il y a possibilité de dégradation du polymère [158, 159].

L'utilisation de l'alginate dans la formation des films à contact alimentaire ou des solutions de couchage est très largement étudiée. L'alginate est utilisé dans les emballages pour ses propriétés hygroscopiques nécessaires au prolongement de la durée de vie des fruits et légumes. Il est également associé à d'autres biopolymères comme le chitosane ou l'amidon [160-164]. Lors de la formation des films et des solutions de couchage, les auteurs ajoutent des composés plastifiants et réticulants pour améliorer les caractéristiques mécaniques. Les différentes substances sont détaillées dans la partie 2.3.3 "additifs aux biopolymères de revêtement". Les assemblages multi-polymériques développés peuvent être également les supports de molécules antioxydantes, de substances antibactériennes comme les huiles essentielles, les nanoparticules ou les bactériophages [162].

2.3.2.5. *Les carraghénanes*

Les carraghénanes sont des polysaccharides de la famille des galactanes sulfatés, extraits d'algues rouges tels que *Kappaphycus* et *Eucheuma*. La production mondiale des carraghénanes est d'environ 7000 tonnes (en masse sèche) en 2016 [165]. Il en existe trois types principaux : kappa (k), iota (i) et lambda(λ). L'unité de répétition est un disaccharide, α -D-galactopyranose liaison 1,3 avec β -D-galactopyranose dont les différences résident dans la position des groupements sulfates. Celles-ci sont résumés dans la Figure 2-11 [166].

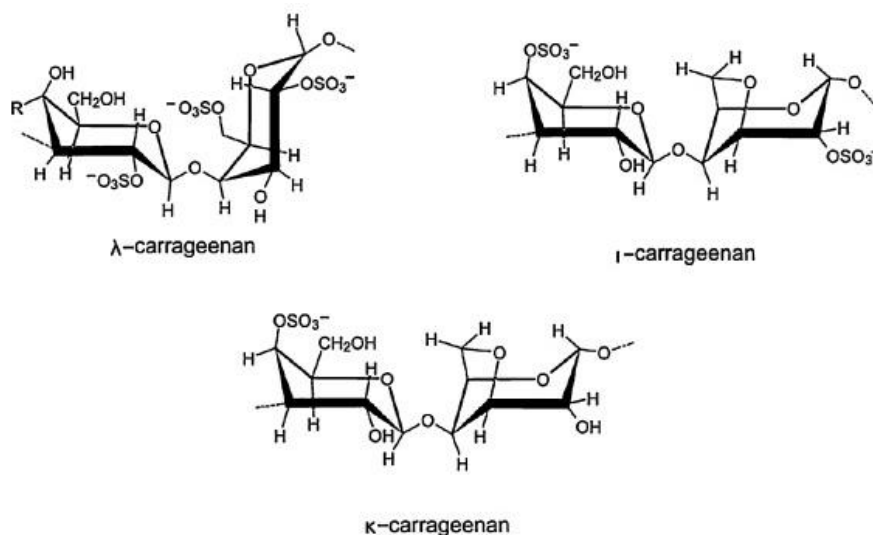


Figure 2-11. Structure des carraghénanes, iota, kappa et lambda

La différence de positionnement des groupements sulfates modifie les applications. Les carraghénanes-lambda ne forment pas de gel mais augmentent la viscosité. Les carraghénanes-iota forment des gels stables, élastiques et clairs en présence de calcium. Enfin, les carraghénanes-kappa forment un gel rigide et légèrement opaque en présence de potassium. Ce dernier type de carraghénane fait l'objet de nombreuses publications relatives à la formation de films d'emballage [167-169]. La gélification des κ -carraghénanes est réalisée à 80°C, elle est néanmoins thermoréversible. La température conduit à la formation d'hélice alpha. Les groupements sulfates (SO_3^-) électronégatifs sont attracteurs de cations. Les ions potassium ajoutés agrègent les hélices alpha et forment un gel. Ils sont très hydrophiles en tant qu'hydrogel mais se transforment en film d'emballage absorbant pour la conservation de nourriture. Si les propriétés d'absorption d'humidité sont conservées dans une moindre mesure, ils restent de bons matériaux pour les denrées alimentaires dites humides [165, 170].

2.3.2.6. *Le chitosane*

Le chitosane est un biopolymère préparé à partir de la chitine native. La chitine est un polysaccharide linéaire composé du (1-4)-2-acétamido-2-désoxy- β -D unités de glucopyranose liées. Les structures sont présentées dans la Figure 2-12. La chitine est très abondante dans les exosquelettes des crustacés, les cuticules d'insectes et les champignons. Sa production s'élève à environ $10^{12} - 10^{14}$ tonnes par an, dont environ 70 % proviennent d'espèces marines [171].

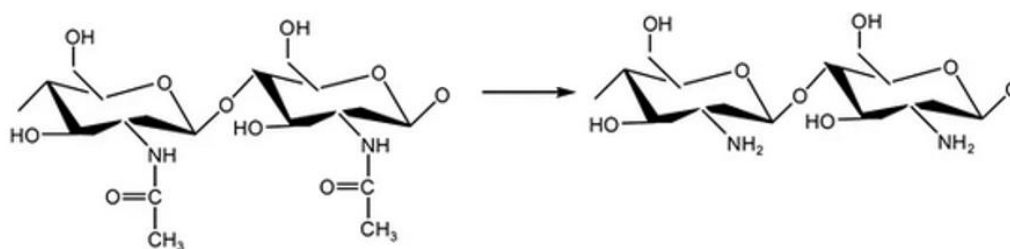


Figure 2-12. Préparation du chitosane à partir de la chitine

La transformation de la chitine en chitosane est réalisable par méthode physique, biologique ou chimique [172]. La désacétylation par voie chimique est la plus utilisée. La chitine est désacétylée en présence de 40 à 45 % d'hydroxyde de sodium à une température de 160 °C durant 1 à 3 heures. Ensuite, le produit de désacétylation est lavé avec de l'eau déionisée jusqu'à obtenir un pH neutre, puis placé sous vide dans un four à 60 °C pour obtenir du chitosane sec [173]. Le chitosane est biodégradable, antibactérien, biocompatible et non toxique. Les modifications chimiques ou physiques du chitosane permettent d'aboutir à des produits variés comme des gels, des membranes ou des nanoparticules. Ainsi, les applications couvrent de nombreux domaines tels le traitement des eaux usées, les cosmétiques, l'alimentation, l'agriculture, les domaines

pharmaceutiques et médicaux [174, 175]. Les mécanismes d'actions antibactériennes dépendent de la formulation du chitosane. Les groupements amines chargés positivement de chitosane interagissent avec la surface négative des bactéries et entraînent une perméabilisation [176]. Par sa faible solubilité dans l'eau et son action antibactérienne, le chitosane trouve également des applications pour le secteur de l'emballage alimentaire [177, 178]. Cependant, les films de chitosane sont rigides et nécessitent des plastifiants pour réduire les forces de friction entre les chaînes polymères afin d'améliorer leurs propriétés mécaniques [179].

2.3.3. Additifs au biopolymère de revêtement

Pour aboutir à un revêtement du papier et à un emballage fonctionnel il est bien souvent nécessaire d'ajouter certains additifs pour modifier les caractéristiques initiales des biopolymères utilisés. Les différents additifs entrant dans la composition des emballages à contact alimentaire sont encadrés par les multiples instances de sécurité sanitaire et de normalisation décrite précédemment.

2.3.3.1. Composées plastifiants

Les plastifiants permettent de diminuer la fragilité et d'augmenter la flexibilité. Leur ajout fait néanmoins diminuer la perméabilité des films à l'oxygène, aux arômes et aux huiles. Différentes catégories de biomolécules sont utilisables comme plastifiants : les monosaccharides, les disaccharides, les oligosaccharides (fructose, glucose, sucrose...), les polyols (glycérol, sorbitol, polyéthylène glycol) et les lipides (phospholipides, acides gras et surfactant) [180, 181]. Ajouté aux polymères, le glycérol est le plastifiant le plus

souvent utilisé [163, 166, 182]. Par exemple, dans une étude de 2016 réalisée par Seligra Paula, le glycérol additionné (1,5%*m/v*) favorise l'absorption d'eau par le matériau. De plus, les auteurs ont démontré que l'ajout de glycérol permet de limiter le phénomène de rétrogradation en conservant la souplesse, la résistance et en augmentant la mouillabilité du matériau [183].

Autres composés qualifiés de plastifiants, les tensioactifs également appelés surfactants. Ils modifient les propriétés rhéologiques du fluide lors de l'assemblage et de la fabrication. L'ajout de tensioactifs permet une augmentation de la résistance des matériaux formés mais aussi l'apport de charge en fonction du tensioactif choisi. Les tensioactifs peuvent être cationiques, anionique ou non ioniques. Les surfactants des grandes familles des SPAN (sorbitane) et TWEEN (polysorbate) sont étudiés pour la fabrication d'emballages [184, 185]. Leurs ajouts permettent de modifier la porosité des réseaux polymériques et d'augmenter leur résistance. Dans l'étude réalisée par Jabrane *et al.* (2015), le polymère polyélectrolyte PolyDADMAC (diallyl-diméthyl-ammonium-chloride) cationique est déposé à la surface du papier pour adsorber des bactériophages [186]. Hossain et ses collaborateurs ont étudié l'addition du dodecyltriméthylammonium bromide (DTAB), cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) sur la nanocellulose oxydée (OCNF). L'équipe a observé la formation de gel plus résistant et plus stable grâce aux attractions électrostatiques [187]. L'ajout de CTAB dans un mélange avec de la CMC pour former un gel augmente le rapport surface volume des nanopores. Cela renforce la capacité d'absorption de l'eau dans l'ultrastructure du gel. [188]

2.3.3.2. *Les cires*

La cire est utilisée dans plusieurs domaines ; transformée en émulsion, elle trouve des applications dans la formation de films de revêtement pour les emballages, dans le glaçage du papier, dans l'alimentation et l'industrie pharmaceutique [189-191]. La transformation en émulsion est réalisable par plusieurs techniques : disperseurs, haute pression, ultrasons ou surfactant. Les propriétés hydrophobes et naturelles des cires en font de très bonnes substances pour le développement de barrière [192]. Une étude publiée par Muscat *et al.* (2014) a mis en évidence l'impact de l'origine et du type de cire lors de la mise au point d'un film à base d'amidon, de glycérol et de cire. Les chercheurs ont observé des différences en fonction du type de cire sur la caractéristique d'hydrophobicité et les résistances mécaniques. [185]. La cire, de charge globalement négative, offre une bonne interaction avec des polymères cationiques. Une équipe de chercheurs de l'Université d'Aalto en Finlande a développé un revêtement hydrophobe à partir d'un mélange de cire de carnauba et d'amidon cationique pour application sur un textile 100% coton. Dans cette publication, les auteurs ont déterminé qu'une faible rugosité des surfaces augmente l'hydrophobicité du matériau [193]. Ces caractères de rugosité et de couche hydrophobe sont visibles, dans la nature, sur les structures microscopique des feuilles de lotus [194].

Cependant la manipulation des cires à des volumes élevés s'avère compliquée. Dans cette étude le chercheur met en évidence la problématique du contrôle des paramètres critiques tels que la distribution de la température et les conditions de cisaillement dans le grand milieu réactionnel [195].

2.3.3.3. *Les charges minérales*

Dans l'industrie papetière, les charges minérales utilisées incluent principalement le carbonate de calcium ($CaCO_3$), le talc, le kaolin et parfois le dioxyde de titane (TiO_2). Ces charges minérales sont ajoutées au processus de fabrication du papier pour améliorer ses propriétés physiques et optiques, telles que l'opacité, la brillance, la résistance et parfois même la couleur [196].

Les argiles comme le kaolin ou le talc proviennent de l'altération hydrothermale des cendres volcaniques alcalines ainsi que des roches de la période du crétacé (85-125 million d'années). Les cristaux d'argile ($[Si_{2n}O_{5n}]^{2n-}$) sont plats et mesurent $2\mu m$ de longueur sur $10nm$ d'épaisseur. Ils sont composés principalement d'hydro-phyllosilicates, d'aluminium comme pour le kaolin, ou encore de magnésium pour le tal. Les argiles sont classées en fonction de l'assemblage des couches tétraédriques et octaédriques : prenons comme exemple l'argile Montmorillonite (groupe des Smectite organisation 2:1 TOT) [197]. La charge est un facteur de classification ; elle est appelée, capacité d'échange électronique (CEC) et est exprimée en $cmol.kg^{-1}$ soit $1meq/100g$. L'électronégativité de surface permet l'adsorption d'une couche cationique hydratée labile ayant une capacité d'échange ionique avec son environnement. De plus l'organisation tridimensionnelle et le nombre de feuillets impactent la surface spécifique d'échange. Dans le cas de la Montmorillonite, la CEC peut être comprise entre 80 et $150 cmol.kg^{-1}$ alors que le kaolin est compris entre 3 et $15 cmol.kg^{-1}$. L'écart intra et intergroupe s'explique par les variations de composition d'une formation géologique à une autre [198]. Les argiles sont hydrophiles ; les molécules d'eau pénètrent l'espace entre les différentes couches et font

gonfler l'ensemble. Cependant la dispersion d'argile dans l'eau distillée conduit à une sortie d'ions contenus entre les feuillets ; la pression osmotique va tendre à égaliser les concentrations d'ions entre le milieu et l'argile. La charge globale des argiles permet l'association avec différents biopolymères. L'incorporation d'argile tels le kaolin ou la montmorillonite dans la fabrication de film apporte une modification significative dans la résistance mécanique des matériaux et augmente la perméabilité à la vapeur d'eau par son absorption [199-201].

2.3.4. Récapitulation

De nombreux biopolymères ont été décrits dans la littérature pour la formation de revêtements fonctionnels dans les emballages ; beaucoup sont d'origine marine. Il est cependant souhaitable de limiter le recours à des produits d'origine marine pour diminuer la dépendance à un écosystème fragile et fortement impacté par le changement climatique et la pollution humaine. Néanmoins l'industrie papetière travaille déjà avec plusieurs biopolymères et composés précédemment exposés. Le choix des biopolymères pour la mise au point d'un revêtement fonctionnel peut bénéficier du savoir-faire des industriels et favorise une meilleure projection en vue d'un changement d'échelle en termes d'approvisionnement et de coût pour des volumes significativement différents de ceux utilisés en laboratoire. La sécurisation des circuits d'approvisionnement des matières premières constitue un enjeu majeur pour un industriel. En conclusion, les différents types d'amidon, de cellulose, les plastifiants tel le glycérol ou les différents Tween se détachent parmi les multiples possibilités de développement de revêtement.

2.4. Les technologies papetières d'application de revêtement et de séchage

2.4.1. Production mondiale

Développé au XIX^{ème} siècle aux États-Unis, le couchage est l'application d'un pigment, d'un polymère ou de tout autre matériau sur la surface du papier. Cette application a pour but d'apporter de nouvelles caractéristiques au papier de base, comme une brillance, une souplesse, une couleur ou une résistance à la saleté ou à la déchirure ou encore un effet barrière à l'air et au liquide. Ainsi les produits papetiers sont divers en fonction du revêtement appliqué. Ils sont fréquemment utilisés pour les magazines, les catalogues, les publicités, les emballages de transport ou alimentaire. La Figure 2-13 ci-dessous présente l'évolution sur 20 années de la production mondiale de différents produits issue de l'industrie papetière

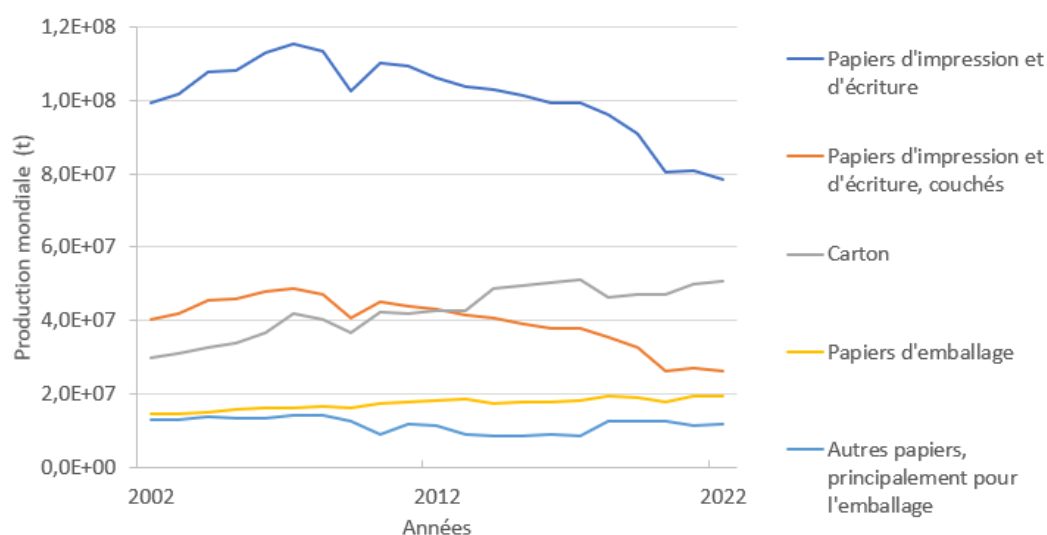


Figure 2-13. Évolution de la production mondiale des types différents de produits papetiers [195]

L'ère du numérique et de la digitalisation de nombreux médias entraînent le déclin de la production des papiers d'impression et d'écriture. Néanmoins, tirée par l'essor du commerce en ligne, la demande et la production d'emballages augmentent. De plus, la recherche d'alternatives aux emballages plastiques contribue au développement de nouveaux revêtements applicables aux papiers et aux cartons.

L'application de couchage par les industries papetières est maîtrisée depuis longtemps ; les technologies sont nombreuses et très spécifiques selon la solution à appliquer, le fini de surface et la cadence de production.

2.4.2. Les techniques de couchage

Le couchage peut être réalisé lors de la production du papier (on-machine coating) ou lors d'une étape après la production (off-machine coating). L'application du couchage « on-machine » permet une économie de manutention, de temps et d'énergie. À l'inverse, en « off-machine », les paramètres du couchage sont plus modulables (vitesse d'application, température...). La vitesse de couchage dépend également du support : jusqu'à 900-1200m/min (3000-4000ft/min) sur des papiers de faible poids et 360-400m/min (1200-1300ft/min) pour du carton. Le procédé de couchage du revêtement s'effectue en deux temps : le dosage et l'application. On parle de couchage direct (ou « blade coating ») si l'application précède le dosage et de couchage indirect (« film coating ») si le dosage est réalisé avant l'application. En figure 2-14 sont présentées des

techniques d'application directe et en figure 2-15 des techniques de dosage du couchage.

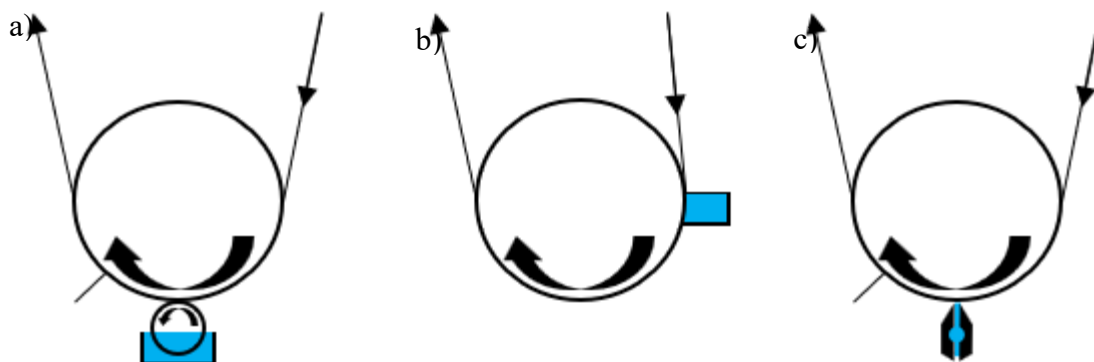


Figure 2-14. Techniques d'application directe de revêtement

(a) par rouleau, (b) pond, (c) jet

La maintenance étant peu onéreuse, l'application par rouleau et le dosage par lame (couchage direct) sont dominants dans l'industrie.

La solution de couchage doit être de haute viscosité pour une application optimale. Cependant, ce procédé d'application comporte certains désavantages : limitation de la vitesse d'application à environ 600m/min (2000ft/min), installations coûteuses et nécessaire ajustement.

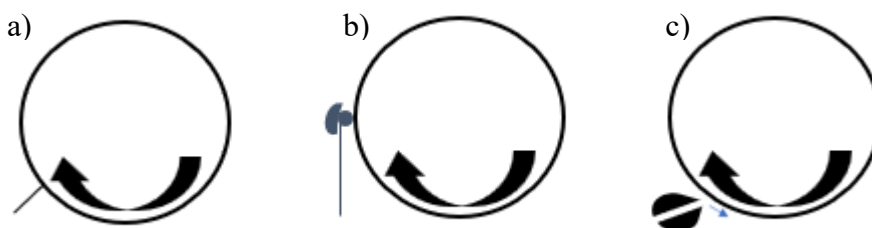


Figure 2-15. Techniques de dosage du couchage appliqué en surface

(a) lame de dosage, (b) barre de dosage (c) lame d'air

Trois techniques de dosage sont possibles : le dosage à lame, la barre de dosage et la lame d'air.

Peu coûteux et flexible par son réglage en fonction du couchage à appliquer, le dosage à lame n'est utilisable qu'à des vitesses faibles et avec une quantité basse en solide dans la solution de revêtement.

La barre de dosage (Figure 2-15), contrairement à une lame de dosage qui racle le revêtement, applique le revêtement en laissant passer le substrat ; la vitesse d'opération est sensiblement la même que celle utilisée pour les lames.

Le dosage par une lame d'air présente divers avantages : obtention d'un poids de couche uniforme, possibilité d'utiliser des poids de couche élevés et d'éviter toute trace de rayures à cause de la friction. Par contre, cette technique ne peut être utilisée qu'avec des revêtements contenant une faible teneur en solides et ayant une faible viscosité. Les vitesses de roulement du dosage par lame d'air atteignent 1000-1200m/min maximum.

La technique choisie, pour doser la quantité en surface, modifie l'homogénéité du couchage. Avec une lame la surface est nivelée ; les aspérités de surface et l'homogénéité sont optimisées avec un dosage par rouleau et à la lame d'air [205, 206].

Les techniques regroupées sous le nom de couchage indirect (ou « film coating ») présentent l'avantage de fournir un poids de revêtement uniforme même lorsque la surface de la feuille est quelque peu rugueuse. Cette méthode est utilisée à des vitesses allant jusqu'à 600 m/min pour des solutions de couchage à forte teneur en solides et à des viscosités élevées. De plus la pression sur la surface du papier est moindre par rapport à l'application par lame de dosage engendrant ainsi un faible entretien des machines.

Cependant, la limitation de la vitesse et du poids de couche (environ 10g/m²), l'espace nécessaire, les ajustements de chaque cylindre et le coût important de l'équipement sont des inconvénients non négligeables. Les différentes techniques d'application indirectes comportent de nombreuses variantes en fonction du nombre de rouleau de transfert, de la composition du rouleau, de l'application sur un ou plusieurs côtés, du nettoyage du rouleau par une lame.

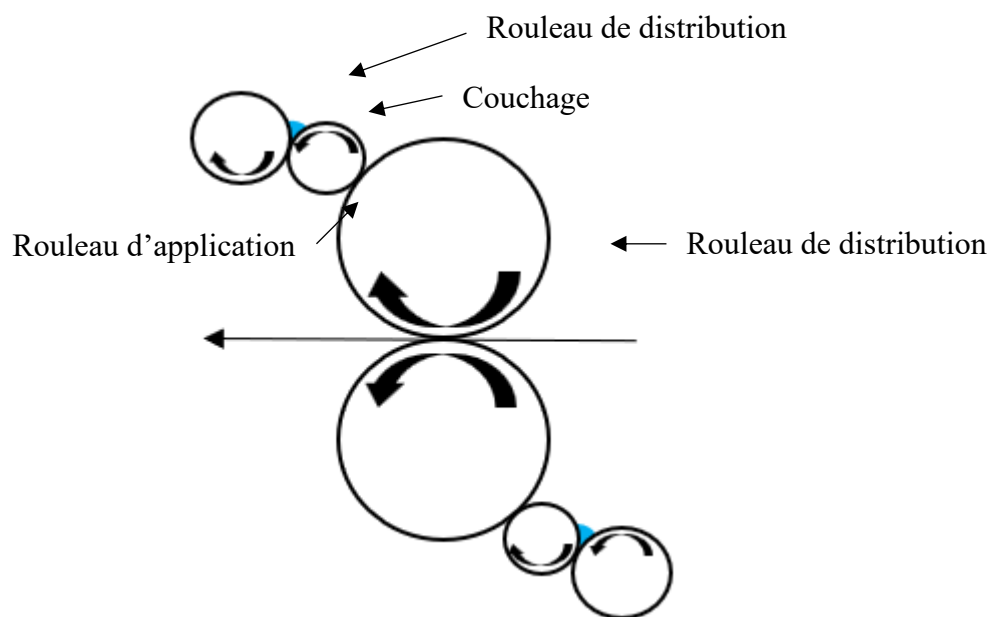


Figure 2-16. Application d'un couchage sur les deux faces par méthode indirect
Exemple d'un montage type d'application de revêtement de deux faces
simultanément par couchage indirect [196, 198].

Des techniques de couchage dites « sans contact » sont utilisées principalement dans l'application de couleur à la surface des papiers. Plusieurs méthodes d'application sont utilisées dans l'industrie selon le type de surface et le produit fini souhaité. Le « Slot dye coaters ou fente » (Figure 17.a) est l'application du revêtement à travers une fente étroite sur la surface du papier. Cette technique est aussi utilisée pour l'application de

plusieurs couches (Slide dye coater). Par exemple, les films photographiques sont fabriqués par le procédé de revêtement en rideau multicouches ; l'enrobeuse applique simultanément des couches de revêtement à la surface.

Le « curtain ou rideau » (Figure 2-17.b), rideau liquide du matériau de revêtement est appliqué sur la surface du papier. Les techniques sans contact exercent une contrainte minimale sur la feuille de base. Les vitesses d'application peuvent atteindre jusqu'à 1500m/min [207].

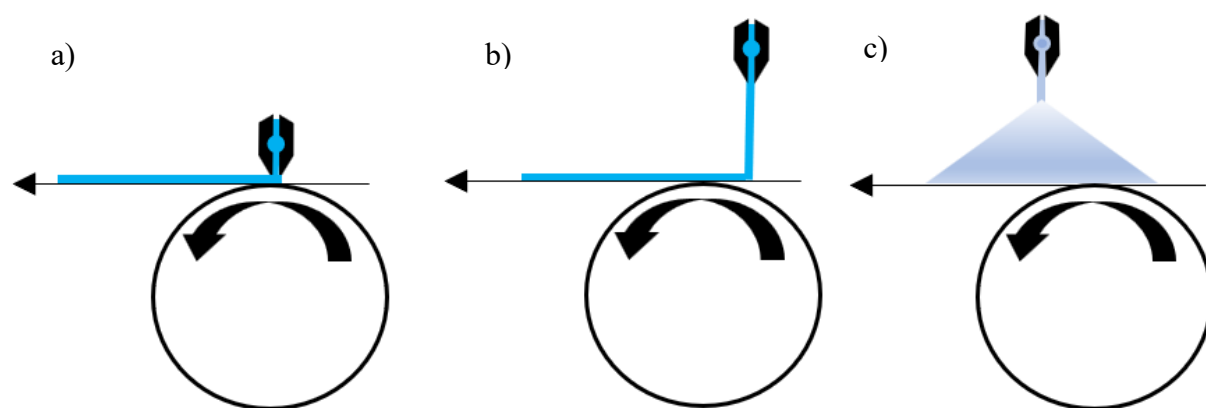


Figure 2-17. Techniques d'application de couchage sans contacts

(a) Fente « Slot dye coaters », (b) Rideau « curtain », (c) pulvérisation

L'essor de nouvelles installations à haute vitesse privilégie le couchage par pulvérisation pouvant atteindre des vitesses de roulement proche de 2000m/min (6500ft/min). Néanmoins, les buses de spray sont sensibles à l'abrasion par les particules solides contenues dans les couchages, augmentant ainsi la maintenance et les coûts associés. Les solutions doivent être suffisamment fluides pour une application homogène. La

pulvérisation bien que peu répandue, apparaît comme une technique d'application prometteuse pour des solutions ayant un taux de solide bas.

Les techniques de revêtement sans contact sont devenues de plus en plus importantes dans la production moderne de papier en raison de leur capacité à améliorer la qualité du produit et l'efficacité tout en minimisant les déchets et la variabilité dans l'application des revêtements. Le choix de la technologie d'application du revêtement dépend donc de la solution à appliquer, du fini en surface souhaité mais aussi des coûts associés à l'opération.

2.4.3. Le séchage

Le séchage est un processus couplé de transfert de chaleur et de masse. L'énergie nécessaire à l'évaporation doit être fournie par une source de chaleur et transférée au papier. L'eau évaporée doit être évacuée par l'air. Le séchage des revêtements est effectué par des séchoirs infrarouges (électriques ou à gaz), des séchoirs par convection, ou des séchoirs par conduction. Les méthodes ont chacune des spécificités en termes de consommation d'énergie, de rendement et d'application [199]. Le Tableau 2-4 résume les différentes techniques de séchage.

Tableau 2-4. Comparaisons des techniques de séchage

	Conduction	Impingement air	Infrarouge
Source d'énergie	Vapeur	Vapeur / gaz	Gaz / électrique
α_{t0} surface papier	500-3000 Wm^2K^{-1}	50-350 Wm^2K^{-1}	50-110 Wm^2K^{-1}
ΔT_{t0} surface papier	10-40°C	50-100°C (vapeur) 200-400°C (gaz)	800-1000°C (gaz) 500-650°C (électrique)
Flux de chaleur	10-40 kWm^{-2}	20-120 kWm^{-2}	50-110 kWm^{-2}
Efficacité*	85%	50-70%	25-30%
Application	Section de séchage par cylindre	Flottation dans les machines de revêtement.	Section de séchage de couchage

*énergie utilisée pour le séchage/chaleur transférée

Plus la température de la source de chaleur est élevée, plus les pertes d'énergie dans le système de chauffage sont généralement importantes et plus l'efficacité énergétique est basse. L'efficacité des infrarouges est presque trois fois inférieure à celle du séchage par conduction. Le séchage représente presque 75% de la consommation en énergie nécessaire à la production de papier [208].

2.4.3.1. Le séchage par conduction

Cette technique repose sur trois principaux éléments : un système de vapeur et de condensat pour alimenter en énergie les cylindres, un nombre suffisant de cylindres en fonte pour transférer l'énergie au papier et une hotte couvrant l'ensemble de la section de séchage pour évacuer la vapeur d'eau. La gestion des flux d'air dans l'unité de séchage se

fait grâce au confinement de la section. L'ensemble est entouré de panneaux isolants pour optimiser les rendements thermiques et la précision dans le pilotage de la température des flux d'air. De l'air chaud et sec atteignant 110 °C est soufflé dans l'enceinte puis évacué et dirigé vers le système de récupération de chaleur. L'air sec, avec une faible humidité relative, permet de maintenir un fort gradient d'humidité entre le papier humide et l'air ambiant, ce qui favorise un transfert rapide de l'eau du papier vers l'air.

Traditionnellement, les cylindres sont disposés en une rangée supérieure et une rangée inférieure, l'arrangement est présenté à la Figure 2-18. L'enchaînement de plusieurs dizaines de cylindres constitue l'unité de séchage ; certaines installations peuvent comprendre jusqu'à 170 cylindres. La taille des séchoirs augmente parallèlement au développement des machines de haute vitesse. D'autres configurations d'agencement ont été développées : cylindres en un seul rang ou cylindres empilés les uns au-dessus des autres dans une configuration appelée « Stack ». Dans ce processus, de la vapeur presque saturée est injectée dans le cylindre chauffant. La chaleur se propage alors de la paroi du cylindre à la bande de papier, provoquant ainsi l'évaporation de l'eau. Le séchage du papier est conditionné au taux de transfert de chaleur de la vapeur à l'enveloppe du cylindre et à la quantité d'eau par volume d'air dans l'enceinte. La quantité de vapeur d'eau que peut contenir un volume d'air est décrite par la pression de vapeur saturante qui dépend de la température de l'air. Plus la température de l'air est élevée et plus la quantité d'eau contenue dans la masse d'air peut être grande. [209].

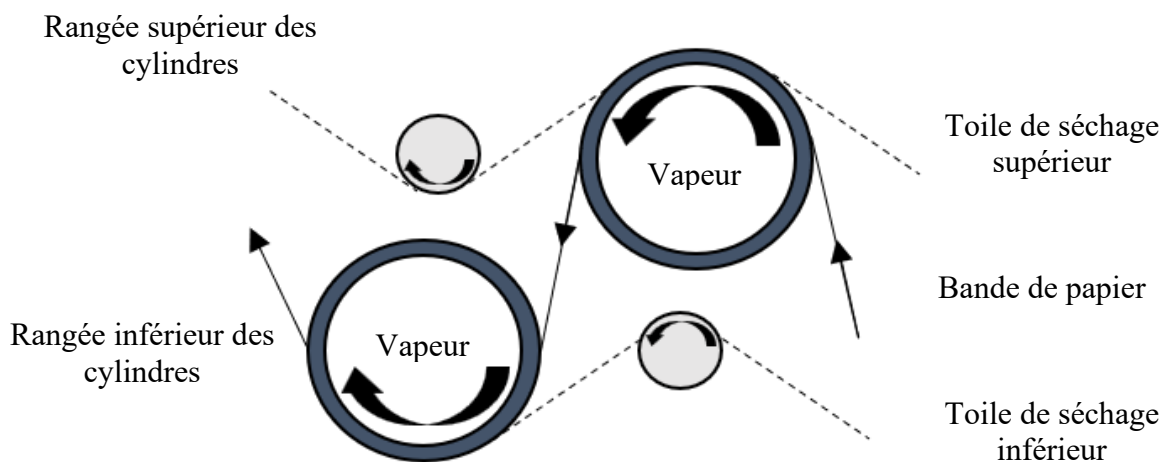


Figure 2-18. Séchoir multicylindres

L'humidité relative de l'air est définie comme la proportion de vapeur d'eau présente dans un volume donné d'air par rapport à la quantité maximale de vapeur d'eau que ce volume peut contenir à une température donnée. La pression partielle du liquide en surface du papier est une composante importante à considérer dans des contextes tel que l'équilibre liquide-vapeur. La pression partielle du liquide superficielle augmentant sous l'action du chauffage, il en est de même pour l'évaporation [210].

Le séchage par conduction est largement utilisé dans l'industrie papetière en raison de son efficacité énergétique élevée et de l'utilisation avantageuse de la vapeur à basse pression comme source de chaleur.

2.4.3.2. Le séchage convectif

À la fin des années 1990, le séchage convectif par air chaud pulsé n'était pas un procédé standard pour les papiers aux grammages les plus lourds. Cette technique était principalement utilisée pour le séchage de papiers tissus (essuie-main, papier de toilette) ou lorsque le séchage sans contact était nécessaire. Cependant, la modernisation des lignes de production et le développement de cette technologie par des acteurs du monde papetier ont fait avancer son déploiement (Steinbeis Paper Gmbh, Valmet, Andritz...)[212, 213]. [211]. La Figure 2-19 présente un schéma d'équipement. L'air chaud est soufflé à haut débit sur le papier. La chaleur est transférée à la feuille, l'eau du papier est absorbée par l'air lui-même récupéré pour être recyclé afin d'améliorer le rendement énergétique [119, 214].

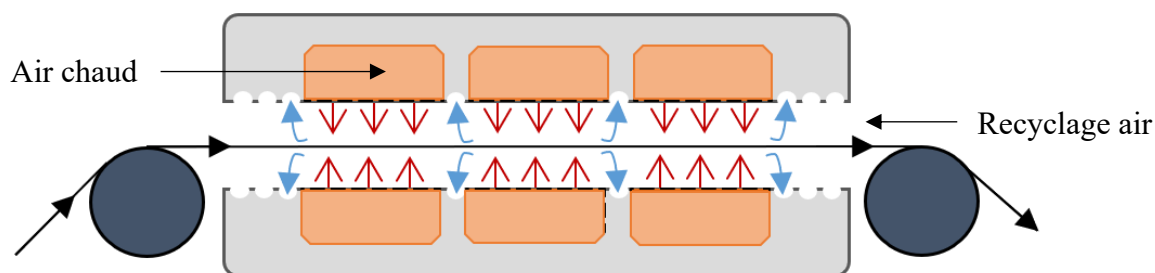


Figure 2-19. Séchage par soufflage d'air chaud « impingement »

Le transfert de chaleur dans le processus de séchage par air chaud est favorisé par l'augmentation de sa température, par sa vitesse et son débit massique, ainsi que par une diminution de la distance entre la plaque de buses et la surface du papier. Plus l'humidité de l'air est basse, plus le transfert de masse et donc le taux de séchage sont élevés ; par contre une faible humidité entraîne une augmentation de la demande énergétique pour

traiter l'air [208]. Néanmoins cette technique de séchage est considérée comme la plus efficiente au niveau énergétique, grâce à la re-circularisation de l'air. Enfin elle permet de diminuer la taille totale de la ligne de production et de moderniser les anciennes lignes de production existantes [215].

2.4.3.3. *Le séchage radiatif*

Plus ancienne que la technique précédemment présentée, le séchage par infrarouge est utilisé pour le séchage de papier couché. La Figure 2-20 est une représentation simplifiée de l'équipement. Le fonctionnement repose sur le chauffage d'une plaque émettrice en métal ou en céramique recouverte d'un treillis. Les brûleurs à gaz permettent d'atteindre une température d'environ 700 à 900°C [216].

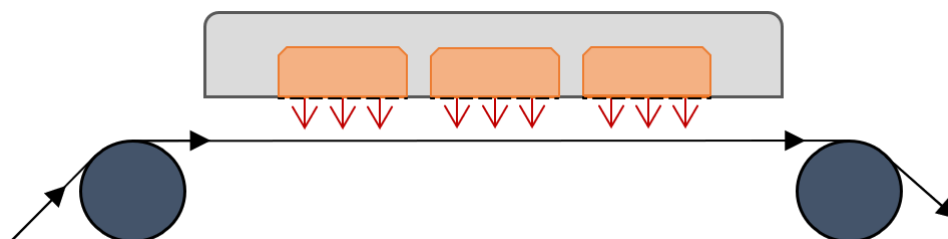


Figure 2-20. Séchage par infrarouge

De par sa conception le séchage par infrarouge ne possède pas de système de récupération de la chaleur. Des déflecteurs pour augmenter l'inertie thermique sont néanmoins installables pour augmenter la température et la capacité thermique des plaques.

Pour un chauffage électrique, le fonctionnement est différent : la source de radiation est un filament dans un cylindre de verre scellé. Le type de radiation délivré

dépend de la longueur d'onde et de l'énergie apportée. Les longueurs d'onde les plus courtes pénètrent davantage et sont plus sensibles à l'absorption différentielle des couleurs. Il y a donc pour un même paramétrage une différence en fonction de la capacité d'absorption du produit [215].

Lorsque le papier absorbe les infrarouges, sa température augmente, l'humidité dans la feuille est vaporisée dans l'air ambiant. Le séchage par infrarouge nécessite une bonne circulation d'air car une stagnation d'un air ambiant chargé en humidité limiterait l'évaporation [217]. Les séchoirs à infrarouge possèdent certains avantages : démarrage et arrêt instantanés des infrarouges électriques, coût initial de l'installation inférieur à d'autre technique plus récente. Cependant certains points comme la capacité ou le séchage sans contact sont concurrencés par les techniques de séchage convectif plus moderne. De plus, le coût de l'énergie électrique ou du gaz reste à prendre en considération, car la température de fonctionnement est très élevée et la demande en énergie est importante [218].

2.4.4. Récapitulation

Les technologies de séchage nombreuses se sont développées au fil des années pour une industrie papetière plus que centenaire. La diversité des installations reflète aussi bien l'année de construction que le produit fini fabriqué. Le séchage des revêtements appliqués en surface des papiers est principalement réalisé par deux techniques : convectif par soufflage d'air chaud « impingement » ou radiatif grâce aux infrarouges. Les rendements entre les deux approches sont relativement différents ; l'âge des technologies et le degré de développement ne sont pas les mêmes. L'infrarouge facilite la mise en œuvre du séchage dans un contexte de recherche et développement au sein d'un laboratoire. De plus l'implantation de ces équipements dans de multiples usines en fait un candidat de choix pour le déploiement de nouveaux produits destinés un jour à la production industrielle. Enfin, pour chacune des techniques, la gestion des propriétés de la température, de l'humidité et de la vitesse de la masse d'air ambiante est incontournable pour un séchage performant. La prise en considération de ces facteurs est nécessaire pour le séchage de produit sensible comme les bactériophages.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

3.1. Matériels

Fournis par l'entreprise Kruger Inc., le papier provient d'une pâte thermomécanique. Il possède un grammage de 50 g/m², une épaisseur de 54,9 µm et une perméabilité à l'air de 50 mL/min.

Les biopolymères et plastifiants utilisés pour le revêtement de ce papier de base étaient les suivants : carboxyméthylcellulose (CMC) C4888 (Millipore Sigma, Mississauga, Canada), amidon cationique (CS) NationalTM 0381 (Ingredion, Mississauga, Canada), et glycérine G2025 (Millipore Sigma, Mississauga, Canada). Les différents niveaux d'humidité ont été obtenus en utilisant la méthode des sels saturés avec les produits chimiques suivants, achetés auprès de Millipore Sigma (Mississauga, Canada) : nitrate de potassium (P8291), chlorure de sodium (BP358), nitrate de magnésium hexahydraté (237175), chlorure de magnésium (M0250) et iodure de sodium. Les substances utilisées dans le processus de séchage des bactériophages telles la L-leucine 4330 et le monohydrate α -D-lactose provenaient de Millipore-Sigma (Mississauga, Canada).

La solution de bactériophages P100 spécifique du genre *Listeria*, PhageGuard Listex, a été achetée à l'entreprise MICREOS Wageningen, Pays-Bas. La solution a une concentration de 10¹¹ PFU/mL. La souche de *Listeria monocytogenes* utilisée est ATCC 19511, sérotype 4 b, achetée à l'entreprise Cedarlane (Burlington, ON, Canada).

3.2. Méthodologie

La méthodologie et les objectifs de la thèse présentés dans la partie précédente sont résumés dans la Figure 3-1 ci-dessous.

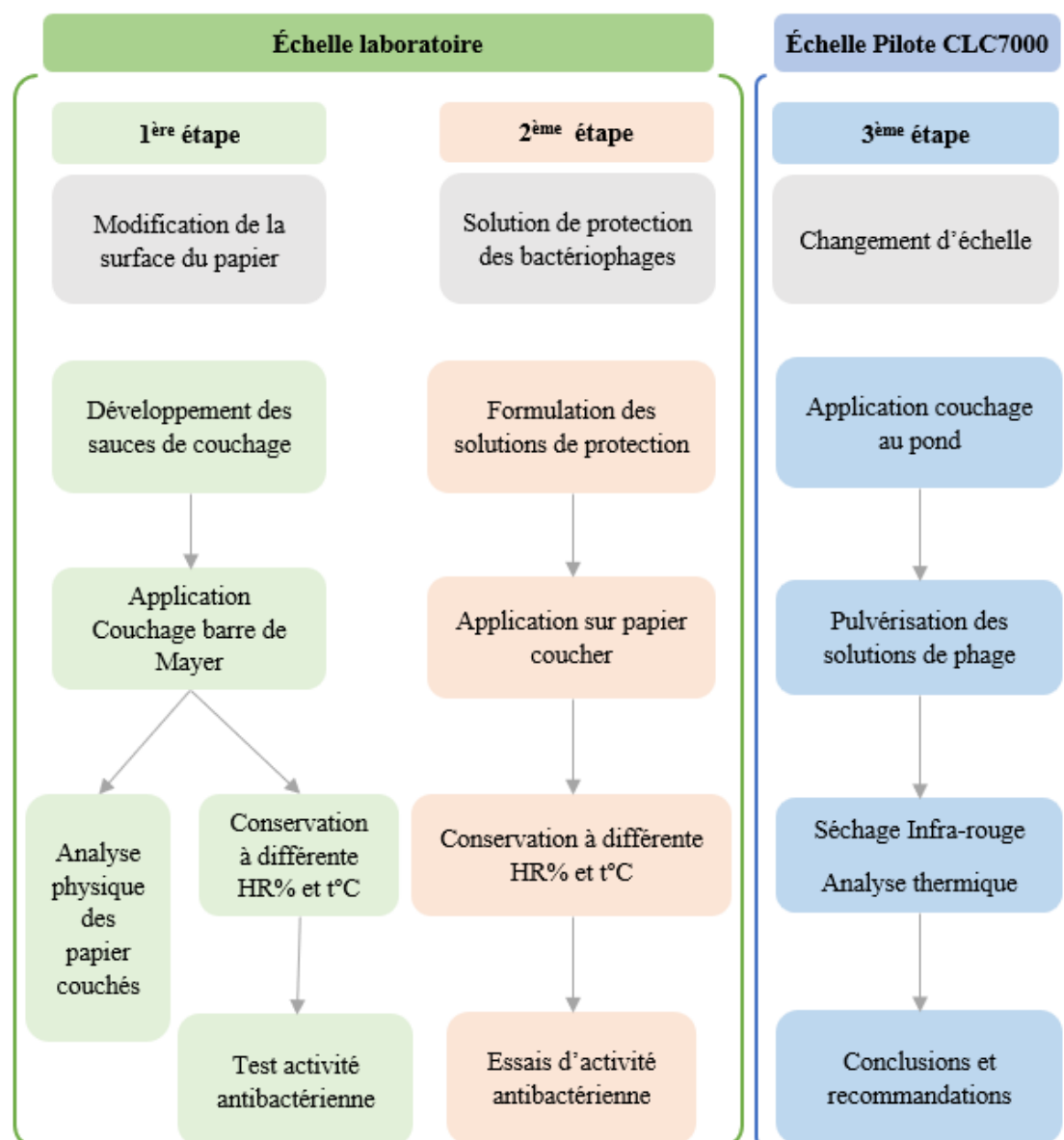


Figure 3-1. Synthèse de la méthodologie appliquée dans ce travail

Chapitre 4 : Article scientifique 1 :

4.1. Avant-propos

Le titre du premier article scientifique est ‘Lifespan and bioactivity improvement of bacteriophages immobilized on carboxymethylcellulose – cationic starch coated paper for food packaging’ Il a été publié dans la revue scientifique ‘‘International Journal of Biological Macromolecules’’ dans le volume 294 de mars 2024, 139138. Les auteurs et leurs coordonnées correspondantes sont, dans l’ordre :

Charles Fort, Étudiant au Doctorat en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques
Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : charles.fort@uqtr.ca

Younès Bareha, Ph.D

Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : younes.bareha@uqtr.ca

Thi Thanh Ha Pham, Ph.D

Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : thi.thanh.ha.pham@uqtr.ca

Thanh Tung Lai, Ph.D

Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : thanhtung.lai@uqtr.ca

François Brouillette, Ph.D,

Co-directeur de thèse. Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse, Université du Québec à Trois-Rivières Département de biochimie, chimie, physique et science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Courriel : francois.brouillette@uqtr.ca

Guy Njamen,

Kruger Inc., Montréal, QC H3S 1G5, Canada

Courriel : guy.njamen@kruger.com

Balázs Tolnai, Ph.D

Kruger Inc., Montréal, QC H3S 1G5, Canada

Courriel : balazs.tolnai@kruger.com

Sylvain Moineau, Ph.D

Département de biochimie, de microbiologie et de bio-Informatique

Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

Courriel : sylvain.moineau@bcm.ulaval.ca

Simon Barnabé, Ph.D

Directeur de Thèse. Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse, Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Courriel : simon.barnabe@uqtr.ca

Contribution des auteurs : Charles Fort est l'auteur principal de cet article. Il a effectué toutes les expériences scientifiques et les développements associés. M. Bareha à participé à la révision du manuscrit. Mme. Thi Thanh Ha et M. Thanh Tung et M. Moineau ont contribué aux corrections du manuscrit. M. Njamen et M. Tolnai ont pris part dans le financement du projet. M. Barnabé est le directeur de recherche et M. Brouillette est le co-directeur de cette recherche. Le directeur et le co-directeur ont participé à la révision et à la correction du manuscrit.

4.2. Résumé

Les bactériophages (phages) présentent un fort potentiel pour cibler spécifiquement les pathogènes bactériens d'origine alimentaire, en particulier dans les matériaux d'emballage. Cependant, leur incorporation dans les surfaces d'emballage nécessite de stabiliser leur structure et de maintenir leur infectivité tout au long du processus de fabrication du papier. Dans cette étude, plusieurs formulations de revêtements contenant différentes proportions de carboxyméthylcellulose, d'amidon cationique et de glycérine ont été appliquées sur un papier de base afin d'évaluer la stabilité des phages. La préparation de phages anti-*Listeria* LISTEX™ P100 a été appliquée à la surface du papier, puis séchée sous un flux d'air laminaire. Des analyses physiques des modifications du papier de base ont été réalisées, et les propriétés d'absorption d'eau des différents revêtements ont été étudiées. Étant donné que le niveau d'humidité est également un facteur critique pour maintenir l'activité des phages, les papiers revêtus ont été stockés à différents niveaux d'humidité relative.

Le revêtement le plus efficace pour maintenir l'activité des phages contenait 2 % de carboxyméthylcellulose, 2 % d'amidon cationique et 5 % de glycérine. Le papier revêtu contenant des phages mesurait 16 micromètres d'épaisseur, était optiquement identique au papier de base, mais présentait une masse surfacique plus élevée (+15 %). Les titres de phages à la surface du revêtement ont été maintenus à 10^4 PFU/cm² pendant 14 jours lorsqu'ils étaient stockés à 4 °C avec une humidité relative de 75 %.

4.3. Abstract

Bacteriophages (phages) have a great potential for the specific targeting of foodborne bacterial pathogens, particularly in packaging materials. However, incorporating phages into packaging surfaces requires stabilizing their structure and maintaining their infectivity during the papermaking process. In this study, several coating formulations containing various ratios of carboxymethyl cellulose, cationic starch, and glycerol were applied to a base paper to assess phage stability. The anti-Listeria phage preparation LISTEXTMP100 was applied to paper surface and then dried under a laminar air flow. Physical analyses of base paper modifications were carried out and water absorption properties of the various coatings were analyzed. As the humidity level is also a critical factor for maintaining phage activity, the coated paper were stored at various relative humidity levels. The most effective coating for maintaining phage's activity contained 2% carboxymethylcellulose, 2% cationic starch, and 5% glycerol. The coated phage-containing paper was 16 micrometers thin, optically identical to base paper but heavier in mass per square meter (15% increase). The phage titers on the surface of the coating were maintained at 10^4 PFU/cm² for 14 days when stored at 4°C with 75% relative humidity.

4.4. Introduction

New strategies are being developed to ensure food safety. The use of phages is presented as a promising approach to control bacterial pathogens that cause foodborne illnesses. In the past decade, the study of phages to fight bacteria has significantly increased in several fields, including on their efficacy and safety as biocontrol agents in foods or in therapy for humans and animals. The use of phage in food safety has been discussed in several countries. In the United States, the Food and Drug Administration (FDA) validated their use in 21 CFR§172.785 (CFR 2016). In Europe, the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (AFSCA) validated their use in food production in accordance with the regulation N°853/2004 (EU 2004).

One of the critical factors necessary for various applications is to maintain phage stability. The challenges of immobilizing phages on a package are significant as they need to be homogeneously distributed and resist dehydration. Phages can be immobilized on material surfaces using different approaches such as chemical bonding, genetic approaches, and physical technics (Hosseinidoust et al. 2014, Bo et al. 2018, Rosner et al. 2021).

Bacteriophages can be immobilized via covalent bonding with amino acids in the capsid, such as lysine, glutamic acid, aspartic acid, or cysteine. These covalent bonds typically involve carboxylic acid groups on the surface of the support, which can be activated by chemical agents like EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride), pH modification, or plasma deposition to introduce ionized groups (Janczuk et al. 2017, Nogueira et al. 2017). An other example, streptavidin, a protein with

a high affinity for biotin, can be activated using N-hydroxysuccinimide (NHS) to bind to a terminal amine group of a protein component of the bacteriophage capsid (Tytgat et al. 2015). Alternative approaches involving genetic engineering aim to modify specific sequences to create binding sites directly on the bacteriophage capsid (Tolba et al. 2010). Immobilization techniques using protein ligands and covalent bonds are precise, irreversible, and can result in long-lasting phage stability (Pearson et al. 2013, Nogueira et al. 2017)

Physical immobilization techniques by applying a functional layer are less costly and more suitable for packaging development. Physisorption of phages is based on the charge-charge attraction between a support and phages.

Physical adsorption techniques, including surface charge optimization, are collectively referred to as physisorption. These methods are simpler to implement than the chemisorption techniques previously discussed; however, they present certain limitations. Physisorption relies on charge-based attraction between the support surface and the bacteriophage. The adhesion occurs through Van der Waals forces, hydrophobic interactions, and dipole-dipole moments. The effectiveness of this attraction is influenced by the physicochemical conditions of the environment. Variations in pH, temperature, and ionic strength can disrupt the immobilization interactions, thereby affecting the stability and functionality of the bacteriophages (Singh et al. 2009). Phages in solution have a different stability according to the physicochemical conditions of the medium. The stability of phages on a solid support can also vary depending on the physical characteristics of the deposition surface. However, the latter has been previously proposed

as a method for delivering phages (Anany et al. 2015, Lone et al. 2016). Several studies reported on the use of positively charged surface polymers to properly position phages. These methods were based on the charge differences between the phage capsid, which has an overall net negative charge, and the tail fibers, which have an overall net positive charge (Serwer et al. 1978, Cademartiri et al. 2010). The orientation of bacteriophages on the support can be controlled based on these features. Anany et al. effectively immobilized a phage cocktail that targets *Listeria* and *E. coli* on cellulose that has been treated with 0.5% PVA (polyvinylamine) in 2011. The authors came to the conclusion that bacteriophage immobilization was considerably more effective when cationic charges were added (Anany et al. 2011).

The application of a polymer layer with a cationic surface such as PEI/chitosan may allow the phage anchoring through the capsid. A previous study (Vonasek et al. 2017) showed that electrostatic immobilization led to about 15-20% more active phages than non-specific adsorption and protein-ligand binding. The stability of three *E. coli* phages (T4, T5 and T7) was also analyzed on a filter paper functionalized with carboxylic acid (carboxyl methyl cellulose - CMC) or amine (chitosan) groups, after exposure to pH varying from 5.6 to 14. When measuring the lysis area, the paper functionalized with chitosan had a smaller diameter than non-functionalized and CMC papers. The strength interaction also decreases with the phage ability to desorb and interact with bacteria (Meyer et al. 2017). Thus, the quality of the attraction is dependent on the physicochemical conditions of the medium. Changes in pH, temperature, and ionic strength are likely to disrupt the immobilization interactions (Van Voorthuizen et al. 2001, Singh et al. 2009).

However, the methods presented in the literature have limitations for potential developments outside of laboratory settings. For example, the drying times of several hours required for the production of antibacterial films (Cui et al. 2017, Alves, Marques et al. 2019), or the use of nanoparticles (Lai et al. 2022) whose safety regarding human health is still under debate (Esthe et al. 2016, Peters, Oomen et al. 2020, Lai et al. 2022). Another critical aspect is the limited mass of coating that can be applied to the surface of the packaging. The amounts of biopolymer and plasticizer must be low to avoid exceeding a maximum weight limit. The coating weight is typically around 10 g/m² (Monica et al. 2009). In the literature, the biopolymers used in packaging films are present in small quantities, typically only a few percent. In the work of Şen et al., cationic starch is added at a maximum of 1.5% (w/w) for the development of antibacterial packaging (Şen et al. 2017). Carboxymethylcellulose is also used in small quantities. In the study conducted by Azhdari et al., the CMC used in the coating for bioactive packaging constitutes 1.5% by weight (Azhdari et al. 2022). Thus, the biopolymers used in the composition of the film should be kept to a low level to limit the maximum weight per square meter.

The objective of this study is to evaluate the effectiveness of CMC and CS in forming films that stabilize P100 bacteriophages against *Listeria* on surfaces. These biopolymers are commonly used in the paper industry. The developed coatings will also address the weight per square meter limitation imposed by the paper sector (Chaussy et al. 2016). Different multipolymeric coatings, incorporating cationic starch and carboxymethyl cellulose, were formulated to improve the water absorption capacity of the paper after calendering. These coatings were then characterized to assess their

physicochemical properties and water absorption capabilities. Finally, the activity of ListexP100, sprayed on the coated paper, was evaluated after storage at various humidity levels for up to 14 days.

4.5. Materials and Methods

4.5.1. Overview of the methodology

As the humidity plays a major role in maintaining phage activity, we hypothesized that biopolymer-coated paper with maximum water absorption capacity will result in a higher phage stability. To investigate the effect of several biopolymer-based coatings on the activity of surface-applied phages, our methodology was divided into three steps: (i) coating formulation and application, (ii) physico-chemical coating characterization and (iii) evaluation of phage titers and antibacterial activity of selected coated papers. A detailed overview of the methodology is presented in the following paragraph and summarized in Figure 1.

- The first step involved preparing coating solutions and applying them to a base paper. Experimental design was employed to establish the optimal quantities of the ingredients and to assess their efficacy. The biopolymers tested included carboxymethylcellulose and cationic starch, with glycerol added as a plasticizer.
- Secondly, some of the samples produced were stored under varying humidity and temperature conditions to analyze water absorption properties, while others underwent characterization of their physical surface properties. The goal was to identify the biopolymer coating formula that allow maximum water absorption.

- Thirdly, the biopolymer-coated papers with the most water absorption capacity were selected. Then, phages were applied to the coated paper surfaces, stored, and enumerated by the double-layer agar technique over several days of storage.

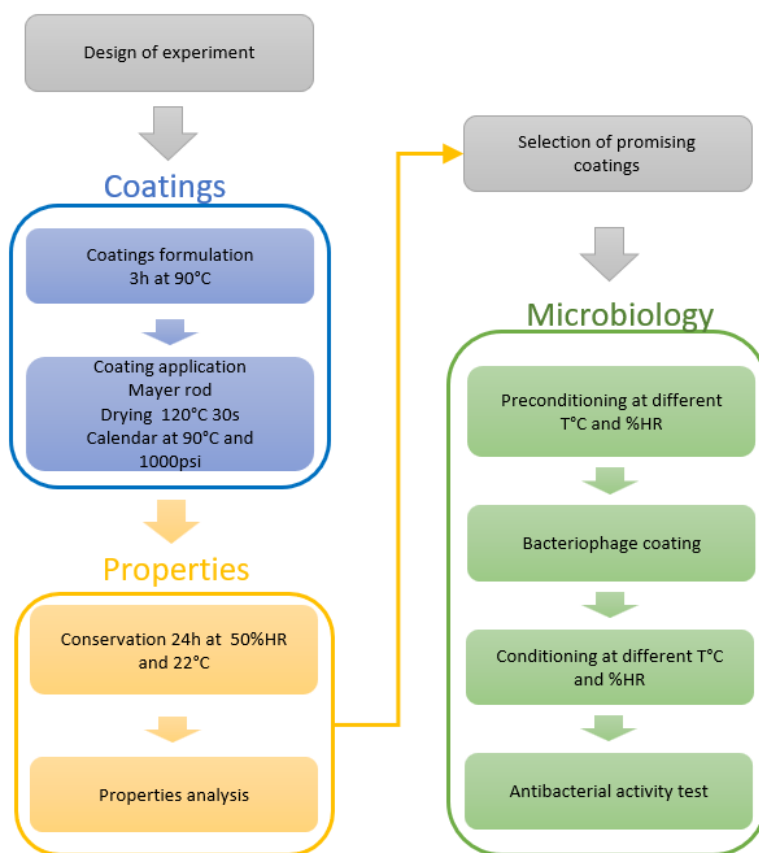


Figure 4-1. Schematic overview of the methodology used in this study.

4.5.2. Chemical and biological materials

The coatings were applied to a base paper with a grammage of 50 gsm provided by Kruger Inc. (50 g/m², US legal size 21.59 × 35.56 cm). The biopolymer and plasticizer used for coating this base paper were as follows: carboxymethyl cellulose (CMC) C4888 (Millipore Sigma, Mississauga, Canada), cationic starch (CS) National™ 0381

(Ingredion, Mississauga, Canada)), and glycerol G2025 (Millipore Sigma, Mississauga, Canada).

The different humidity levels were achieved using the saturated salt method with the following chemicals, purchased from Millipore Sigma (Mississauga, Canada): potassium nitrate (P8291), sodium chloride (BP358), magnesium nitrate hexahydrate (237175), magnesium chloride (M0250), and sodium iodide (Greenspan et al. 1977).

A commercial solution of phages, Listex™ P100 (Microcos, Wageningen, Netherlands) was purchased from Think Ingredients (Burlington, ON, Canada), containing phage P100 at a titer of approximately 10^{11} PFU (Plaque Forming Unit)/mL. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain (ATCC 19115) purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada) was used as the bacterial host. A fresh bacterial culture was prepared by inoculation 100 µL of a stock culture in 0.9 mL of tryptic soy broth (TSB; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) incubated 18h at 37°C in a shaking incubator (150 rpm) to obtain a concentration approximately 10^9 CFU/mL. The cell suspension was centrifuged at $5000\times g$ for 10 min at 4°C (Thermo Scientific Sorvall Legend XF) and washed with NaCl 0.85% (w/v) before resuspending cells in NaCl 0.85% (w/v) to obtain a concentration of 10^6 CFU/mL.

4.5.3. Coating solutions and coating process

The developed coating must meet several technical criteria. It should not be heavier than the paper that serves as its substrate. An experimental design is constructed to select the mixture with optimal phage preservation properties and to study the effect of

their quantity. Experiments were established based on a factorial design with three factors at two levels (-1 and +1) for CMC and three levels (-1,0 and +1) for CS and glycerol. The ranges for the constituents are as follows: Carboxymethylcellulose: 1-2% w/w, cationic starch: 0-2% w/w, glycerol: 1-5% w/w. The 17 coating solutions modeled by the experimental design are presented in Table 1. Subsequently, the dried samples were calendered at 90°C and 1000 psi using a Beloit Wheeler lab-scale calender.

Table 4-1. Composition of each coating solution in percent

Coating	Carboxymethylcellulose % (m/m)	Cationic starch % (m/m)	Glycerol % (m/m)	Solid content % (m/m)
C0	0	0	0	0
C1	1	0	5	6
C2	1	0	3	4
C3	2	2	1	5
C4	2	1	1	4
C5	2	1	5	8
C6	2	0	5	7
C7	2	1	3	6
C8	1	2	1	4
C9	1	1	3	5
C10	1	0	1	2
C11	2	0	1	3
C12	2	2	3	7
C13	2	0	3	5
C14	1	2	5	8
C15	1	1	3	5
C16	2	2	5	9
C17	1	2	3	6

The coating solutions were prepared by dissolving each biopolymer in distilled water and stirring the solutions on a magnetic hotplate stirrer at 500 rpm and 90°C for 3 hours. A single layer of each solution was manually applied using a lab-coater onto Kruger-based paper. The coated paper was dried for 30 seconds in a convection oven at 120°C. The

drying temperature is kept below the degradation temperature of the biopolymers. Water is evaporated to form a film on the surface of the sheet (de Britto et al. 2009, Danilovas et al. 2014). Calendering involves passing a sheet of paper between two heated cylinders to smooth it (Chaussy et al. 2016).

4.5.4. Coated paper characterization

4.5.4.1 Grammage

The grammage of the paper (m_f) is its mass per square meter. Its determination allows for the analysis of the weight of the coating applied to the surface of the base paper. It was calculated by the mass difference between the base paper and the coated paper, after standardization at a constant temperature of 22°C and 50% relative humidity, according to TAPPI standard 410 .[219] The measured mass was related to the surface area to be expressed in grams per square meter (g/m^2).

4.5.4.2. Thickness and permeability of the coating papers

Coating thickness was measured using an electronic digital micrometer (EDANA 30.4-89, Thwing-Albert, West Berlin, USA) with a sensitivity of 0.001 mm. Ten measurements were taken randomly at different points on each coated paper. Permeability was analyzed with the Parker Print Surfer (Mesmer M596), according to the TAPPI T555 standard method. The results were reported in milliliters per minute (mL/min).

4.5.4.3. Morphological characterization of coated paper

The morphology of the biopolymer-coated paper without the calendering step was observed by scanning electron microscopy (SEM) using a HITACHI SU1510 unit equipped with a high sensitivity semiconductor SE detector and an maximum acquisition 5120×3840 pixels image capture system (HITACHI, Mississauga, Canada). Samples were mounted in aluminum stubs using carbon adhesive tape and coated under vacuum with gold-palladium in a sputter coating unit. The images were obtained using secondary electrons and an acceleration voltage of 15 kV.

4.5.4.4. Optical characterization: transparency and color

The color of the control and paper samples was determined using a Color Touch X spectrophotometer according to the ISO 2469 standard. The CIELAB color space was used to determine the parameters L* (lightness), a* (green/red), and b* (blue/yellow). The total color difference (ΔE^*) between the samples and the Kruger base paper was calculated using Equation 1 (Li et al. 2021).

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

Equation 4-1

Analyses were carried out in triplicate. Six measurements were taken of each sample, and three samples of each coated paper were measured.

4.5.4.5. Fourier transformation infrared (FTIR) – attenuated total reflectance (ATR) spectroscopy

FTIR–ATR spectroscopy was used to characterize the presence of specific chemical groups in the materials (Alves et al. 2020). The analyses are performed with a Cary 630 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The spectra were the results of 64 co-added interferograms at 4cm^{-1} and resolution in the wavenumber range from 4000 to 650 cm^{-1} . The spectra analyses were performed using MicroLab Expert (1.0.0.7) software.

4.5.4.6. Water absorption as a function of the coatings constituents

The aim was to determine the amount of water (m_w) that the biopolymer-coatings can absorb. The coated papers were stored under different temperatures and humidity conditions (table 4-2). Humidity was controlled using saturated aqueous solution during storage (Greenspan et al. 1977). This technique is based on the different capacity of saturated salt solutions to absorb and desorb ambient humidity. This is the balance between the partial pressure of the water vapour and that created by the liquid. An equilibrium will be established between the ambient humidity and the absorbed water. For example, a saturated solution of magnesium chloride at 20°C results in a humidity level of 33%. The samples were placed under the humidity conditions specified in Table 4-2 until a constant weight was reached.

Table 4-2. Storage conditions of temperature and humidity of biopolymer-coated papers

Coated paper storage conditions	
Temperature (°C)	$23 \pm 2^\circ\text{C}$
Humidity (%RH)	$94 \pm 2\%$
	$75 \pm 2\%$
	$50 \pm 2\%$
	$32 \pm 2\%$

The samples from the different storage conditions were weighed once a constant weight was reached, from which the mass of the sample dried at 105°C was subtracted and then divided by its surface area (50 cm^2). The amount of water absorbed by the coating, water absorption capacity, (m_w) in grams per square meter was calculated using Equation 4-2.

$$m_w = \left(\frac{m_f - m_s}{S} \right)$$

Equation 4-2

With m_f final mass after conservation step, m_s mass in gram after drying and S surface in square meter.

Based on the calculated water quantities adsorb for each storage conditions, a nonlinear regression analysis was used to identify the effect of the biopolymer compounds on the water absorption capacity. The following equation was used to describe the water absorption capacity from the data collected (Prakash Maran et al. 2013).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \dots + \beta_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 + e_i$$

Equation 4-3

With independent variable: (X_1) carboxymethyl cellulose, (X_2) cationic starch, (X_3) glycerol, (X_4) ambient humidity, and the response Y : water mass. The final mathematical factorial model design includes 4 linear terms and 4 level of interaction terms.

4.5.4.6. Phage coating and phage coated paper storage

Biopolymer-coated papers were sterilized by exposure to UV under a laminar flow hood for 30 min (Leite et al. 2020). The sterilization of the samples was assessed by placing a 0.6 mm diameter paper disk on TSA agar and incubating it for 24 hours at 37 °C. A phage solution (Listex™ P100 in NaCl 0.9%) was spread uniformly on each paper, at a concentration of 5×10^5 PFU/cm². The concentration was determined using the double agar layer technique (Rajnovic et al. 2019), as presented in the following section (section 4.5.11). This enumeration allowed for the determination of the actual quantity of infectious phages remaining after drying, which also corresponds to the PFU/cm² count on day 0. The phage layer was dried 1 h under laminar flow until the relative humidity reached 30%.

Thereafter, phage-coated papers were stored under various conditions of temperature and humidity using the saturated aqueous solutions previously described. The temperature and humidity ranges for phage storage are given in Table 4-3.

Table 4-3. Conditions of temperature and humidity of storage conditions of phage-coated paper

Phage coated papers storage conditions		
Temperature (°C)	4 ± 2°C	23 ± 2°C
Humidity (%RH)	96 ± 2%	94 ± 2%
	75 ± 2%	75 ± 2%
	42 ± 2%	39 ± 2%

4.5.5. Assessment of the antibacterial performance of phage-coated paper

The antimicrobial activity of phage-coated papers was assessed by measuring the phage infectious activity released from the coated paper using the double layer agar (DLA) technique (Rajnovic et al. 2019). To quantify infective bacteriophage on the surface, 6 mm diameter coated paper samples were immersed in 3 mL of PBS and shaken with an orbital shaker (Infors HT, Ecotron) at 120 rpm at room temperature for 1 hour. After this step, 100 µL is collected and added to 3 mL of TSA/TSB (1:1) kept liquid at 40°C, along with 100 µL of *L. monocytogenes* culture at 10⁸ PFU/mL. Then, the mixture is poured onto the surface of a TSA agar plate and incubated at 30°C for 24 hours. After incubation, the bacterial lysis plaques are counted. The PFU (Plaque Forming Units) quantify the number of infectious phages capable of forming plaques on a medium containing susceptible bacteria. The phage titer was expressed as plaque-forming units per cm² (PFU/cm²) of paper. All samples were analyzed in triplicate.

4.5.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using JMP PRO 17. To compare properties of different coated paper, ANOVA tests were conducted for comparisons involving more than two groups. In cases where only two groups were compared, the Student's t-test was employed. To evaluate the impact of variables, the multiple linear regression was used. The quality of the model obtained was evaluated on the standard R-squared, which measures the proportion of the variance in the dependent variable explained by the model, was complemented by the adjusted R-squared. The adjusted R-squared accounts for two factors: the number of explanatory variables in the model and the sample size. Model were considered robust when standard R-square and adjusted R-square exceeded 0.8.

4.6. Results and discussion

4.6.1. Effect of coating formulation on the physical properties of coated papers

This section investigates the paper properties after the application of coating solutions. The results for dry grammage, grammage at 50% RH, thickness, and permeability, both before (BC) and after (AC) the calendering step, are presented in this section.

Table 4-4. Statistical comparison of mass of dry coatings and coatings at 50%RH

Coating	Solid content (%)	Grammage (m_s) (Dry mass) (g/m ²)	Grammage (m_f) at 50% RH (g/m ²)
C0	0	48.3 ± 0.3 h	52.0 ± 0.5 i
C1	6	53.9 ± 0.3 e	57.1 ± 0.8 f
C2	4	52.4 ± 0.2 f	55.1 ± 0.3 g
C3	5	54.0 ± 0.3 c	57.3 ± 0.9 bcd
C4	4	53.4 ± 0.4 c	57.7 ± 1.3 cde
C5	8	55.4 ± 0.3 b	57.8 ± 0.5 b
C6	7	53.9 ± 0.2 cd	58.1 ± 0.8 e
C7	6	54.6 ± 0.3 c	57.6 ± 1.3 de
C8	4	52.6 ± 0.3 ef	56.7 ± 1.0 fg
C9	5	53.8 ± 0.2 ef	56.1 ± 0.6 fg
C10	2	50.9 ± 0.2 g	54.8 ± 0.2 h
C11	3	51.8 ± 0.3 ef	55.7 ± 0.7 fg
C12	7	55.4 ± 0.7 b	58.0 ± 1.4 a
C13	5	53.4 ± 0.3 ef	56.8 ± 0.9 f
C14	8	54.9 ± 0.2 c	58.2 ± 1.0 bc
C15	5	53.4 ± 0.4 de	56.8 ± 0.8 f
C16	9	57.4 ± 0.9 a	60.9 ± 1.1 a
C17	6	54.0 ± 0.2 c	57.5 ± 1.0 cde

N=10

In the dry state, the mass difference between the biopolymer-coated paper and the base Kruger paper was attributed to the addition of coatings. According to table 4, the result of the Student's t-test showed that all biopolymer-coated samples grammage where

significantly different from the base paper grammage. This observation was also true at 50% RH.

Highest grammage for both conditions was observed for the biopolymer-coated sample C16, which had the highest solid content (9% m/m). In contrast, the lowest biopolymer-coated grammage, was found for sample C2, with 2% m/m.

When stored at 50% relative humidity (RH), the biopolymers in the coatings absorbed more moisture as showed in figure 2. However, while biopolymer-coated paper with high solid content showed a high grammage at 0%RH, this observation was not true at 50%RH. Indeed, at 50% RH, the solid content of sample C1 was equal to 6% m/m, yet its grammage ($57.1 \pm 0.8 \text{ g/m}^2$) was lower than sample C4 ($57.7 \pm 1.3 \text{ g/m}^2$), which had a solid content of 4% m/m (see table 2). In other cases, the difference in solid content resulted in minimal variation in the grammage. For example, C3 and C5 had solid contents of 5% and 8% m/m, respectively and showed grammage at 50%RH of $57.3 \pm 0.9 \text{ g/m}^2$ and $57.8 \pm 0.5 \text{ g/m}^2$ respectively (see table 2). It highlighted the influence of the biopolymer formulation in the capacity to absorb ambient moisture. A more detailed investigation of this aspect is presented later in Section 3.4. Despite the addition of coating to the paper, the maximum limit of 10 g/m^2 is not reached with the maximum grammage (at 50% RH) at 8.9 g/m^2 for C16.

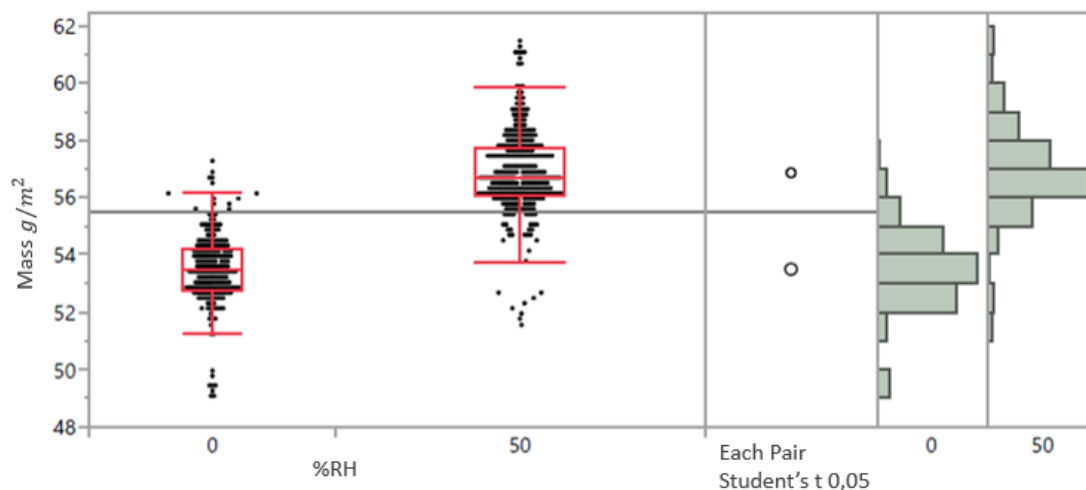


Figure 4-2. Comparison of the Mass of Dry Coatings and Coatings at 50% Relative Humidity

In accordance with the TAPPI Standard T410, calendaring, thickness characterizations and permeability characterizations were performed on paper stored at 50% RH (TAPPI 2007). Before conducting the thickness and permeability analyses, a calendaring step was performed to smooth the coated papers. To assess the impact of this step on the paper, the grammage was calculated before and after the process.

The data for the different grammages at 50% RH, both before and after calendering, for each coating are presented in table 4-5.

Table 4-5. Comparison of coating mass at 50%RH before and after calendering steps and coatings

Coating	Solid content (%)	Grammage (m_f) at 50% RH		
		BC (g/m ²)	AC (g/m ²)	Diff (%)
C0	0	52.0 ± 0.5	52.2 ± 0.5	0.4
C1	6	57.1 ± 0.8	56.5 ± 0.6	-1.1
C2	4	55.1 ± 0.3	55.9 ± 0.5	-1.5
C3	5	57.3 ± 0.9	57.4 ± 1.3	-0.2
C4	4	57.7 ± 1.3	56.3 ± 0.8	-2.4
C5	8	57.8 ± 0.5	58.0 ± 1.0	-0.3
C6	7	58.1 ± 0.8	57.4 ± 0.6	-1.2
C7	6	57.6 ± 1.3	57.7 ± 1.3	-0.2
C8	4	56.7 ± 1.0	55.5 ± 0.3	-2.1
C9	5	56.1 ± 0.6	56.3 ± 0.6	-0.4
C10	2	54.8 ± 0.2	54.4 ± 1.1	-0.7
C11	3	55.7 ± 0.7	55.8 ± 0.5	-0.2
C12	7	58.0 ± 1.4	59.0 ± 1.7	-1.7
C13	5	56.8 ± 0.9	56.5 ± 0.8	-0.5
C14	8	58.2 ± 1.0	58.0 ± 0.6	-0.3
C15	5	56.8 ± 0.8	56.7 ± 0.6	-0.2
C16	9	60.9 ± 1.1	59.9 ± 1.4	-1.6
C17	6	57.5 ± 1.0	56.8 ± 1.6	-1.2

N=10

It was previously shown that the grammage of the coated paper is a function of the solid content of the applied coating and the biopolymer coating formulation. As highlighted in figure 3, the calendaring step did not significantly change paper grammage. Indeed, the distribution of values for each conditions was homogeneous. The average grammage before calendering is 56.91 g/m², and after calendering, it is 56.78 g/m². Thus, the difference was not considered significant. As reported in the literature, paper calendaring does not change its grammage (Chaussy et al. 2016)

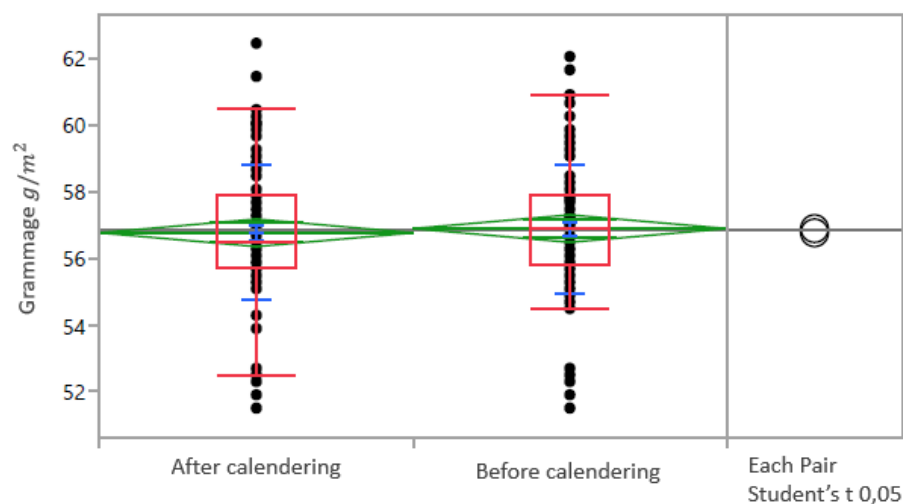


Figure 4-3. Distribution of sample masses based calendering step.

In contrast, the thickness significantly decreased after calendering. The thickness data are presented in the table 6. The thickness of the Kruger C0 paper was equal to $54.90 \pm 0.52 \mu m$, while the applied coatings on the paper surface had an average thickness of $14.79 \pm 1.09 \mu m$. After calendering, the thickness of C0 and the average coating thickness were equal to $49.24 \pm 1.54 \mu m$ and $2.60 \pm 1.89 \mu m$, respectively.

Table 4-6. Comparison of thickness before and after calendering steps

Coating	Solid content (%)	Before calendering (μm) (BC)		After calendering (μm) (AC)	
		Coated paper	Coating	Coated paper	Coating
C0	0	54.90 ± 0.52	NC	49.24 ± 1.54	NC
C1	6	69.28 ± 1.08	14.38 ± 1.08	52.73 ± 2.04	3.49 ± 2.04
C2	4	68.49 ± 0.84	13.59 ± 0.84	51.51 ± 2.61	2.28 ± 2.61
C3	5	69.93 ± 0.94	15.03 ± 0.94	52.20 ± 1.80	2.96 ± 1.80
C4	4	70.55 ± 1.22	15.65 ± 1.22	51.06 ± 1.25	1.83 ± 1.25
C5	8	70.62 ± 1.11	15.72 ± 1.11	52.19 ± 2.65	2.95 ± 2.65
C6	7	69.04 ± 0.38	14.14 ± 0.81	51.24 ± 1.42	2.00 ± 1.42
C7	6	69.75 ± 0.80	14.85 ± 0.80	51.84 ± 1.69	2.60 ± 1.69
C8	4	69.39 ± 0.68	14.49 ± 0.68	52.99 ± 2.59	3.75 ± 2.69
C9	5	68.45 ± 0.87	13.55 ± 0.87	50.80 ± 1.75	1.56 ± 1.75
C10	2	68.61 ± 0.86	13.71 ± 0.86	50.28 ± 1.16	1.04 ± 1.16
C11	3	68.85 ± 0.88	13.95 ± 0.88	51.12 ± 2.11	1.88 ± 2.11
C12	7	70.11 ± 1.34	15.21 ± 1.34	53.24 ± 1.50	4.00 ± 1.50
C13	5	68.71 ± 1.35	13.81 ± 1.35	50.74 ± 1.56	1.50 ± 1.56
C14	8	70.31 ± 0.71	15.41 ± 0.71	52.15 ± 2.62	2.91 ± 2.62
C15	5	71.31 ± 1.92	16.41 ± 1.92	50.63 ± 0.85	1.39 ± 0.85
C16	9	72.15 ± 1.78	17.25 ± 1.78	53.27 ± 2.88	4.04 ± 2.88
C17	6	69.16 ± 1.35	14.26 ± 1.35	53.23 ± 1.71	4.00 ± 1.71

N=10

The decrease in the thickness of the base paper C0 was equal to $5.66 \pm 0.31 \mu\text{m}$, while the average coating thickness decrease was equal to $12.19 \pm 1.17 \mu\text{m}$. It was previously observed that the mass variation associated with calendering is not significant. Therefore, it was assumed that the coating was compressed against the surface of the paper. The ANOVA results performed on the coating thicknesses before and after calendering are presented in figure 4.

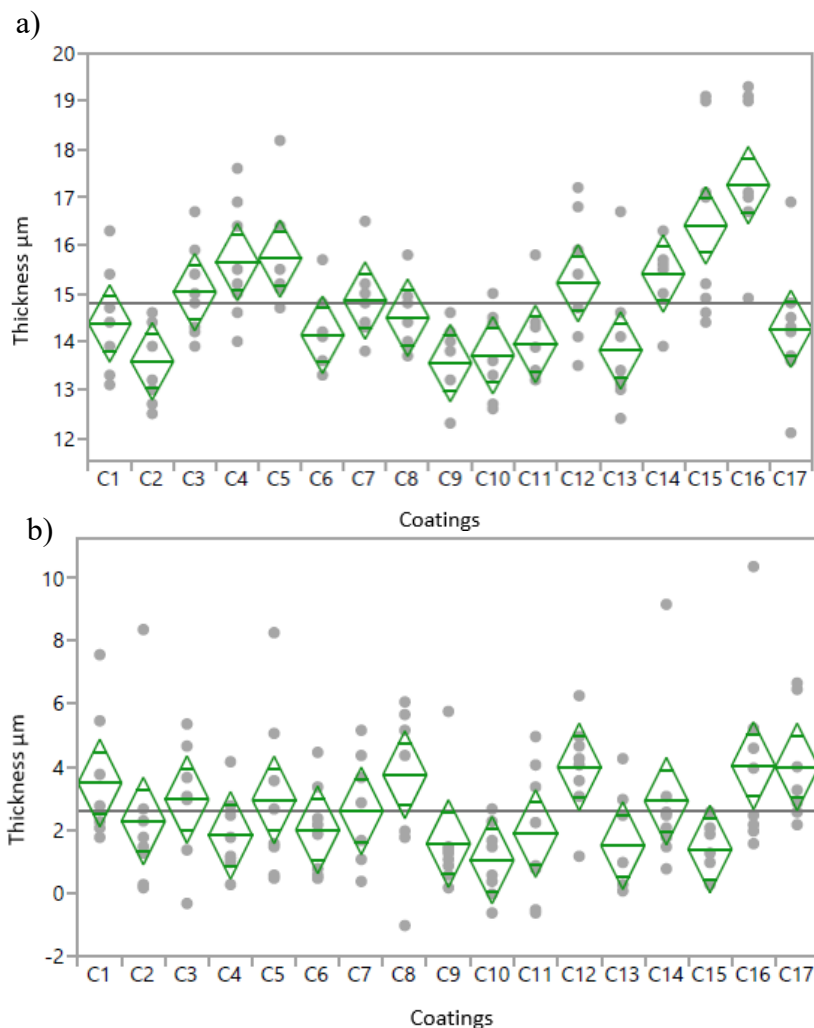


Figure 4-4. Distribution and comparisons of thicknesses before and after calendaring.

a) before calendaring step and b) after calendaring step

Before calendaring, the thickness of the coating was not statistically different among the samples (fig.4-3a) according to the ANOVA performed, except for C16. However, after calendaring, the differences were homogenized (Figure 4-3.b), and the ANOVA statistical analysis does not reveal any significant differences. Thus, calendaring acted as a step for standardizing biopolymer-coating thickness.

Application of the biopolymer coating also reduced paper permeability. As shown in Table 4-7, before calendaring, permeability measured on biopolymer-coated paper was

significantly lower than the base paper. According to Bajpai et al. (Bajpai et al. 2018), by applying a layer of polymer, reduced surface roughness while gaps were filled.

Table 4-7. Comparison of permeability before and after calendering steps

Coating	Solid content (%)	Permeability		
		BC (mL/min)	AC (mL/min)	Diff (%)
C0	0	50.2 ± 1.1	22.2 ± 2,6	-55.7
C1	6	4.9* ± 0.7	5.0* ± 0.9	N/A
C2	4	5.1 ± 0.9	1.2* ± 0.4	N/A
C3	5	0* ± 0	0* ± 0	N/A
C4	4	0* ± 0	0* ± 0	N/A
C5	8	0* ± 0	0* ± 0	N/A
C6	7	4.3* ± 0.5	1.0* ± 0.7	N/A
C7	6	0* ± 0	0* ± 0	N/A
C8	4	0.3* ± 0.5	0* ± 0	N/A
C9	5	0.3* ± 0.5	0* ± 0	N/A
C10	2	6.4 ± 1.6	2.4* ± 0.9	N/A
C11	3	3.9* ± 0.7	1.2* ± 0.4	N/A
C12	7	0* ± 0	0* ± 0	N/A
C13	5	0* ± 0	0* ± 0	N/A
C14	8	0.1* ± 0.4	0* ± 0	N/A
C15	5	1.0* ± 0.6	0* ± 0	N/A
C16	9	0* ± 0	0* ± 0	N/A
C17	6	0.1* ± 0.4	0* ± 0	N/A

N=10

* Below the detection limit of 5mL/min.

This observation was confirmed with the present results. Indeed, the application of the biopolymer-coating alone reduced permeability below the detection limit, except for C2 and C10. For C2 and C10, the calendering step was necessary to decrease permeability below the detection limit.

The base paper and the C16 coated paper were observed by scanning electron microscopy. C16 was chosen because it has the highest solid content of all the samples (2% CMC, 2% CS and 5% GLY for 9% solid content). A comparison of the uncoated

paper (Figure 4-4.a) and coated paper (Figure 4-4.b) surfaces revealed homogeneous coverage of the paper fibers. Fibers of the Kruger based paper were still observable due the thin coating. Nevertheless, the initial roughness and asperity were reduced with the coating and calendering step.

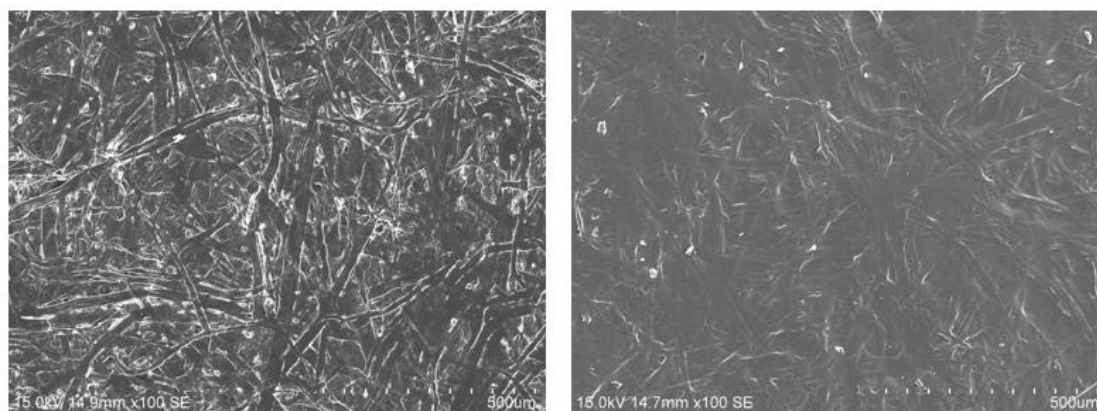


Figure 4-5. SEM observation of Kruger based paper (a) and coating paper surfaces (b)

4.6.2. Color properties of coatings

By applying a coating on paper, the optical properties could also be affected, potentially affecting the attractiveness of the packaging. For example, color is one of the most important properties in a coated paper which can affect the consumer acceptance in food applications (Spence and Velasco 2018). The color properties and opacity values of the films are presented in Table 4-8. The L^* , a^* , and b^* values are color parameters affected by the film type. The appearance of the C0 (base paper) was light white, the L value was 93.33 ± 0.04 . In addition, the values of a and b were -0.62 ± 0.02 and 5.70 ± 0.07 , respectively. Comparison of the differences between samples for each parameter was

performed. The results of pairwise comparisons using Student's t-test were presented in table 8. Samples connected by the same letter(s) were not significantly different from each other.

Table 4-8. Optical characterization of coated paper

Samples	L*	α^*	b*	ΔE^*
C0	93.33 $\pm$ 0.04 a	-0.62 $\pm$ 0.02 ab	5.70 $\pm$ 0.07 fg	NC
C1	91.65 $\pm$ 0.07 bcde	-0.73 $\pm$ 0.02 def	5.74 $\pm$ 0.09 efg	1.68 $\pm$ 0.07 gh
C2	91.84 $\pm$ 0.07 b	-0.73 $\pm$ 0.01 def	5.61 $\pm$ 0.05 g	1.50 $\pm$ 0.8 i
C3	90.50 $\pm$ 0.20 j	-0.66 $\pm$ 0.07 bc	6.77 $\pm$ 0.37 b	3.05 $\pm$ 0.06 b
C4	91.63 $\pm$ 0.06 cdef	-0.71 $\pm$ 0.01 cde	5.57 $\pm$ 0.05 g	1.71 $\pm$ 0.06 g
C5	91.44 $\pm$ 0.07 fg	-0.72 $\pm$ 0.02 cdef	5.75 $\pm$ 0.06 efg	1.89 $\pm$ 0.07 f
C6	91.68 $\pm$ 0.06 bcd	-0.74 $\pm$ 0.02 ef	5.86 $\pm$ 0.14 def	1.67 $\pm$ 0.04 ghi
C7	90.96 $\pm$ 0.05 i	-0.73 $\pm$ 0.05 def	6.49 $\pm$ 0.10 c	2.50 $\pm$ 0.02 cd
C8	91.56 $\pm$ 0.07def	-0.72 $\pm$ 0.02 cdef	5.72 $\pm$ 0.03 fg	1.77 $\pm$ 0.02 fg
C9	91.10 $\pm$ 0.09 i	-0.78 $\pm$ 0.04 f	6.44 $\pm$ 0.09 c	2.36 $\pm$ 0.06 d
C10	91.13 $\pm$ 0.16 gh	-0.71 $\pm$ 0.07 cde	7.00 $\pm$ 0.08 a	2.41 $\pm$ 0.09 d
C11	91.81 $\pm$ 0.05 bc	-0.72 $\pm$ 0.01 cdef	5.75 $\pm$ 0.02 efg	1.52 $\pm$ 0.05 hi
C12	91.16 $\pm$ 0.32 hi	-0.67 $\pm$ 0.02 bcd	5.71 $\pm$ 0.15 fg	2.17 $\pm$ 0.32 e
C13	91.02 $\pm$ 0.12 i	-0.69 $\pm$ 0.06 cde	6.05 $\pm$ 0.12 d	2.34 $\pm$ 0.10 de
C14	91.46 $\pm$ 0.06 efg	-0.71 $\pm$ 0.03 cde	5.95 $\pm$ 0.13 de	1.89 $\pm$ 0.05 f
C15	91.67 $\pm$ 0.04 bcd	-0.74 $\pm$ 0.01 ef	5.68 $\pm$ 0.07 fg	1.67 $\pm$ 0.04 ghi
C16	90.15 $\pm$ 0.12 k	-0.59 $\pm$ 0.06 a	6.81 $\pm$ 0.26 ab	3.38 $\pm$ 0.02 a
C17	91.04 $\pm$ 0.15 i	-0.78 $\pm$ 0.01 f	4.46 $\pm$ 0.06 h	2.61 $\pm$ 0.16 c

N=3

The color difference of the coated papers was calculated relative to the base paper C0 using Equation 3. With a $\Delta E^* = 0$, the two samples are identical in terms of color. For a ΔE^* lower than 2, the samples are considered very similar. For a ΔE^* between 2 and 5, there is a perceptible color difference, although it is difficult to discern with the naked eye. Specific lighting conditions are required to appreciate the differences. Finally, for a ΔE^* greater than 5, the color difference is clearly perceptible [220]. The coatings C3, C7, C9, C10, C12, C13, C16, and C17 had ΔE^* values greater than 2, which corresponds to the

threshold of perceptibility under very specific conditions. Only C3 and C16 showed a statistically significant difference compared to the other coatings. However, with $\Delta E^* = 3.05$ for C3 and $\Delta E^* = 3.38$ for C16, the color difference remains debatable to the naked eye outside of optimal observation conditions [221].

Thus, coating had minimal impact on color appearance. Calendering stage modified the physical properties of the paper in different ways: thickness decreased, while gloss and softness increased (Tourette et al. 2007, Kim et al. 2022). Calendering had no effect on the optical properties of coated papers.

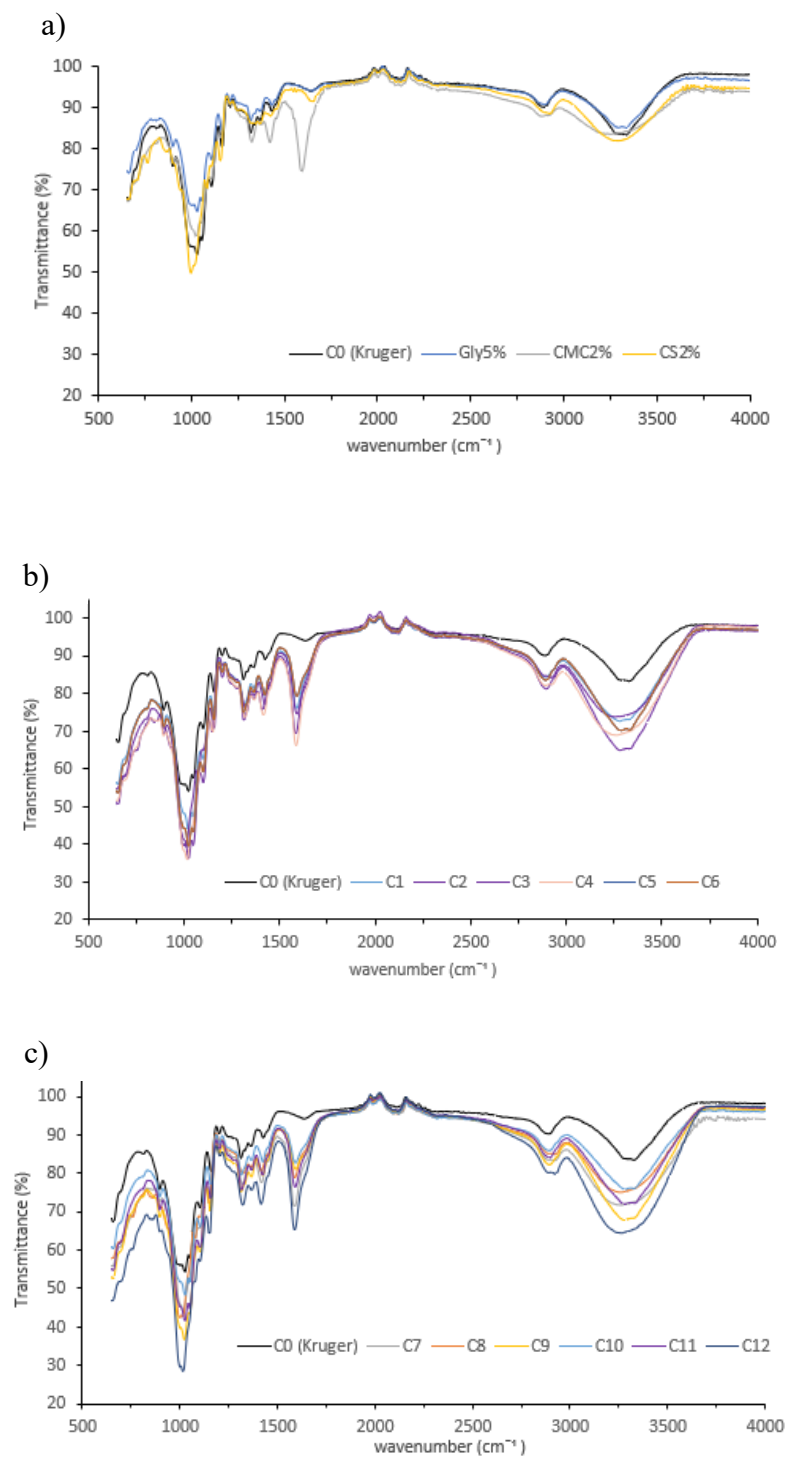
4.6.3. FTIR spectra results

The analysis of FTIR spectra provides a qualifying role for the substances applied to the surface of the papers. Here, this analysis aimed to appreciate the chemical surfaces changes on the coated papers and to evaluate the evolution of absorption bands linked to water. These results were obtained on standard conditions of storage (50% RH, 25°C).

As controls, C0 base paper was used along with three paper coated with, respectively, 5% glycerol (Gly), 2% carboxymethyl cellulose (CMC), and 2% cationic starch (CS). The infrared spectra are presented in Figure 5.a. All the control samples shared spectral characteristics at 3299 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} and 1144 cm^{-1} . The wide absorption band observed around 3299 cm^{-1} was characterizing the stretching frequency of the OH group and indicating the presence of water residues (Su et al. 2010). The band at 2922 cm^{-1} was characteristic of the asymmetric stretching of CH bonds (Kiemle et al. 2016). The

peak around 1100 cm^{-1} corresponded to the stretch vibration zone of C-O of the pyranose ring ($1142\text{-}1035\text{ cm}^{-1}$) (Hazrol et al. 2021). For the cationic starch, the peak at 1000 cm^{-1} differed from those observed on the other controls. The shift in the peak corresponds to the stretching of CH-OCH₂ bonds (Biswal et al. 2004). The spectral features of carboxymethylcellulose were observed at 1597 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} and 1331 cm^{-1} , which are attributed to C=O bond, to folding by plane flexion of CH₂ groups and to COH bond flexion, respectively (Tavares et al. 2020).

Spectra of all samples showed absorption bands at 3299 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} and 1331 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} and 1000 cm^{-1} . The specific peaks at 1597 cm^{-1} , 1415 cm^{-1} , and 1331 cm^{-1} for CMC were found in all the samples. This confirmed the presence of carboxymethylcellulose on the surface of all the samples. These peaks became more intense as the concentration of carboxymethylcellulose increased. The same observation applied to the peaks at 1100 cm^{-1} and 1000 cm^{-1} , which were characteristic of the stretching vibration of the C-O bond in the pyranose ring and the stretching of CH-OCH₂ bonds, respectively. As the amounts of carboxymethyl cellulose (CMC), cationic starch (CS), and glycerol increased, the transmittance at 3268 cm^{-1} decreased. This reflected the higher water content associated with three-component coatings.



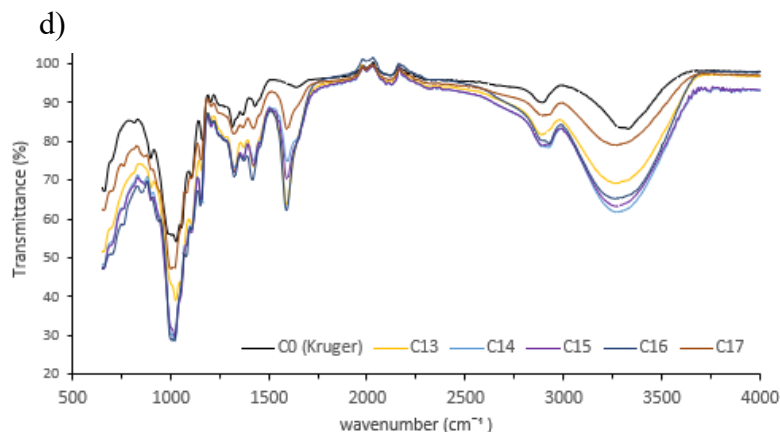


Figure 4-6. FTIR spectra of control C0, Gly5%, CMC2% and CS2% (a) and coated papers C0, C1, C2, C3, C4, C5, C6 (b), C0, C7, C8, C9, C10, C11, C12 (c), C0, C13, C14, C15, C16 and C17 (d)

The coated papers C3, C5 (Figure 4-5.b), C7, C12 (Figure 4-5.c), C14, C15, and C16 (Figure 4-5.d) had a higher and larger peak at 3299 cm^{-1} than the other coatings tested. These papers had the highest water absorption potential of those tested in the experimental design.

4.6.4. Water absorption as a function of coating polymers

The biopolymer-coated papers were stored at four humidity conditions, and water absorption was analyzed by measuring their moisture content. The samples, 17 coated papers (C1 to C17) and Kruger paper control (C0), were stored for several days (until constant weight) at four humidity conditions (32%, 52%, 75% and 94%) and at $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Water absorbed by the biopolymer-coated papers under those conditions are summarized in table 4-9.

Table 4-9. Amount of water absorbed by biopolymer-coated papers and Kruger paper control at different humidity conditions

Coating	CMC (%)	CS (%)	Glycerol (%)	Solid content (%)	Amount of water absorbed (g/m ²)			
					32% RH	50% RH	75% RH	94% RH
C0	0	0	0	0	1.11 ± 0.45	2.86 ± 0.45	4.74 ± 0.41	7.13 ± 0.32
C1	1	0	5	6	1.99 ± 0.47	3.12 ± 0.49	6.23 ± 0.50	8.35 ± 0.40
C2	1	0	3	4	2.09 ± 0.57	3.32 ± 0.48	5.79 ± 0.46	8.16 ± 0.60
C3	2	2	1	5	3.02 ± 0.70	3.99 ± 1.34	7.95 ± 0.93	9.33 ± 1.31
C4	2	1	1	4	1.86 ± 0.66	2.96 ± 0.88	5.66 ± 0.84	6.62 ± 0.79
C5	2	1	5	8	2.09 ± 0.64	3.20 ± 0.81	7.18 ± 0.86	9.00 ± 1.08
C6	2	0	5	7	2.31 ± 0.52	3.40 ± 0.58	6.08 ± 0.65	8.35 ± 0.95
C7	2	1	3	6	2.59 ± 0.86	2.79 ± 1.17	6.07 ± 0.92	8.75 ± 0.85
C8	1	2	1	4	1.78 ± 0.44	2.67 ± 0.35	5.60 ± 0.48	7.49 ± 0.95
C9	1	1	3	5	2.35 ± 0.43	3.20 ± 0.59	5.72 ± 0.68	8.85 ± 0.66
C10	1	0	1	2	1.99 ± 0.59	2.63 ± 0.97	5.52 ± 0.41	6.83 ± 0.56
C11	2	0	1	3	1.97 ± 0.46	2.97 ± 0.71	5.54 ± 0.77	7.86 ± 0.66
C12	2	2	3	7	2.19 ± 1.17	4.56 ± 1.29	7.67 ± 1.13	8.29 ± 1.03
C13	2	0	3	5	2.38 ± 0.58	3.52 ± 0.68	6.48 ± 0.71	8.13 ± 0.58
C14	1	2	5	8	2.19 ± 0.95	3.41 ± 0.81	6.45 ± 0.85	8.81 ± 0.66
C15	1	1	3	5	2.23 ± 0.38	3.18 ± 0.39	5.89 ± 0.59	8.02 ± 0.79
C16	2	2	5	9	2.66 ± 0.65	3.90 ± 1.23	7.75 ± 0.95	11.43 ± 0.87
C17	1	2	3	6	2.55 ± 0.67	3.72 ± 1.00	6.57 ± 0.79	8.19 ± 0.69

N=10

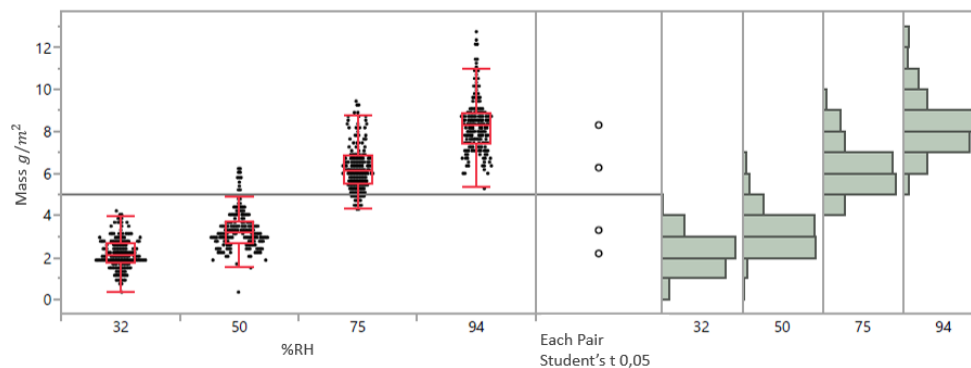


Figure 4-7. Dispersion of water mass absorbed per square meter based on storage humidity.

The impact of storage conditions was impactful on biopolymer-coated papers water absorption capacity. Indeed, by increasing relative humidity during storage, water absorbed by coating paper increased. As shown in figure 4-7, the Student' t-test highlighted that the amount of water absorbed was significantly different for each conditions. These results showed that relative humidity was an impactful parameter on water absorption capacity. The amount of applied biopolymer-coating was also investigated regarding water absorption. Figure 4-7 shows the amount of water absorbed as a function of solids content. The boxplots highlight the dispersion of the values, and the green diamonds represent the means of the compared groups.

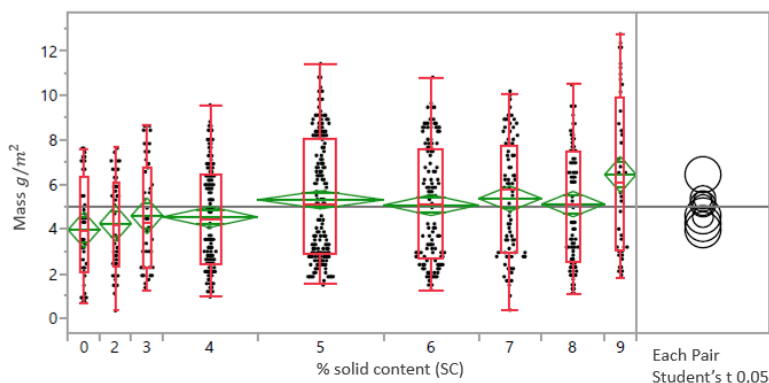


Figure 4-8. Water absorption as a function of the solids content in the coatings

According to Figure 4-8, there was no significant difference observed between papers coated with solutions containing solid content from 0% to 8%; however, at a solid content of 9%, a noticeable difference became apparent. These results do not fully account for the water mass present in the paper samples, suggesting that composition of biopolymer coating impacted the observed measurements.

To determine the influence of carboxymethylcellulose, cationic starch, glycerol, and relative humidity on the amount of water absorbed by the biopolymer-coating, multiple linear regression was used to highlight the effect and interactions of these parameters. A good quality regression model was obtained with an adjusted R-squared equal to 0.89, as shown in figure 4-8.

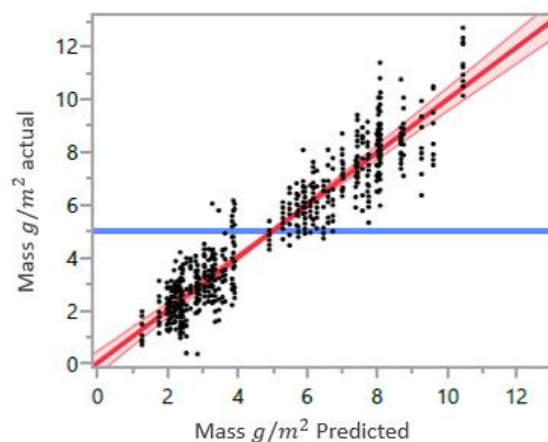


Figure 4-9. Comparison of observed values and model-predicted values describing water absorption capacity as a function of biopolymers.

According to the model developed, after relative humidity storage conditions effect, the effects of coating components and their interactions were significant. Indeed, as highlighted in figure 4-9, carboxymethylcellulose, cationic starch, and glycerol had similar effect on water absorption (respectively 12.695, 12.458 and 12.045). In addition to these main effects, %RH, GLY and CS interactions with CMC had significant impacts on the water absorption. The use of a combination of biopolymers in film formation resulted in coatings with enhanced water absorption potential according to Janik et al. (Janik et al. 2022). In this study, it was demonstrated that a blend of starch and alginate used as a coating increased water absorption. Another report found similar results with a blend of CMS and CMC (Wilpiszewska et al. 2020). In addition to biopolymers, the addition of glycerol can also affect the internal moisture content of the coating [222].

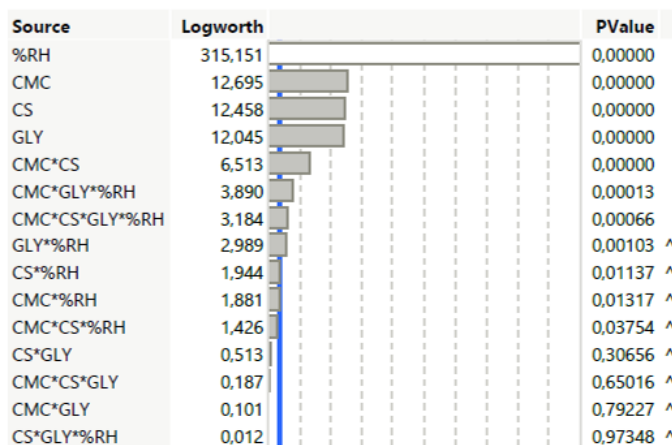


Figure 4-10. Effect of components and humidity on water absorption by the Coatings

The interaction between the explanatory variables had an impact on water absorption capacity. Thus, the assembly of the three components allowed large amount of water to be absorbed. As previously shown (Yang et al. 2000, Pasini Cabello et al. 2015), the networks formed by the interaction of different biopolymers have an effect in the amount of water link for each different coating.

The coated papers C3, C5, C7, C12, C14, and C16 (Table 4-9) had the greatest water absorption capacity and were hypothesized as the best candidates to maintain phage activity.

4.6.5. Antibacterial activity of bioactive papers

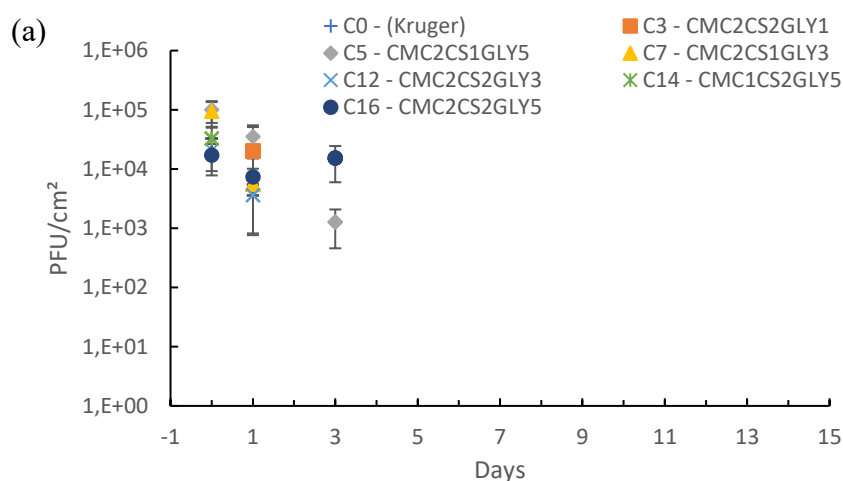
To investigate the effect of storage conditions on phage infectivity, a lysis zone-based antimicrobial test was conducted on the bioactive papers. Among the 17 coated

paper samples, those exhibiting the highest water absorption capacity (C3, C5, C7, C12, C14, and C16) were selected for phage stability tests at different storage conditions. Phage solution concentration applied on the papers was equal to 4×10^8 PFU/mL. Thus, the concentration of phages on the papers was estimated at 5×10^5 PFU/cm². All bioactive papers samples were dried for one hour under laminar flow. As previously presented in section 2.4.7, a count was performed after the drying step for each sample. Day 0 corresponded to the initial quantity of bacteriophages counted following the drying step. The bioactive papers were then stored at two temperatures (4°C and 23°C) and three relative humidity conditions (42%, 75%, and 96%).

No lysis zone was observed in the bioactive papers stored at 23°C during the first 48 hours, indicating that the phages had been inactivated. Thus, the analysis of the bioactivity of the papers was not done for the tests performed under this temperature condition. Previous studies reported better phage stability at temperatures approaching 4°C compared to 23°C and higher temperatures. The storage temperature of phages is an important factor in their stability and their recovery after drying treatment (Ahmadi et al. 2017, Mehdi et al. 2022).

Under storage condition at 4°C, phage-coated paper C0 showed no lysis zone after one day of for all tested humidity condition (42%, 75%, and 96%). Nevertheless, the infectivity of the phages was maintained for the rest of the bioactive papers stored at 4°C. The phages activity evolution during storage at 4°C for each RH condition is presented in Figure 4-10. After 7 days of storage at 75% RH and at 4°C, the coatings C5, C12 and C16 retained their antibacterial activity with only a one-log loss since day 0, with titers of 10^3 ,

10^2 and 10^4 PFU/cm², respectively. After 14 days of storage at 4°C and 75%RH, the C12 and C16 coatings still had antibacterial activity. For C16, the phage titers were similar at day 14 compared to day 7 (10^3 PFU/cm²). For C5, a decrease of one log was observed, down to 10^2 PFU/cm². In contrast, under storage conditions at 42% and 96% relative humidity, phage activity lasted only 3 days. The highest antibacterial activity, based on the phage concentration retained on the papers, was achieved with the combination of CMC2-CS2-Gly5 (C16). This coating formula outperform the other coated papers studied and maintained the phage bioactivity for minimum 3 days at all relative humidity and even up to 14 days at 75% RH. This coating formula was also the most promising for water absorption capacity, despite other paper coatings having similar water absorption capacity. The stability of the bacteriophages applied to the surface was not solely dependent on water absorption, but also on the specific physical properties provided by the biopolymers.



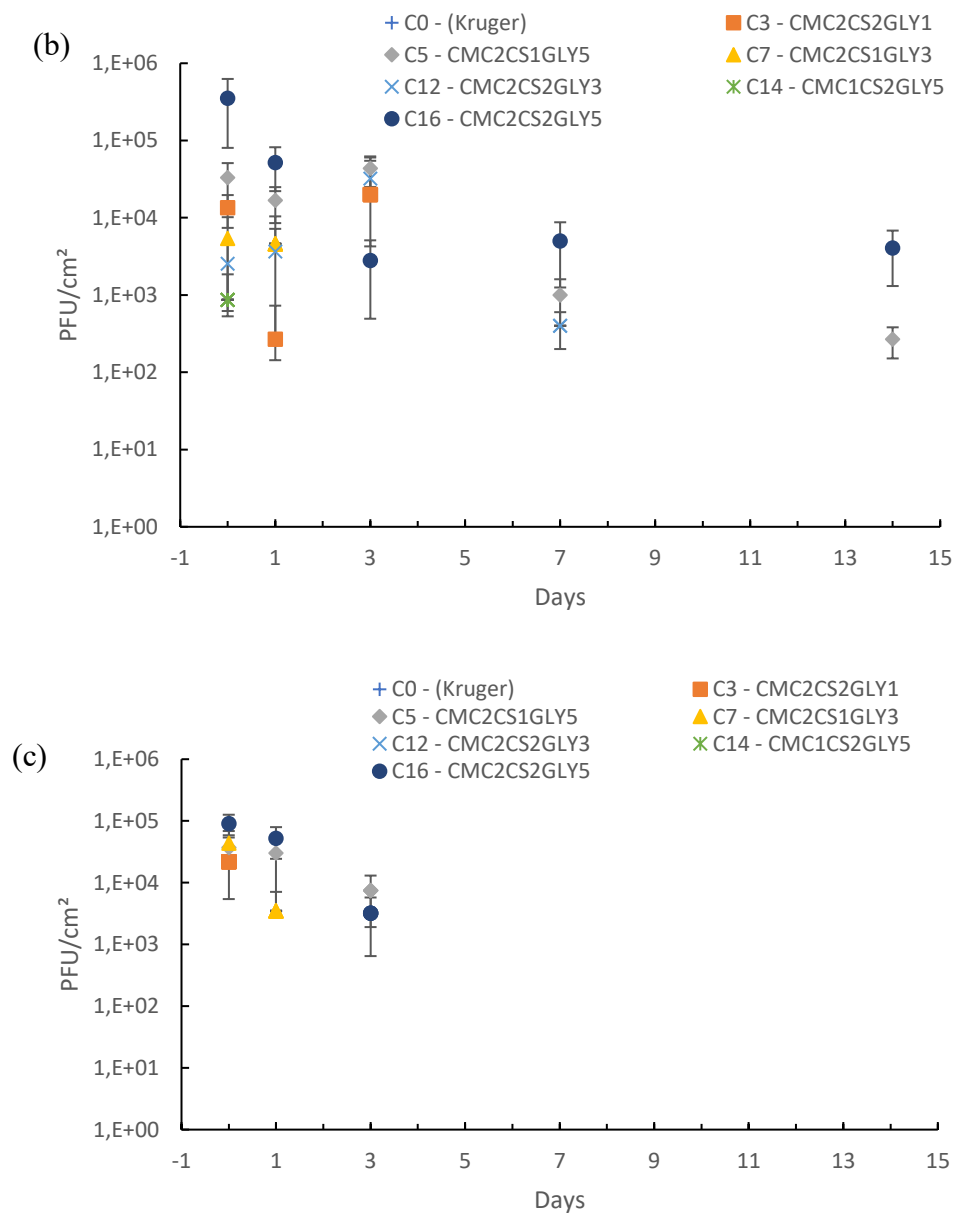


Figure 4-11. Antimicrobial activity of bioactive papers at (a) 42% RH, (b) 75% RH, and (c) 96% RH.

(For clarity, only the samples with a counted bacteriophage activity per square centimeter are shown)

Removal of the water layer surrounding phages can alter electrostatic forces and causes three-dimensional disorganization of protein structure. Water bound to proteins participates in the stabilization of its structure (Harada et al. 2018). To enhance phage stability, the water content in the environment has been identified as a critical factor (Balcão et al. 2013).

On average, results presented showed that the drying step reduced the phage concentration on the paper surface by 2 logs. This loss in activity at such temperature was also observed previously by Lone et al. in 2016. Indeed, during the investigation of an anti-E. coli phage cocktail (LinM-AG8, LmoM-AG13 and LmoM-AG20) on paper coated with alginate beads, a reduction of 2.6 logs in phage was observed (Lone et al. 2016). The present results showed that it was also the case for phage LISTEXTM P100 on CMC-CS-Gly-coated papers.

The nature of the coating components affected the performance of phage activity as well as phage retention under different conditions of storage. Here, glycerol, used as a plasticizer, enhanced the wettability of the coating (Seligra et al. 2016, Ruan et al. 2019). Also, CMC, with its highly hydrophilic nature due to the carboxymethyl groups attached to the hydroxyl groups, was the main water absorption agent (Heinze et al. 1999). Finally, cationic starch likely interacted with phages via weak bonds (Vonase et al. 2017). The combination of these components, significantly improved phage stability when applied to a coated paper. In this study, the coatings with the highest water absorption potential were those that also provided the best phage stability when applied on paper. Moreover, a

storage at 75% relative humidity yielded better results than when the phage-containing coated paper were stored at 45% and 96% RH.

The results showed that phages were not fixed on the paper through strong binding interactions like covalent link (Cademartiri et al. 2010) but were merely adsorbed onto the surface. At a relative humidity of 96%, condensation of water on the paper surface was observed, which created a water layer that facilitated the resuspension of phages within it. During handling, this condensed water led to a wash-off effect, leaching the phages away from the surface. The amount of adsorbed phages under this RH condition was quickly reduced and, consequently, its bioactivity too. To further understand the mechanisms involved, future studies should focus on analyzing the biopolymer composition and phage content of the leachate resulting from this wash-off process.

Storage at 75% relative humidity (RH) demonstrated a positive effect on the stability of bacteriophages. According to the work of Meyer et al. (Meyer et al. 2017), the desorption of phages from their support enables better antibacterial activity, with dispersed states showing superior antibacterial activity outcomes (Fister et al. 2016, Drab et al. 2018). However, the optimal humidity of 75% may seem distant from industrial realities. Nevertheless, this study has demonstrated that a fine and lightweight coating based on CMC and CS can preserve the antibacterial activity of the phage. Electrostatic interactions between the bacteriophages and the polymers could be the subject of further research. Additionally, to improve the number of stabilized bacteriophages, the drying process should be optimized. Infrared or airflow drying could be considered in order to rapidly dehydrate sprayed bacteriophage solutions. During spray drying, additives such as

lactose and leucine are commonly used to protect bacteriophages (Leung et al. 2017). The incorporation of these molecules could be a potential strategy to explore for maintaining phage activity.

4.7. Conclusion

In this study, phage immobilization on cationic starch and carboxymethyl cellulose coated paper was examined. Modifying the paper surface enabled the creation of an optimized support that improved the long-term stability of bacteriophages, thereby preserving their efficiency. Phage activity was successfully maintained for 14 days at 4°C and 75% RH with a Kruger based paper coated with a solution composed by 2%CS, 2% CMC, and 5% GLY. The hydration capacity of this formula creates a favorable environment for phage conservation on solid support. Further work is needed to increase phage drying speed while not exceeding the critical threshold for complete denaturation of the phage structural proteins. Drying phages appears to be a crucial factor in their stability in the dehydrated state. The optimized combination of drying and coating surface could lead to packaging materials with antibacterial properties that meets the production constraints of the paper industry.

4.8. Acknowledgements

We would like to thank NSERC, CRIBIQ, the Foundation of UQTR, and Kruger Inc. for their financial support. We are grateful to Denise Tremblay for discussion.

The research was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant RDCPJ 536470-18, grant number RDA 536574-18), the

Consortium de recherche et innovation en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ, grant number 2018-074-PR-C43), the Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), and Kruger Inc. S.M. holds the Canada Research Chair in Bacteriophages.

4.9 References

- Ahmadi, H., D. Radford, A. M. Kropinski, L.-T. Lim and S. Balamurugan (2017). "Thermal-stability and reconstitution ability of *Listeria* phages P100 and A511." *Frontiers in Microbiology* 8: 2375-2375.
- Alves, D., M. A. Cerqueira, L. M. Pastrana and S. Sillankorva (2020). "Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*." *Food Research International* 128: 108791.
- Alves, D., A. Marques, C. Milho, M. J. Costa, L. M. Pastrana, M. A. Cerqueira and S. M. Sillankorva (2019). "Bacteriophage ϕ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage." *International Journal of Food Microbiology* 291: 121-127.
- Anany, H., L. Y. Brovko, T. El-Arabi and M. W. Griffiths (2015). 4 - Bacteriophages as antimicrobials in food products: History, biology and application. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. T. M. Taylor. Oxford, Woodhead Publishing: 69-87.
- Anany, H., W. Chen, R. Pelton and M. W. Griffiths (2011). "Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes." *Applied and Environmental Microbiology* 77(18): 6379-6387.
- Azhdari, S. and M. Moradi (2022). "Application of antimicrobial coating based on carboxymethyl cellulose and natamycin in active packaging of cheese." *Int J Biol Macromol* 209(Pt B): 2042-2049.
- Bajpai, P. (2018). Coating Processes. *Biermann's Handbook of Pulp and Paper - Raw Material and Pulp Making, Volume 1 and 2 (3rd Edition)*, Elsevier.
- Balcão, V. M., A. R. Moreira, C. G. Moutinho, M. V. Chaud, M. Tubino and M. M. D. C. Vila (2013). "Structural and functional stabilization of phage particles in carbohydrate matrices for bacterial biosensing." *Enzyme and Microbial Technology* 53(1): 55-69.

Basiak, E., A. Lenart and F. Debeaufort (2018). "How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films." *Polymers* 10(4).

Biswal, D. R. and R. P. Singh (2004). "Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer." *Carbohydrate Polymers* 57(4): 379-387.

Bone, S., A. Alum, J. Markovski, K. Hristovski, E. Bar-Zeev, Y. Kaufman, M. Abbaszadegan and F. Perreault (2018). "Physisorption and chemisorption of T4 bacteriophages on amino functionalized silica particles." *Journal of Colloid and Interface Science* 532: 68-76.

Cademartiri, R., H. Anany, I. Gross, R. Bhayani, M. Griffiths and M. A. Brook (2010). "Immobilization of bacteriophages on modified silica particles." *Biomaterials* 31(7): 1904-1910.

CFR (2016). 172.785 *Listeria*-specific bacteriophage preparation. N. a. a. r. administration.

Chaussy, D. and D. Guérin (2016). *Calendering of Papers and Boards: Processes and Basic Mechanisms. Lignocellulosic Fibers and Wood Handbook*: 493-529.

Choudhury, A. and I. Textile (2014). *Principles of colour appearance and measurement. Volume 1, Object appearance, colour perception and instrumental measurement.* Cambridge, U.K., Woodhead Pub.

CIE (2018). CIE 015:2018, Colorimetry.

Cui, H., L. Yuan and L. Lin (2017). "Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef." *Carbohydrate Polymers* 177: 156-164.

Danilovas, P. P., R. Rutkaite and A. Zemaitaitis (2014). "Thermal degradation and stability of cationic starches and their complexes with iodine." *Carbohydrate Polymers* 112: 721-728.

de Britto, D. and O. I. B. G. Assis (2009). "Thermal degradation of carboxymethylcellulose in different salty forms." *Thermochimica Acta* 494(1): 115-122.

Drab, M. (2018). "Phage aggregation–dispersion by Ions: striving beyond antibacterial therapy." *Trends in Biotechnology* 36(9): 875-881.

Esther, E. F. and F. Eleonore (2016) "Cytotoxicity of Nanoparticles Contained in Food on Intestinal Cells and the Gut Microbiota." *International Journal of Molecular Sciences* 17, 509 DOI: 10.3390/ijms17040509.

EU (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. AFSCA.

Fister, S., C. Robben, A. K. Witte, D. Schoder, M. Wagner and P. Rossmanith (2016). "Influence of environmental factors on phage-bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100." *Frontiers in Microbiology* 7: 1152-1152.

Greenspan, L. (1977). "Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions." *Journal of Research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and Chemistry* 81A: 89 - 96.

Harada, L. K., E. C. Silva, W. F. Campos, F. S. Del Fiol, M. Vila, K. Dąbrowska, V. N. Krylov and V. M. Balcão (2018). "Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art." *Microbiological Research* 212-213: 38-58.

Hazrol, M. D., S. M. Sapuan, E. S. Zainudin, M. Y. M. Zuhri and N. I. Abdul Wahab (2021). "Corn Starch (*Zea mays*) biopolymer plastic reaction in combination with sorbitol and glycerol." *Polymers* 13(2).

Heinze, T. and K. Pfeiffer (1999). "Studies on the synthesis and characterization of carboxymethylcellulose." *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 266(1): 37-45.

Hosseinidou, Z., A. L. J. Olsson and N. Tufenkji (2014). "Going viral: Designing bioactive surfaces with bacteriophage." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 124: 2-16.

Janczuk, M., Ł. Richter, G. Hoser, J. Kawiak, M. Łoś, J. Niedziółka-Jönsson, J. Paczesny and R. Hołyst (2017). "Bacteriophage-Based Bioconjugates as a Flow Cytometry Probe for Fast Bacteria Detection." *Bioconjug Chem* 28(2): 419-425.

Janik, W., M. Nowotarski, D. Y. Shyntum, A. Banaś, K. Krukiewicz, S. Kudła and G. Dudek (2022). "Antibacterial and biodegradable polysaccharide-based films for food packaging applications: comparative study." *Materials* 15(9): 3236.

Kiemle, Lafond, Silverstein and Webster (2016). *Identification spectrométrique de composés organiques*. Bruxelles, De Boeck Supérieur.

Kim, S. Y., Y. B. Seo and J. S. Han (2022). "Effect of calendering on the properties of paper containing flexible calcium carbonate with a cellulose nanofibril core." *ACS Omega* 7(39): 35305-35315.

Lai, T. T., T. T. H. Pham, M. van Lingen, G. Desaulniers, G. Njamen, B. Tolnai, T. Jabrane, S. Moineau and S. Barnabé (2022). "Development of antimicrobial paper coatings containing bacteriophages and silver nanoparticles for control of foodborne pathogens." *Viruses* 14(11).

Leite, L. S. F., S. Bilatto, R. T. Paschoalin, A. C. Soares, F. K. V. Moreira, O. N. Oliveira, L. H. C. Mattoso and J. Bras (2020). "Eco-friendly gelatin films with rosin-grafted cellulose nanocrystals for antimicrobial packaging." *International Journal of Biological Macromolecules* 165: 2974-2983.

Leung, S. S. Y., T. Parumasivam, F. G. Gao, E. A. Carter, N. B. Carrigy, R. Vehring, W. H. Finlay, S. Morales, W. J. Britton, E. Kutter and H.-K. Chan (2017). "Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders." *International Journal of Pharmaceutics* 521(1-2): 141-149.

Li, X., Z. Ren, R. Wang, L. Liu, J. Zhang, F. Ma, M. Z. H. Khan, D. Zhao and X. Liu (2021). "Characterization and antibacterial activity of edible films based on carboxymethyl cellulose, *Dioscorea opposita* mucilage, glycerol and ZnO nanoparticles." *Food Chemistry* 349: 129208.

Lone, A., H. Anany, M. Hakeem, L. Aguis, A.-C. Avdjian, M. Bouget, A. Atashi, L. Brovko, D. Rochefort and M. W. Griffiths (2016). "Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods." *International Journal of Food Microbiology* 217: 49-58.

Mehdi, H. (2022). Encapsulation des bactériophages dans des biopolymères pour améliorer leur stabilité dans des emballages alimentaires bioactifs. Master Mémoire Université du Québec à Trois-Rivières.

Meyer, A., M. Greene, C. Kimmelshue and R. Cademartiri (2017). "Stabilization of T4 bacteriophage at acidic and basic pH by adsorption on paper." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 160: 169-176.

Monica, E., G. Göran and H. Gunnar (2009). *Paper Chemistry and Technology*. Berlin, De Gruyter.

Nogueira, F., N. Karumidze, I. Kusradze, M. Goderdzishvili, P. Teixeira and I. C. Gouveia (2017). "Immobilization of bacteriophage in wound-dressing nanostructure." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 13(8): 2475-2484.

Pasini Cabello, S. D., E. A. Takara, J. Marchese and N. A. Ochoa (2015). "Influence of plasticizers in pectin films: Microstructural changes." *Materials Chemistry and Physics* 162: 491-497.

Pearson, H. A., G. S. Sahukhal, M. O. Elasri and M. W. Urban (2013). "Phage-bacterium war on polymeric surfaces: can surface-anchored bacteriophages eliminate microbial infections?" *Biomacromolecules* 14(5): 1257-1261.

Peters, R. J. B., A. G. Oomen, G. van Bommel, L. van Vliet, A. K. Undas, S. Munniks, R. L. A. W. Bley, P. C. Tromp, W. Brand and M. van der Lee (2020). "Silicon dioxide and titanium dioxide particles found in human tissues." *Nanotoxicology* 14(3): 420-432.

Prakash Maran, J., V. Sivakumar, K. Thirugnanasambandham and R. Sridhar (2013). "Response surface modeling and analysis of barrier and optical properties of maize starch edible films." *International Journal of Biological Macromolecules* 60: 412-421.

Rajnovic, D., X. Muñoz-Berbel and J. Mas (2019). "Fast phage detection and quantification: An optical density-based approach." *PLoS One* 14(5): e0216292.

Rosner, D. and J. Clark (2021). "Formulations for bacteriophage therapy and the potential uses of immobilization." *Pharmaceuticals* 14(4): 359.

Ruan, C., Y. Zhang, J. Wang, Y. Sun, X. Gao, G. Xiong and J. Liang (2019). "Preparation and antioxidant activity of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible films with epigallocatechin gallate." *International Journal of Biological Macromolecules* 134: 1038-1044.

Seligra, P. G., C. Medina Jaramillo, L. Famá and S. Goyanes (2016). "Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch-glycerol with citric acid as crosslinking agent." *Carbohydrate Polymers* 138: 66-74.

Şen, F., İ. Uzunsoy, E. Baştürk and M. V. Kahraman (2017). "Antimicrobial agent-free hybrid cationic starch/sodium alginate polyelectrolyte films for food packaging materials." *Carbohydrate Polymers* 170: 264-270.

Serwer, P. and M. E. Pichler (1978). "Electrophoresis of bacteriophage T7 and T7 capsids in agarose gels." *Journal of Virology* 28(3): 917-928.

Singh, A., N. Glass, M. Tolba, L. Brovko, M. Griffiths and S. Evoy (2009). "Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens." *Biosensors and Bioelectronics* 24(12): 3645-3651.

Spence, C. and C. Velasco (2018). "On the multiple effects of packaging colour on consumer behaviour and product experience in the 'food and beverage' and 'home and personal care' categories." *Food Quality and Preference* 68: 226-237.

Su, J.-F., Z. Huang, X.-Y. Yuan, X.-Y. Wang and M. Li (2010). "Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions." *Carbohydrate Polymers* 79(1): 145-153.

TAPPI (2007). T502 - Equilibrium relative humidity of paper and paperboard.

TAPPI (2022). Roughness of paper and paperboard (Print-surf method), Test Method T 555 om-22, TAPPI.

TAPPI (2023). Grammage of paper and paperboard (weight per unit area), Test Method TAPPI/ANSI T 410 om-23. T. A. o. t. P. a. P. Industry.

Tavares, K. M., A. d. Campos, B. R. Luchesi, A. A. Resende, J. E. d. Oliveira and J. M. Marconcini (2020). "Effect of carboxymethyl cellulose concentration on mechanical and water vapor barrier properties of corn starch films." *Carbohydrate Polymers* 246: 116521.

Tolba, M., O. Minikh, L. Y. Brovko, S. Evoy and M. W. Griffiths (2010). "Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications." *Applied and environmental microbiology* 76(2): 528-535.

Tourette, E. (2007). Paper / roll contact in calenders: a mechanical and physico-chemical study, École Nationale Supérieure des Mines de Paris.

Tytgat, H. L., G. Schoofs, M. Driesen, P. Proost, E. J. Van Damme, J. Vanderleyden and S. Lebeer (2015). "Endogenous biotin-binding proteins: an overlooked factor causing false positives in streptavidin-based protein detection." *Microb Biotechnol* 8(1): 164-168.

Van Voorthuizen, E. M., N. J. Ashbolt and A. I. Schäfer (2001). "Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes." *Journal of Membrane Science* 194(1): 69-79.

Vonasek, E., P. Lu, Y.-L. Hsieh and N. Nitin (2017). "Bacteriophages immobilized on electrospun cellulose microfibers by non-specific adsorption, protein–ligand binding, and electrostatic interactions." *Cellulose* 24(10): 4581-4589.

Wilpiszewska, K., A. K. Antosik, B. Schmidt, J. Janik and J. Rokicka (2020). "Hydrophilic Films Based on Carboxymethylated Derivatives of Starch and Cellulose." *Polymers (Basel)* 12(11).

Yang, L. and A. T. Paulson (2000). "Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films." *Food Research International* 33(7): 563-570.

Chapitre 5 : Article scientifique 2 :

5.1. Avant-propos

Le titre du second article scientifique est ‘‘Infrared drying bacteriophages for a bioactive paper’’ Il a été soumis à la revue scientifique ‘‘Food Microbiologie’’ en décembre 2024.

Les auteurs et leurs coordonnées correspondantes sont, dans l’ordre :

Charles Fort, Étudiant au Doctorat en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques
Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : charles.fort@uqtr.ca

Younès Bareha, Ph.D

Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : younes.bareha@uqtr.ca

Thi Thanh Ha Pham, Ph.D

Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : thi.thanh.ha.pham@uqtr.ca

Thanh Tung Lai, Ph.D

Institut d’Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : thanhtung.lai@uqtr.ca

François Brouillette, Ph.D,

Co-directeur de thèse. Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse, Université du Québec à Trois-Rivières Département de biochimie, chimie, physique et science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Courriel : francois.brouillette@uqtr.ca

Guy Njamen,

Kruger Inc., Montréal, QC H3S 1G5, Canada

Courriel : guy.njamen@kruger.com

Balázs Tolnai, Ph.D

Kruger Inc., Montréal, QC H3S 1G5, Canada

Courriel : balazs.tolnai@kruger.com

Sylvain Moineau, Ph.D

Département de biochimie, de microbiologie et de bio-Informatique

Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

Courriel : sylvain.moineau@bcm.ulaval.ca

Simon Barnabé, Ph.D

Directeur de Thèse. Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse, Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Courriel : simon.barnabe@uqtr.ca

Contribution des auteurs : Charles Fort est l'auteur principal de cet article. Il a effectué toutes les expériences scientifiques et les développements associés. M. Bareha à participé à la révision du manuscrit. Mme. Thi Thanh Ha et M. Thanh Tung et M. Moineau ont contribué aux corrections du manuscrit. M. Njamen et M. Tolnai ont pris part dans le financement du projet. M. Barnabé est le directeur de recherche et M. Brouillette est le co-directeur de cette recherche. Le directeur et le co-directeur ont participé à la révision et à la correction du manuscrit.

5.2. Résumé

La grande spécificité des bactériophages (phages) facilite le développement de méthodes ciblant des pathogènes d'origine alimentaire. Cependant, leur faible stabilité dans les matériaux d'emballage rend leur intégration dans les emballages alimentaires difficile. Dans cette étude, nous avons évalué l'effet du séchage infrarouge (IR) de différentes formulations de bactériophages P100 appliquées sur la surface de papier couché. Le revêtement de biopolymère est composé de 2 % de carboxyméthylcellulose, 2 % d'amidon cationique et 5 % de glycérine, en analysant leur infectiosité après traitement. Du lactose et de la leucine ont été ajoutés à la solution de phages comme excipients pour protéger les phages pendant le processus de séchage. Une solution de 12 g/L de lactose et de 8 g/L de leucine a permis de protéger les phages des conditions de séchage jusqu'à 80°C. Dans ces conditions, l'infectiosité des phages dans les papiers bioactifs a été préservée à 4°C et 33 % d'humidité relative pendant jusqu'à 14 jours.

5.3. Abstract

The high specificity of bacteriophages (phages) facilitates the development of methods against targeted foodborne pathogens. However, their low stability in packaging materials makes it challenging to integrate them into food packaging. In this study, we evaluated the effect of infrared (IR) drying on different P100 bacteriophage formulations applied to on the coated paper surface with 2% with 2% of carboxymethylcellulose, 2% of cationic starch, and 5% of glycerol by analyzing their infectivity after treatment. Lactose and leucine were added to the phage solution as excipients to protect the phages

during the drying process. A solution of 12 g/L of lactose and 8 g/L of leucine protected phages from drying conditions up to 80°C. Under these conditions, phage infectivity in bioactive papers was preserved at 4°C and 33% HR for up to 14 days.

5.4. Introduction

The food industry adds ingredients to processed foods or other foods produced on an industrial scale for technical purposes, including improving safety, increasing shelf life, or modifying the sensory properties of the foods. Food preservatives are used to control microorganisms. At low doses antimicrobials often exhibit bacteriostatic properties. This category includes acids (sorbic, benzoic, potassium sorbate, etc.), anhydrides (sulfite, carbonic, etc.), antioxidants (BHA, BHT, etc.), and other preservatives (nitrites, nitrates, diphenyls, and their derivatives) (FAO 1995). However, the debate over the safety of some food preservatives is becoming increasingly intense. The Acceptable Daily Intake (ADI) for several of them has been revised downwards (FAO/OMS 2023). A change of strategy in the choice of food preservatives is an avenue worth exploring as consumers pay more and more attention to what they eat. The trend toward more healthier foods is now widespread and is not slowing any signs of slowing down.

Bacteriophages (or phages) are presented as promising eco-friendly and safe alternatives to conventional food preservatives (Endersen et al. 2020). Phages are specific viruses that killed targeted bacterial cells (Krupovic et al. 2016). Most of them are formed by a capsid containing the genetic material and a tail enabling recognition of the host and injection of the viral DNA into the bacterial cytoplasm. Once in the cytoplasm, the genetic material takes over the host machinery and the infected bacterial cells become factories to

produce new virions. At the end of the viral replication cycle, the bacterial cell bursts and releases numerous new virions (Hurst et al. 2021). Thus, contrary to traditional food preservatives, phages have the ability to multiply in the food matrices. They have great potential for the specific targeting of pathogenic bacteria in the food industry (Goodridge et al. 2018).

Like traditional preservatives, the use of phages is subject to national regulations worldwide. In the United States, the Food and Drug Administration (FDA) has authorized the use of phages as specified in 21 CFR §172.785 (CFR 2016). In Europe, the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (AFSCA) has approved the use of phages in food production, adhering to Regulation No. 853/2004 (European Parliament and of the Council of 29 April 2004). Interestingly, phages can also be incorporated into packaging materials, including paper, to facilitate their delivery and application to a wide range of foods (Pelton et al. 2009). However, stabilizing phages on packaging materials is necessary to maintain their integrity during the manufacturing process.

One approach to stabilize phages on packaging material is to modify the paper surface. Physical immobilization techniques, which involve applying a functional layer, are less expensive and more suitable for packaging development (Lone et al. 2016, Rosner et al. 2021). The interaction between phages and biopolymers on the surface through Van der Waals forces, hydrophobic interactions, and dipole-dipole moments (Singh et al. 2009). Several studies have reported the use of positively charged surface polymers to properly orient phages on the packaging materials to facilitate target recognition and subsequent viral replication (Anany et al. 2011, Vonasek et al. 2017). The quality of the

bacteriophage's binding depends on the physicochemical conditions of the medium. Changes in pH, temperature, and ionic strength are likely to disrupt the immobilization interactions (Van Voorthuizen et al. 2001).

Using biopolymers as functional coatings could protect phages from the stress conditions encountered during the production and handling of the materials. The application of biopolymer-based coatings to the surface of paper to improve the infectivity of phages has been the subject of previous studies (Amarillas et al. 2018, Alves, Cerqueira et al. 2020). In the study conducted by Lone et al. (Lone et al. 2016), the immobilized *Listeria* phage cocktail resulted in approximately a 1-log CFU/g reduction in the *Listeria* count by the end of the storage period. However, some studies on the development of antibacterial packaging incorporating phages encounter a critical issue related to drying, this step lasts several hours to few days (Tomat et al. 2019, Shojaeiarani et al. 2020, Weng et al. 2021).

Humidity plays a major role in maintaining phage activity (Lian et al. 2020). The protein structure of phages makes them sensitive to high temperature and dehydration. Nevertheless, phages can be dried using atomization and freeze-drying methods (Vandenheuvel et al. 2013, Leung et al. 2017, Sharma et al. 2017). The various drying studies used protective solutions containing amino acids like leucine and trileucine and polysaccharides like lactose, trehalose, mannitol, and sucrose. Polysaccharides are used to reduce water activity, and the amino acids reduce water absorption on the surface of powders (Carrigy et al. 2020, Chang et al. 2020, Malik et al. 2021). However, the prolonged time required to dry phages using freeze-dried techniques makes them unsuitable for use in the paper industry. Spray drying is faster, but phages must still be

added to their paper support. In an industrial context of manufacturing packaging materials, the accumulation of steps complicates production and product handling operations. Additionally, the buying and maintaining of new equipment increase costs.

While the above drying techniques are not readily applicable to the paper industry, the excipients used to keep phages stable during the dehydration process may be suitable. In the paper industry, infrared radiation is used to dry coatings. The intensity and temperature are adjustable parameters. It is possible to select non-destructive temperatures for phages. According to a previous study on the thermal stability of *Listeria* phage P100, the temperature limit would be between 55 and 65°C (Ahmadi et al. 2017). Thus, appropriate infrared drying could be used to dehydrate the phages applied directly to the packaging materials.

The aim of this study was to determine how a solution of bacteriophages applied to packaging retains its stability and activity after infrared drying. To this end, various solutions of phages containing lactose and leucine were tested on a coated paper. The surface temperature and mass changes of paper samples coated with a commercial preparation of *Listeria* phages P100 (ListexP100) were monitored during infrared drying to assess phage stability. of bacteriophages. Finally, anti-*Listeria* activity of the coated paper was assessed at different storage humidity levels for up to 14 days.

5.5. Materials and Methods

5.5.1. Overview of the methodology

This study hypothesized that phage infectivity could be preserved through the infrared drying process and by incorporating lactose and leucine as excipients into the phage solutions. The methodology was divided into four steps, with an overview provided in Figure 1.

- The initial step involves the preparation of coated paper and solutions of phages with excipients. The coating formulation, consisting of 2% carboxymethylcellulose, 2% cationic starch, and 5% glycerol, as described in a previous study, enhances the stability of phages on paper substrates. The coated paper samples were conditioned at room temperature and at humidity levels of 33%, 60%, and 90%.
- Secondly, four phage solutions were formulated as follows: SP0 contains no excipients, while SP1, SP2, and SP3 contain varying amounts of lactose and leucine, each with a final solid content of 20 mg/mL. Phage titers were determined Plaque-Forming Units per milliliter (PFU/mL) for each per solution as described previously.
- Thirdly, the protective solutions were applied to the coated papers using a manual spreading technique. The samples were then exposed to infrared radiation, during which surface temperature and mass changes were closely monitored.

- Finally, after drying, the bioactive paper samples were stored under varying humidity level. The antibacterial action was tested, and the number of active phages per square centimeter was calculated.

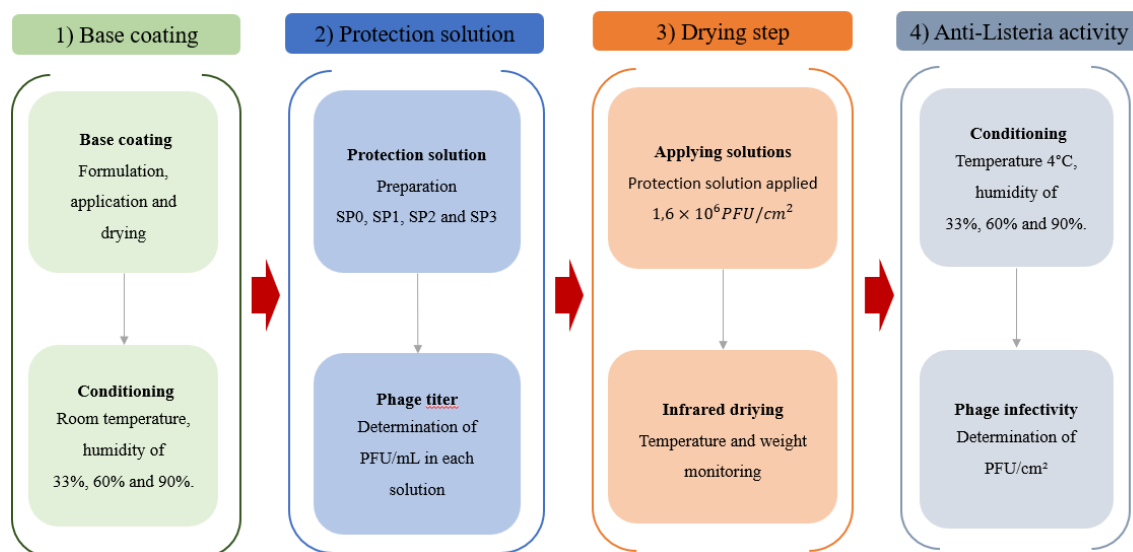


Figure 5-1. Schematic overview of the methodology used in this study

5.5.2. Bacterial and chemical materials

Listeria monocytogens serotype 4b strain (ATCC 19115) was used as the host. A fresh bacterial culture was prepared by inoculation 100 μL of a stock culture in 0.9 mL of tryptic soy broth (TSB; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) incubated 18h at 37°C in a shaking incubator (150 rpm) to obtain a concentration approximately 10^9 Colony-Forming Units per milliliter (CFU/mL). The cell suspension was centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min at 4°C (Thermo Scientific Sorvall Legend XF) and washed with NaCl 0.85% (w/v) before resuspending cells in NaCl 0.85% (w/v) to obtain a concentration of

10^6 CFU/mL. A commercial phage product Listex™ P100 (Microcos, Wageningen, Netherlands) was purchased from Think Ingredients (Burlington, ON, Canada), containing phage P100 at a titer of approximately 10^{11} PFU/mL.

The biopolymers and plasticizers used for coating base paper were as follows: carboxymethyl cellulose (CMC) C4888 (Millipore Sigma, Mississauga, Canada), cationic starch (CS) National™ 0381 (Ingredion, Mississauga, Canada), and glycerol G2025 (Millipore Sigma, Mississauga, Canada). The chemical products used in the phage drying process were L-leucine 4330, obtained from Millipore-Sigma (Mississauga, Canada), and α -D-lactose monohydrate from Fisher Scientific (Oakville, Canada). The different humidity levels were achieved using the saturated salt method with the following chemicals (Greenspan et al. 1977), purchased from Millipore Sigma (Mississauga, Canada): potassium nitrate (P8291), sodium chloride (BP358), magnesium nitrate hexahydrate (237175), magnesium chloride (M0250), and sodium iodide. The base paper, with a grammage of 50 gsm, was provided by Kruger Inc. (50 g/m², US legal size 21.59 × 35.56 cm).

5.5.3. Base coating

Coating solution was prepared by dissolving 2% (m/m) of carboxymethyl cellulose, 2% of cationic starch, and 5% of glycerol in distilled water and stirred at 500 rpm and 90°C during 3h. Coating solution was applied with a lab coater on Kruger base paper (50g/m²). Then, the coated paper was then dried for 30 seconds at 105°C in a convective oven and subsequently calendared at 90°C under a pressure of 1000 psi using

a Beloit Wheeler lab-scale device. The coated paper was sterilized 30min by UV in laminar flow hood (Leite et al. 2020), then conditioned at room temperature and at humidity levels of 33%, 60%, and 90%. Humidity was maintained using the saturated salt technique (Greenspan et al. 1977).

Phage solutions were prepared from the commercial product Listex™ P100 of 1011PFU/mL. According to the work of Chang et al. on the formulation of spraying solutions (Chang et al. 2020), three different solutions were selected (SP1, SP2, and SP3), with a total solid concentration of 20 mg/mL (Table 5-1). Control SP0 was sodium chloride solution at 0.85% (w/w). The solutions are prepared in distilled, filtered at 0.22 μm , and then the phage suspension was added to the mixture. The phage titers were confirmed by using DLA method (Rajnovic et al. 2019). The titers of phage formulations were 5×10^8 PFU/mL.

Table 5-1. Formulation of bacteriophage solution

Formulation	Content (mg/mL)	
	Lactose	Leucine
SP0	0	0
SP1	20	0
SP2	16	4
SP3	12	8

It was assumed that, due to the low mass of lactose and leucine, only the mass of water was considered in the following calculations. A mass of $0.165 \text{ g} \pm 0.005 \text{ cg}$ of phage solution was applied to the 50 cm^2 of coating. The mass of the solution was chosen to achieve an efficient amount of phage on the surface. The formulations were applied to the coated paper, and the phage solution was spread evenly over each sheet. The titer of phage per square centimeter were 10^6 PFU.

5.5.4. Bacteriophage drying

The samples were dried using infrared with a 250 W (IR) lamp system. Samples were placed on a scale plate and exposed to infrared radiation from a distance of 20 cm. The thermal profile of the sample surfaces was recorded using a FLIR T1030sc thermal imaging camera (Fig. 5-2). The temperature of the paper surface was captured at a rate of 30 frames per second using FLIR software. 5.13.18031.2002 (Wilsonville, OR, USA). Five points on the paper surface are used for recording the thermal profile.

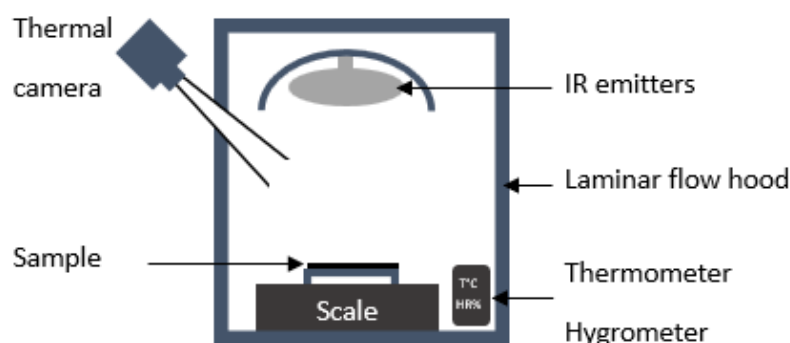


Figure 5-2. Customized Infra-red drying system.

Following preliminary drying experiments, the maximum drying time for this quantity was 120 seconds. Each sample was tested in triplicate. Sample mass was recorded every 10-second interval. After infrared drying, the samples were stored at different temperatures and humidity in preparation for the infectivity analyses. Each condition tested is summarized in Table 2.

Table 5-2. Conditions of temperature and humidity of bioactive papers.

Temperature (°C)	Conditions	
	4 ± 2°C	23 ± 2°C
Humidity (%RH)	90 ± 2%	90 ± 2%
	60 ± 2%	60 ± 2%
	33 ± 2%	32 ± 2%

The moisture content (MC) was calculated from the recorded masses using the following equation:

$$MC(\%) = \frac{((W_0 - W) - W_i)}{W_i}$$

Equation 5-1

With W_0 the initial weight of sample (g), W the amount of evaporated moisture (g) and W_i are the dry matter content of sample (g).

Moisture content represented the amount of water present per unit mass of the sample. Moisture content values were converted into a dimensionless moisture ratio (MR), which provided a simplified representation of sample drying. Moisture ratio can be calculated using the next equation (Midilli et al. 2001):

$$MR = \frac{(MC_t - MC_e)}{(MC_0 - MC_e)}$$

Equation 5-2

With MC_t moisture content at time t , MC_e the equilibrium moisture content and MC_0 the initial moisture content.

Then the drying rate (DR), expressed in grams per square meter per second (g/m²/s), of the phage solution during drying was calculated using the equation:

$$DR = \frac{(MC_0 - MC_t)}{\Delta t} \times \frac{1}{L_s}$$

Equation 5-3

With L_s covered surface by the phage solution on the coated paper, and t the time of experiment in seconds.

5.5.4. Bacteriophage desorption and enumeration

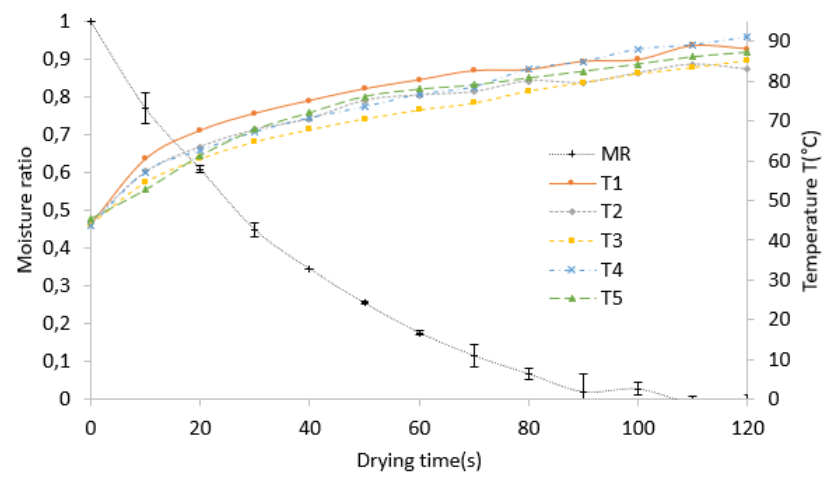
After the drying step and the conditioning at different humidity levels, the samples were tested for bioactivity. Phage titers loaded onto coated paper were determined using the DLA technique (Rajnovic et al. 2019, Lai et al. 2022). Immobilized phages were released by submerging 6 mm diameter circle paper samples in 3 mL of PBS buffer, which were then agitated at 120 rpm at room temperature. After 1h of agitation, a sample were collected for the DLA method. A culture of *L. monocytogenes* was mixed into a soft TSA medium (0.75% agar) and poured on top of a solid TSA medium (1.5% agar) in a 90-mm Petri dishes. The final concentration of bacteria was 5×10^5 CFU/cm². The phage titer was expressed as plaque forming units per cm² (PFU/cm²) of paper. Based on this methodology, release kinetics and stability of phages on coatings were determined. The antimicrobial activity and lysis area were also determined by placing the 6-mm paper circle samples on the DLA plates inoculated with *L. monocytogenes* and incubated at 30°C for 72h. Experiments were performed in triplicate.

5.6. Results and discussion

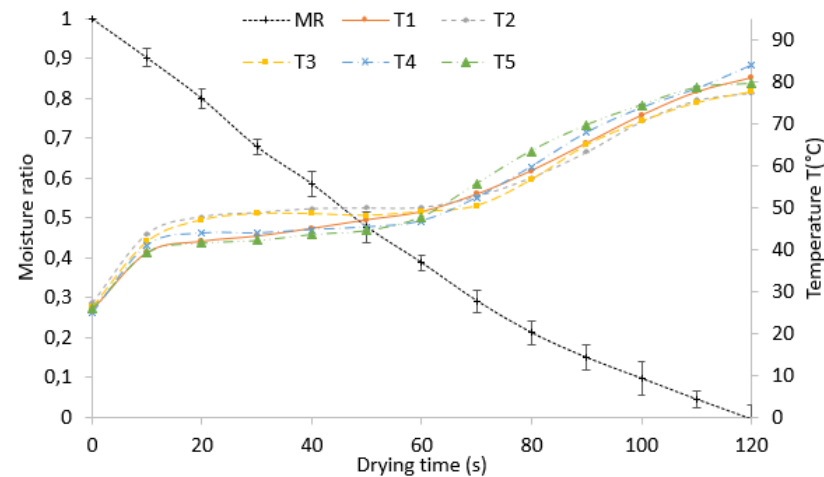
5.6.1. *Drying step*

First, we examined the evolution of surface temperature in samples at various time points during the infrared (IR) drying of phage solutions. Figure 3 illustrates the changes in moisture ratio over time, as well as the temperature readings on the surface of the paper. Temperature readings on solution-free coated paper (Figure 3.a) showed a steady increase over time. The temperature curve for samples with phages solution can be categorized into three distinct phases (Figure 5-3.b, c, d, and e). From 0 to 10 seconds, the temperature increased rapidly, followed by a slower increase until 70 seconds of drying. Beyond this point, the temperature increased again, more rapidly than during the previous phase. While the temperature varied in its rate of increase, the moisture ratio consistently decreased throughout the process. The first heating phase was attributed to the infrared equipment, specifically the thermal capacity of the IR bulb. The second phase corresponded to the time required for the phage solution to dry completely on the paper surface. The third phase likely involved the drying of the solution that had penetrated in the coating mass. Following surface drying, the measured temperature rose as the drying progressed deeper into the material. Due to the highly hydrophilic nature of the polymeric coatings, the phage solution deposited on the surface was partially absorbed. However, the solution that penetrated in the coating dried in a manner similar to that of the surface solution. There was no difference in the drying rate between the bacteriophage solution samples.

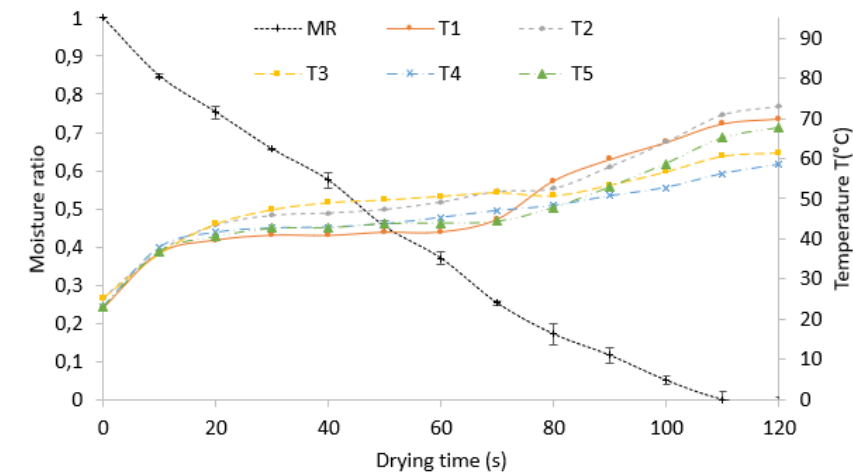
(a)



(b)



(c)



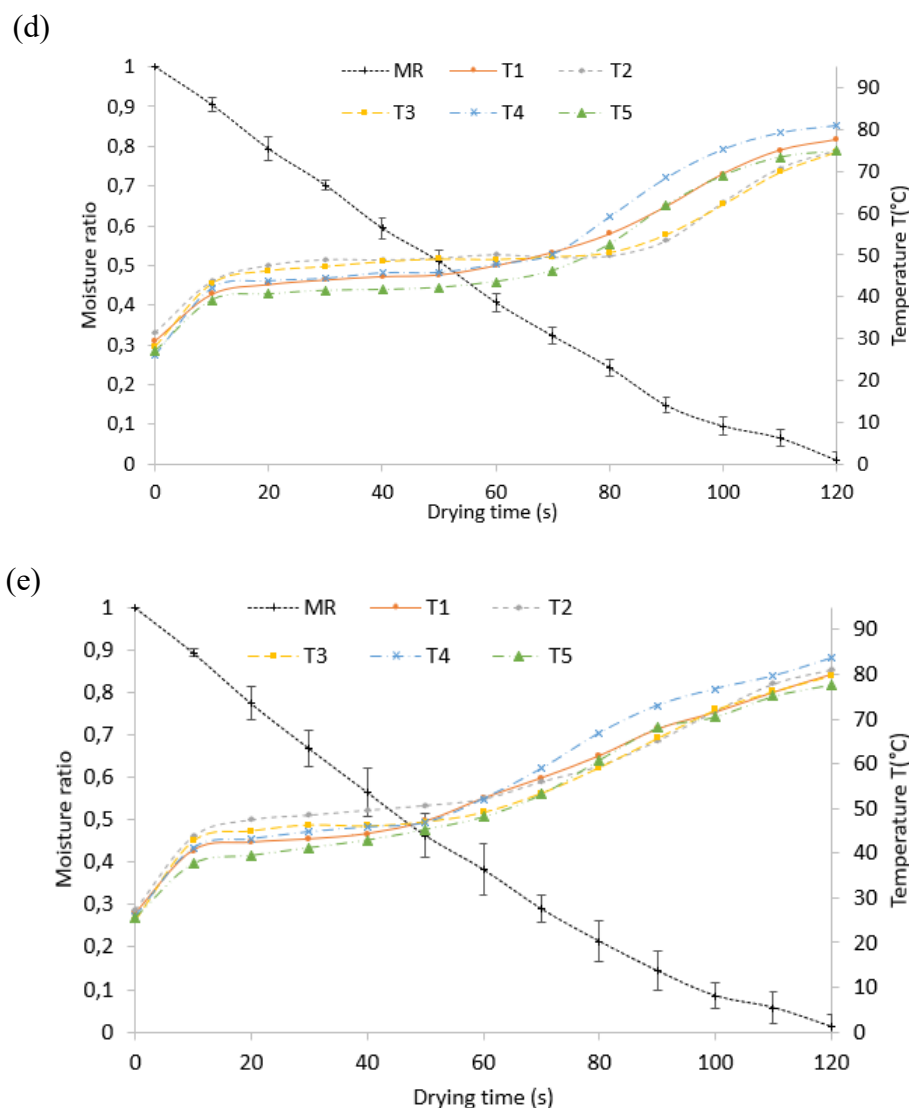


Figure 5-3. Evolution of surface temperature, mass of samples with and without of phage solution (a) coated paper without solution (KC), (b) coated paper with SP0, (c) SP1, (d) SP2, and (e) SP3.

To enable comparability and transposability, the drying rate (DR) was calculated and the evolution of the moisture ratio measured over time. The results are shown in Figure 5-4. This figure highlights the difference in drying speed between the commercial solution (SP0) and the conservation solutions (SP1, SP2, and SP3). SP0 drying speed was highest $1.90 \pm 0.18 \text{ g/m}^2/\text{s}$ at the start of the process and decreased to a minimum of 1.06

$\pm 0.03 \text{ g/m}^2/\text{s}$ at the end. In comparison, the average drying rate of the samples was $1.10 \pm 0.07 \text{ g/m}^2/\text{s}$ at the beginning and $0.91 \pm 0.001 \text{ g/m}^2/\text{s}$ at the end of the process. The drying rates for samples SP1, SP2, and SP3 was constant throughout the cycle.

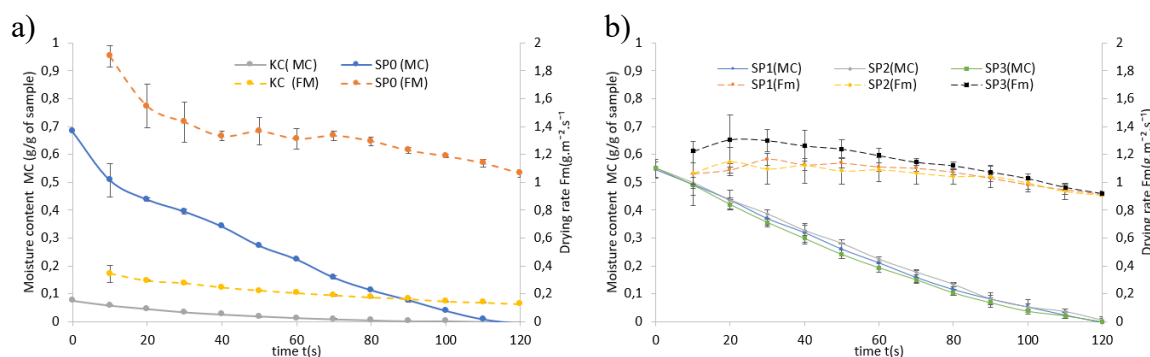


Figure 5-4. Evolution of moisture content and drying rate. (a) coated paper without solution (KC) and with solution SP0, (b) coated paper with solution SP1, SP2, and SP3.

A significant difference in drying speed was observed between the sample containing the phage solution without excipients (SP0) and those with excipients (SP1, SP2, and SP3). The presence of excipients appears to have reduced the drying speed. However, the various concentrations of lactose and leucine did seem to significantly impact the drying rate. Specifically, SP1 contained 20 g/L of lactose; SP2 contained 16 g/L of lactose and 4 g/L of leucine; and SP3 included 12 g/L of lactose and 8 g/L of leucine. Nonetheless, the low concentrations of lactose and leucine were sufficient to demonstrate a difference in drying speed compared to the commercial solution. All phage formulations were dried for 2 minutes at 50°C.

5.6.2. Antibacterial activity of bioactive paper

Infrared drying was found to be faster than the natural drying of phages on film surfaces, as previously reported (Alves et al. 2019, López de Dicastillo et al. 2021). These studies reported drying durations ranging from 24 to 48 hours under airflow conditions. However, when comparing the infrared evaporation efficiency presented in this study, it was observed to be less effective than that achieved through spray drying. The results of the paper's bioactivity are presented in Figure 5, which contains the temporal progression of PFUs per square centimeter for each phage solution and storage condition at 4°C and varying humidity levels. Each data point represents a triplicate.

After being stored for 24 hours, the phage-coated paper without a protective solution (SP0) exhibited no anti-listeria activity stored Under any of the tested humidity condition. On the other hand, solutions SP1, SP2, and SP3 maintained the antibacterial activity after drying. The phage titers were generally above 10^3 PFU/cm². The best results were obtained with paper samples stored at 33% and 60% humidity. After 7 days at 4°C, phages stored at 90% humidity were no longer active, with no visible lysis areas and no PFU detected. After 14 days of storage, the bioactive papers remained active only for those stored at 33% and 60% humidity, and only with SP1 (Lactose 20 mg/mL) and SP3 (12 mg/mL of lactose and 8 mg/mL of leucine) formulations.

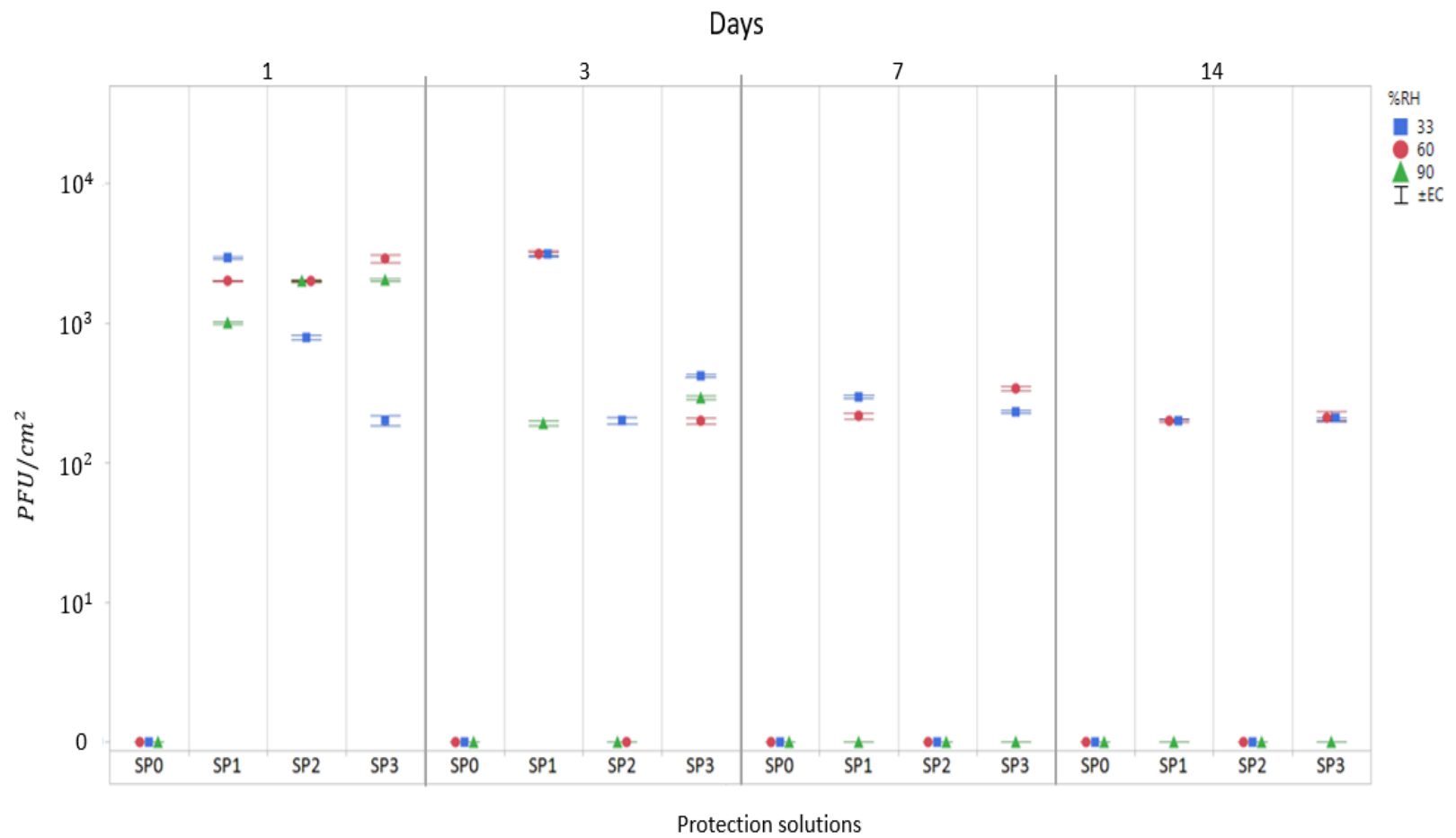


Figure 5-5. Antimicrobial activity of bioactive paper with different phages solutions at 4°C and 33%, 60% and 90% RH. Three storage conditions—33%, 60%, and 90%

humidity—are represented by a blue cross, a red circle, and a green diamond, respectively.

According to several studies, lactose reduces water activity, while leucine decreases water absorption on the powder (Lin et al. 2019, Zhang et al. 2020). The SP2 solution, which consisted of 16 mg/mL of lactose and 4mg/mL leucine, failed to maintain phage stability during infrared drying. It is possible that there is not enough lactose to reduce water activity, and also not enough leucine to compensate for the decrease in lactose in these formulations. In contrast, in the case of the SP3 formulation, the higher amount of leucine helps to compensate for the lower amount of lactose. Nevertheless, in a study conducted by Chang et al. (Chang et al. 2017), a concentration of 20 mg/mL of lactose and 8 mg/mL of leucine was used to stabilize the PEV1 phage (*Pseudomonas* phage), resulting in only a 0.4 log reduction after spray drying. There is a difference in drying conditions, between spray drying and infrared drying. The evaporation rate by infrared in this study is 0.01 mL/s. In comparison, the evaporation rate by spray drying in the study published by Leung et al. is 0.03 mL/s (Leung et al. 2018). In their experimental conditions, the air flow rate of 35 m³/h at 60°C helps limit the temperature rise while maintaining a high drying capacity. The evaporation rate is an important parameter in the preservation of bacteriophages. Excessively high temperatures increase stress conditions (Baldelli et al. 2023). The convection and radiation phenomena are different. Simply increasing the intensity of the infrared radiation does not seem to be the solution to investigate, as high temperatures could destroy the bacteriophages.

To limit the temperature during infrared drying, it would be valuable to investigate the method of applying the formulations to the coated paper. Additionally, exploring drying models for phages on the coating surface would be relevant.

5.7. Conclusion

Thermal environments in industrial settings are highly detrimental to phage activity. The integration and dehydration of phages on paper surfaces necessitate protective treatments. The application of polysaccharides and amino acids in phage powder formulations has been extensively documented by the pharmaceutical sector. However, these methods are incompatible with those utilized in paper mills. Here, we explored the use of infrared drying of phage. Phages were desiccated in 2 minutes at 50°C, in contrast to several hours at ambient temperature. The formulations of 20 mg/mL of lactose and another of 12 mg/mL of lactose and 8 mg/mL of leucine were shown to safeguard the phage during high-temperature drying. These findings indicate the potential for developing a drying technique for phages using infrared. Nonetheless, it is crucial to evaluate the influence of convective effects to enhance the drying rate without elevating the exposure temperature. The drying rate and thermal protection solution are critical elements for the stabilization of phages in a dry condition. In summary, bioactive packaging represents a crucial advancement in combating food-borne diseases. These strategies provide enhanced versatility, rendering them more convenient for utilization.

5.8. Acknowledgments

We would like to thank NSERC, CRIBIQ, the Foundation of UQTR, and Kruger Inc. for their financial support. We are grateful to Denise Tremblay for discussion.

The research was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant RDCPJ 536470-18, grant number RDA 536574-18), the Consortium de recherche et innovation en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ, grant number 2018-074-PR-C43), the Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), and Kruger Inc. S.M. holds the Canada Research Chair in Bacteriophages.

5.9. References

- Ahmadi, H., D. Radford, A. M. Kropinski, L.-T. Lim and S. Balamurugan (2017). "Thermal-stability and reconstitution ability of *Listeria* phages P100 and A511." *Frontiers in Microbiology* 8: 2375-2375.
- Alves, D., M. A. Cerqueira, L. M. Pastrana and S. Sillankorva (2020). "Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*." *Food Research International* 128: 108791.
- Alves, D., A. Marques, C. Milho, M. J. Costa, L. M. Pastrana, M. A. Cerqueira and S. M. Sillankorva (2019). "Bacteriophage ϕ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage." *International Journal of Food Microbiology* 291: 121-127.
- Amarillas, L., L. Lightbourn-Rojas, A. K. Angulo-Gaxiola, J. Basilio Heredia, A. González-Robles and J. León-Félix (2018). "The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against O157:H7 on the surface of tomatoes." *Journal of Food Safety* 38(6): e12571.
- Anany, H., W. Chen, R. Pelton and M. W. Griffiths (2011). "Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes." *Applied and Environmental Microbiology* 77(18): 6379-6387.

Baldelli, A. and M. Liang (2023). "Design of respirable sprayed microparticles of encapsulated bacteriophages." *Frontiers in Drug Delivery* 3.

Carrigy, N. B., L. Liang, H. Wang, S. Kariuki, T. E. Nagel, I. F. Connerton and R. Vehring (2020). "Trileucine and pullulan improve anti-Campylobacter bacteriophage stability in engineered spray-dried microparticles." *Annals of Biomedical Engineering* 48(4): 1169-1180.

CFR (2016). 172.785 *Listeria*-specific bacteriophage preparation. N. a. a. r. administration.

Chang, R. Y., J. Wong, A. Mathai, S. Morales, E. Kutter, W. Britton, J. Li and H. K. Chan (2017). "Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection." *Eur J Pharm Biopharm* 121: 1-13.

Chang, R. Y. K., P. C. L. Kwok, D. Khanal, S. Morales, E. Kutter, J. Li and H.-K. Chan (2020). "Inhalable bacteriophage powders: Glass transition temperature and bioactivity stabilization." *Bioengineering & Translational Medicine* 5(2): e10159-e10159.

Endersen, L. and A. Coffey (2020). "The use of bacteriophages for food safety." *Current Opinion in Food Science* 36: 1-8.

EU (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. AFSCA.

FAO (1995). *Codex alimentarius*. GFSA, codex STAN 192-1995, World Health Organization.

FAO/OMS (2023). *Codex alimentarius general standard of food additives*. GFSA Online Goodridge, L., K. Fong, S. Wang and P. Delaquis (2018). "Bacteriophage-based weapons for the war against foodborne pathogens." *Current Opinion in Food Science* 20: 69-75.

Greenspan, L. (1977). "Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions." *Journal of Research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and Chemistry* 81A: 89 - 96.

Hurst, C. J. (2021). *Defining the ecology of viruses* In *Studies in Viral Ecology* Wiley. 2nd edition.: 1-48.

Krupovic, M., B. E. Dutilh, E. M. Adriaenssens, J. Wittmann, F. K. Vogensen, M. B. Sullivan, J. Rumnieks, D. Prangishvili, R. Lavigne, A. M. Kropinski, J. Klumpp, A. Gillis, F. Enault, R. A. Edwards, S. Duffy, M. R. C. Clokie, J. Barylski, H.-W. Ackermann and J. H. Kuhn (2016). "Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee." *Archives of Virology* 161(4): 1095-1099.

Lai, T. T., T. T. H. Pham, M. van Lingen, G. Desaulniers, G. Njamen, B. Tolnai, T. Jabrane, S. Moineau and S. Barnabé (2022). "Development of antimicrobial paper

coatings containing bacteriophages and silver nanoparticles for control of foodborne pathogens." *Viruses* 14(11).

Leite, L. S. F., S. Bilatto, R. T. Paschoalin, A. C. Soares, F. K. V. Moreira, O. N. Oliveira, L. H. C. Mattoso and J. Bras (2020). "Eco-friendly gelatin films with rosin-grafted cellulose nanocrystals for antimicrobial packaging." *International Journal of Biological Macromolecules* 165: 2974-2983.

Leung, S. S. Y., T. Parumasivam, F. G. Gao, E. A. Carter, N. B. Carrigy, R. Vehring, W. H. Finlay, S. Morales, W. J. Britton, E. Kutter and H.-K. Chan (2017). "Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders." *International Journal of Pharmaceutics* 521(1-2): 141-149.

Leung, S. S. Y., T. Parumasivam, A. Nguyen, T. Gengenbach, E. A. Carter, N. B. Carrigy, H. Wang, R. Vehring, W. H. Finlay, S. Morales, W. J. Britton, E. Kutter and H.-K. Chan (2018). "Effect of storage temperature on the stability of spray dried bacteriophage powders." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 127: 213-222.

Liang, L., N. B. Carrigy, S. Kariuki, P. Muturi, R. Onsare, T. Nagel, R. Vehring, P. L. Connerton and I. F. Connerton (2020). "Development of a lyophilization process for *Campylobacter* bacteriophage storage and transport." *Microorganisms* 8(2): 282.

Lin, Y., R. Y. K. Chang, W. J. Britton, S. Morales, E. Kutter, J. Li and H.-K. Chan (2019). "Inhalable combination powder formulations of phage and ciprofloxacin for *P. aeruginosa* respiratory infections." *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 142: 543-552.

Lone, A., H. Anany, M. Hakeem, L. Aguis, A.-C. Avdjian, M. Bouget, A. Atashi, L. Brovko, D. Rochefort and M. W. Griffiths (2016). "Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods." *International Journal of Food Microbiology* 217: 49-58.

López de Dicastillo, C., L. Settler-Ramírez, R. Gavara, P. Hernández-Muñoz and G. López Carballo (2021). "Development of biodegradable films loaded with phages with antilisterial properties." *Polymers* 13(3): 327.

Malik, D. J. (2021). "Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy." *Current Issues Molecular Biology* 40: 303-316.

Midilli, A. (2001). "Determination of pistachio drying behaviour and conditions in a solar drying system." *International Journal of Energy Research* 25(8): 715-725.

Pelton, R. (2009). "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics." *Trends in Analytical Chemistry* 28(8): 925-942.

Rajnovic, D., X. Muñoz-Berbel and J. Mas (2019). "Fast phage detection and quantification: An optical density-based approach." *PLoS One* 14(5): e0216292.

Rosner, D. and J. Clark (2021). "Formulations for bacteriophage therapy and the potential uses of immobilization." *Pharmaceuticals* 14(4): 359.

Sharma, S., S. Chatterjee, S. Datta, R. Prasad, D. Dubey, R. K. Prasad and M. G. Vairale (2017). "Bacteriophages and its applications: an overview." *Folia Microbiologica* 62(1): 17-55.

Shojaeiarani, J., D. S. Bajwa, N. M. Stark, T. M. Bergholz and A. L. Kraft (2020). "Spin coating method improved the performance characteristics of films obtained from poly(lactic acid) and cellulose nanocrystals." *Sustainable Materials and Technologies* 26: e00212.

Singh, A., N. Glass, M. Tolba, L. Brovko, M. Griffiths and S. Evoy (2009). "Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens." *Biosensors and Bioelectronics* 24(12): 3645-3651.

Tomat, D., M. Soazo, R. Verdini, C. Casabonne, V. Aquili, C. Balagué and A. Quiberoni (2019). "Evaluation of an WPC edible film added with a cocktail of six lytic phages against foodborne pathogens such as enteropathogenic and Shigatoxigenic *Escherichia coli*." *LWT* 113: 108316.

Van Voorthuizen, E. M., N. J. Ashbolt and A. I. Schäfer (2001). "Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes." *Journal of Membrane Science* 194(1): 69-79.

Vandenheuvel, D., A. Singh, K. Vandersteegen, J. Klumpp, R. Lavigne and G. Van den Mooter (2013). "Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84(3): 578-582.

Vonasek, E., P. Lu, Y.-L. Hsieh and N. Nitin (2017). "Bacteriophages immobilized on electrospun cellulose microfibers by non-specific adsorption, protein–ligand binding, and electrostatic interactions." *Cellulose* 24(10): 4581-4589.

Weng, S., A. López, S. Sáez-Orviz, I. Marcet, P. García, M. Rendueles and M. Díaz (2021). "Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against *Staphylococcus aureus*." *Food Control* 121: 107666.

Zhang, Y., H. Zhang and D. Ghosh (2020). "The stabilizing excipients in dry state therapeutic phage formulations." *AAPS PharmSciTech* 21(4): 133.

Chapitre 6 : Article scientifique 3 :

6.1. Avant-propos

Le titre du troisième article scientifique est « Considerations for bioactive paper production scale-up : lessons learnt from various essays ». Cet article est en cours de correction avant soumission à un journal scientifique.

Charles Fort, Étudiant au Doctorat en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques
Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : charles.fort@uqtr.ca

Younès Bareha, Ph.D

Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : younes.bareha@uqtr.ca

Thi Thanh Ha Pham, Ph.D

Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : thi.thanh.ha.pham@uqtr.ca

Thanh Tung Lai, Ph.D

Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse,
Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et
science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada,
G9A 5H7.

Courriel : thanhtung.lai@uqtr.ca

François Brouillette, Ph.D,

Co-directeur de thèse. Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse, Université du Québec à Trois-Rivières Département de biochimie, chimie, physique et science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Courriel : francois.brouillette@uqtr.ca

Guy Njamen,

Kruger Inc., Montréal, QC H3S 1G5, Canada

Courriel : guy.njamen@kruger.com

Balázs Tolnai, Ph.D

Kruger Inc., Montréal, QC H3S 1G5, Canada

Courriel : balazs.tolnai@kruger.com

Sylvain Moineau, Ph.D

Département de biochimie, de microbiologie et de bio-Informatique

Faculté des sciences et de génie, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada

Courriel : sylvain.moineau@bcm.ulaval.ca

Simon Barnabé, Ph.D

Directeur de Thèse. Institut d'Innovation en Écomatériaux, Écoproduits et Écoénergies à basse de biomasse, Université du Québec à Trois-Rivières, Département de biochimie, chimie, physique et science forensique, 3351 Boulevard des Forges, CP.500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7.

Courriel : simon.barnabe@uqtr.ca

Contribution des auteurs : Charles Fort est l'auteur principal de cet article. Il a effectué toutes les expériences scientifiques et les développements associés. M. Bareha à participé à la révision du manuscrit. Mme. Thi Thanh Ha et M. Thanh Tung et M. Moineau ont contribué aux corrections du manuscrit. M. Njamen et M. Tolnai ont pris part dans le financement du projet. M. Barnabé est le directeur de recherche et M. Brouillette est le co-directeur de cette recherche. Le directeur et le co-directeur ont participé à la révision et à la correction du manuscrit.

6.2. Résumé

Cette étude démontre en détail la faisabilité technique du séchage de bactériophages en utilisant une unité de traitement de surface d'échelle pilote. En particulier, elle met l'accent sur l'exploration des propriétés et des performances d'une coucheuse cylindrique de laboratoire (Cylindrical Lab Coater - CLC). Les travaux expérimentaux ont révélé l'importance cruciale du transfert de chaleur convectif lors du processus de séchage des bactériophages pulvérisés sur la surface du papier. Bien que l'effet du rayonnement infrarouge (IR) ait été anticipé, les résultats ont montré que l'effet convectif jouait un rôle tout aussi significatif dans l'efficacité globale du séchage.

Les bactériophages sont appliqués sous forme de film mince, la surface est exposée à des infrarouges et à un phénomène convectif dû à la rotation du cylindre sur lequel les échantillons sont placés. Ainsi, des forces radiatives et convectives influencent le taux de séchage et, par conséquent, la viabilité des bactériophages. De plus, l'étude souligne que, outre les effets radiatifs liés à l'exposition infrarouge, le transfert de chaleur convectif doit être soigneusement pris en compte dans le développement de produits à base de papier bioactif. Cette observation est essentielle pour le passage à l'échelle de la production de ces matériaux, car la vitesse de séchage et l'uniformité de la distribution de la chaleur impactent directement la stabilité et l'efficacité des bactériophages intégrés dans la matrice du papier.

Il est donc nécessaire d'optimiser les conditions de séchage afin d'assurer l'application réussie des bactériophages dans la production de papier bioactif.

6.3. Abstract

This study provides a detailed demonstration of the technical feasibility of drying bacteriophages using a pilot-scale papermaking system. Specifically, the study focuses on the exploration of the properties and performance of a Cylindrical Lab Coater (CLC). The experimental work revealed the critical importance of convective heat transfer during the drying process of bacteriophages sprayed onto the paper surface. While the effect of infrared (IR) radiation was expected, the results indicated that convective heat transfer played an equally significant role in the overall drying efficiency. As the bacteriophages are applied as a thin film, the surface experiences both radiative and convective forces that influence the rate of drying, and thus the preservation of bacteriophages' viability. Furthermore, the study emphasized that, in addition to the radiative effects associated with infrared exposure, convective heat transfer must be carefully considered when developing bioactive paper products. This insight is critical for scaling up the production of such materials, as both the speed of drying and the uniformity of heat distribution directly impact the stability and effectiveness of the bacteriophages integrated into the paper matrix. It is necessary to optimize both radiative and convective drying conditions to ensure the successful application of bacteriophages in bioactive paper production.

6.4. Introduction

During the various stages of transport and processing, Food products are exposed to a variety of agents that present food safety risks. Hazardous foods containing bacteria, viruses, parasites, or harmful chemicals can cause around 200 different illnesses. The food industry incorporates substances into processed foods for technical purposes, aiming to enhance safety, extend shelf life, or modify sensory properties (FAO 1995). More and more publications are raising concerns about the connections between specific food preservatives and various diseases. For instance, a high intake of processed foods and items high in salt and nitrates is associated with an elevated risk of cardiovascular disease and cancer (WCRF 2018, WHO 2018, Javanmardi et al. 2019, Chazelas et al. 2022).

Other antibacterial agents were widely studied and published as alternatives to traditional preservatives in the food industry, including bacteriophages, polypeptides, essential oils, and plant extracts (Jabrane 2015, Silva et al. 2017). Bacteriophages have been widely published as an alternative to traditional antimicrobial preservatives in the food industry (Endersen et al. 2020). Phages are viruses that target bacterial cells and can only replicate by infecting them. They exhibit high specificity, with each bacterial strain being susceptible to its own specific type of phage. Applications of bacteriophages are controlled by a number of international organizations. Their use is approved by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States under 21 CFR§172.785. Their use in food production is approved by the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (AFSCA) in Europe in compliance with regulation N°853/2004.

Their incorporation in packaging, promote their application in a wide range of field, like food industry. For the phage to endure the packaging's incorporation process, it must be stabilized. Surface modification of packaging has been shown to improve bacteriophage stability and infectivity over time. (Pelton et al. 2009). Surface modification by the addition of a biopolymer layer improves the infectivity of bacteriophages on the packaging surface (Lone et al. 2016, Alves et al. 2020).

Nevertheless, phages are naturally present in aqueous environments, and their untreated structure does not allow them to remain stable in a dehydrated state. The preservation of the antibacterial activity of bacteriophages relies on the stability of their constituent proteins. The physicochemical parameters of the bacteriophage environment are key factors in their stabilization and antibacterial activity (Ahmadi et al. 2017, Ranveer et al. 2024).

Drying of bacteriophages is primarily carried out by the pharmaceutical industry using methods such as atomization and lyophilization (Jończyk et al. 2011, Zhang et al. 2020, Rosner et al. 2021). These techniques use amino acid, like leucine, trileucine and polysaccharide likes lactose, trehalose, mannitol, and sucrose (Carrigy et al. 2020, Chang, et al. 2020, Malik et al. 2021). It is theorized that the high transition temperatures and/or their ability to serve as a water substitute of these sugars play significant roles in stabilizing proteins/phages in the solid-state (Yan et al. 2021). In addition, amino acid like Leucine exhibits surfactant-like characteristics, being surface-active and crystallizing early due to its low solubility. As a result, it forms the outer shell of the particles, potentially encapsulating the phage and other excipients (Leung et al. 2018).

In our recent study, we performed infrared drying of bacteriophages using a solution containing 12 g/L of lactose and 8 g/L of leucine, which effectively protected the phages under drying conditions at temperatures up to 80°C. The objective of this study is to evaluate the technical feasibility of drying a bacteriophage solution on paper surfaces using pilot equipment, specifically the CLC7000. Initially, the infrared characteristics will be analyzed by measuring surface temperatures under varying speed and intensity conditions with an infrared camera. Then, the convective effect was quantified by studying the evaporation rate as a function of the rotation speed of the cylinder on which the samples were placed. Additionally, a numerical approach will be presented to supplement the experimental data. Finally, operational recommendations will be discussed for potential large-scale applications.

6.5. Experimental

6.5.1. Chemical and microbiologic material

Chemical products, including Carboxymethyl Cellulose (CMC) C4888, glycerol G2025, and L-leucine 4330, were sourced from Millipore-Sigma (Oakville, ON, Canada), while α -D-lactose monohydrate came from Fisher Scientific (Oakville, ON, Canada). Cationic Starch (CS) National™ 0381 was obtained from Ingredion (Mississauga, ON, Canada). The base papers with a basis of 50g/m² was kindly provided by Kruger Inc., Montréal, QC, Canada.

6.5.2. Pilot equipment

The manipulations were conducted on pilot coating equipment; the cylindrical lab coater 7000 (CLC7000 – SIMUTECH International INC – USA). The coating application was performed using a standard pond integrated into the equipment. The drum had a circumference of 319 cm. Roll speeds can range from 110 m/min to 2000 m/min. The drying unit is composed by 36 1000W lamps (GE – QH1000t3/CL/230-250V). Measuring 35.05 cm by 0.94 cm and placed 10 cm above the cylinder Covering the entire width. Spraying was carried out by 1550+ Autojet equipment (Spraying systems Co), installed on the CLC.

6.5.3. Base coating

Coating solution was prepared by dissolving 2% (m/m) of carboxymethyl cellulose, 2% of cationic starch and 5% of glycerol in distilled water and stirrer at 500 rpm and 90°C during 3h. The coating solution was cooled to room temperature and applied to Kruger base paper using a pond coater. (50 g/m²). The rotation speed of the cylinder was 110 m/min with a drying time of 60 s at 50% lamp intensity of 36000W. The drying of the surface coating solution resulted in the evaporation of the equivalent of 147 mg/m². The mass of the coating was 13.25 grams per square meter (g/m²). The coating increased the total mass of the sample by 21%. The coating thickness was 18.8 μm. Coated paper strips measuring 10 × 40 cm were cut and then calendered at 90°C and 1000 psi (Beloit Wheeler lab scale).

6.5.4 Experimental setup

Although no antibacterial activity assays were conducted in this study, the phage solution was utilized for thermal transfer considerations. The CLC primarily consists of a cylinder with a circumference of 3.19 meters that rotates on its axis, with infrared lamps positioned above it. The spraying equipment could achieve a complete coating of bacteriophage solution in a single pass by positioning the nozzle 20 cm apart, with a 50% opening and a pressure of 20 psi. The spraying of the solutions was performed at the entry point of the zone where the heat is most intense. The concentration of phage in lactose/leucine formulations (60/40% w/w; 20 mg/mL) was titrated at 5×10^8 PFU/mL.

The thermal profile of samples surface was recorded using FLIR T1030sc thermal imaging camera. The temperature of the paper surface was captured at a rate of 30 frames per second using FLIR software version 5.13.18031.2002 (Wilsonville, OR, USA) (Lai et al. 2022). Triplicates were performed for each temperature zone.

For the simulations, it was assumed that the air temperature T_{air} was 20°C, and the air humidity H_{air} was approximately 30%. And the air speed V_{air} in the surrounding environment was a function of the cylinder rotation speed.

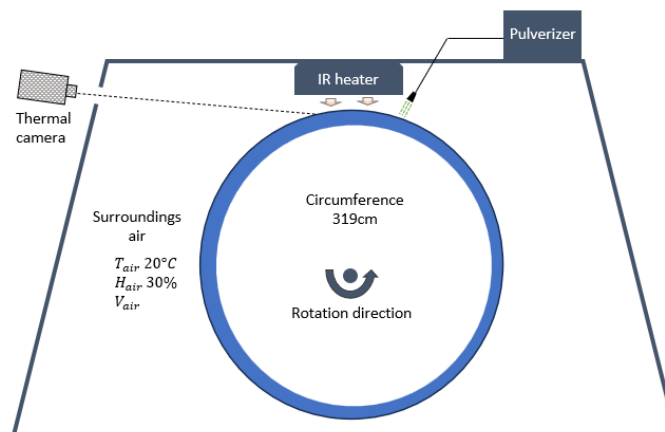


Figure 6-1. experimental device CLC 7000.

6.5.5. Impact of IR and rotational speed on drying rate

Firstly, the effect of rotation on drying was quantified by spraying the solution without using an infrared drying cycle. Then, the effect of infrared heating was examined.

6.5.5.1. Rotation effect on drying rate

In this approach, six rotation speeds were tested (0, 110, 250, 500, 750 and 1000m/min). The mass of the samples was measured every 20 seconds. Each sample was tested in triplicate. The moisture content was calculated from the mass using the following equation:

$$MC(\%) = \frac{((W_0 - W) - W_i)}{W_i}$$

Equation 6-1

Where W_0 is the initial weight of sample (g), W the amount of evaporated moisture (g) and W_i is the dry matter content of sample (g). The moisture content values were

converted into the moisture ratio (MR). The dimensionless moisture ratio can be calculated using the following equation (Midilli et al. 2001):

$$MR = \frac{(MC_t - MC_e)}{(MC_0 - MC_e)}$$

Equation 6-2

Where MC_t is moisture content at time t , MC_e is the equilibrium moisture content and MC_0 is initial moisture content.

6.5.5.2. Infrared efficiency

The surface temperature was analyzed as a function of IR intensity. Due to the equipment design, it was not possible to use infrared without rotating the cylinder. Based on preliminary experiments, all trials were conducted at a speed of 1000 m/min with a 20-second rotation time as a pretreatment to eliminate the rotational variable. The tests began at a minimum intensity of 15%, and three levels of IR lamp intensity were evaluated.

Table 6-1. selected parameters for surface temperature evolution

Essay	Conditions	
	Intensity level	Speed m/min
E1	15	250
E2	15	500
E3	15	750
E4	15	1000
E5	17	1000
E6	21	1000

6.5.6. Theoretical evaporation rate

The simulation of the drying rate enables the establishment of theoretical evaporation rate thresholds based on the fixed parameters. The equations presented do not account for the decrease in the amount of water in the paper. The modeling is based on a constant regime of irradiation and convection.

The total drying rate (DR_{tot}) is the sum of the mass evaporated by convection F_m and the mass evaporated by infrared m_{evap} they are expressed in $\mu\text{L}/100\text{cm}^2/\text{s}$:

$$DR_{tot} = F_m + m_{evap}$$

Equation 6-3

Energy transfer in infrared dryers occurs through radiation from a hot surface (IR bulb) to the paper. This radiation can be absorbed by the bacteriophage solution, the coating, or the base Kruger paper, reflected by the paper surface, or transmitted through the paper. Additionally, heat conduction from the walls to the samples is considered negligible. Stefan-Boltzmann's law provides the total amount of energy emitted (q_{emit} expressed in $\text{W} \cdot \text{m}^2$) by a surface at a given temperature and emissivity:

$$q_{emit} = \varepsilon \cdot \sigma \cdot T^4$$

Equation 6-4

Where, ε is known as emissivity, σ Stefan-Boltzmann constant ($5.68 \times 10^{-8} \text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{K}^{-4}$) and T_{surface} temperature in kelvin (K). Emissivity depends on the surface material, and ranges from 0 total absorption to 1 total reflection. The spray solution

was over 99% water, and the emissivity of water was 0.93. However, the emissivity of the sample surface decreased progressively, while the emissivity of the paper was 0.90. Consequently, at the end of the drying process, the measurements of surface temperature were underestimated. The aim was to observe whether rotation influenced the evolution of the measured surface temperature.

The amount of theoric water evaporated (m_{evap}) in $\mu\text{L}/100\text{cm}^2/\text{s}$ can be calculated directly from an energy balance with the following equation (Ek et al. 2009):

$$m_{evap} = \frac{q_{emit}}{\Delta H_{coating}}$$

Equation 6-5

With $\Delta H_{coating}$ expressed in (J/Kg)

Drying rate F_m can be predicted to the following equation (Ghiaasiaan et al. 2011):

$$F_m = \frac{K_m \cdot M_w \cdot P}{R \cdot (T_p + 273)} \ln \left[\frac{P - P_{air}}{P - P_p} \right]$$

Equation 6-6

Where K_m is the mass transfer coefficient (m.s), M_w is the molecular weight of the evaporating liquid phase (Kg.mol^{-1}), P is atmospheric pressure (in Pascal P), R is the universal gas constant (J.mol.K^{-1}), T_p temperature related with saturated vapor pressure (K), P_{air} the partial pressure of water vapour in the air and P_p is the saturated vapor pressure calculated at the film-air interface (in Pascal P). Moisture content (MC) is added

to the formula to refine the model to the experimental conditions. The MC data is obtained from preliminary manipulations.

The first step is to calculate the Reynolds number to identify the type of flow (laminar or turbulent) with the following equation. Defining the flow type is necessary to determine the formula for calculating the mass transfer coefficient K_m .

$$Re_{\omega} = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot \omega}{v}$$

Equation 6-7

Where d cylinder diameter (m), v air velocity ($m \cdot s^{-1}$) and ω angular velocity (s^{-1}).

Then the following equation calculate the Sherwood number (Sh) (if $Re > 105$) and the mass transfer coefficient K_m .

$$K_m = \frac{Sh \cdot D}{L} = 0,037 \cdot Re_{\omega}^{0.8} \cdot Sc^{1/3}$$

Equation 6-8

With Schmidt number (Sc)

$$Sc = \frac{v}{D}$$

Equation 6-9

With, v kinematic viscosity of fluid (m^2/s) and D diffusion coefficient (m^2/s) according to Marrero and Mason (Marrero and Mason 1972).

And then saturated vapor pressure P_p and partial pressure of water vapour in the air P_{air} are calculated from Antoine's equation (Ek et al. 2009, NIST 2023).

$$P_p = 10^{A - \left(\frac{B}{T+C}\right)}$$

Equation 6-10

$$P_{air} = \frac{HS}{\frac{18}{29} + HS}$$

Equation 6-11

With Antoine's equation parameters show in the next table, and HS air moisture content in dry air (Kg water/Kg dry air).

Table 6-2. Antoine's equation parameters

Temperature (K)	A	B	C	Reference
255,9 to 373	4,6543	1435,264	-64,848	(Stull et al. 1947)

6.6. Results and discussion

6.6.1. Empirical drying rate

6.6.1.1. Rotation effect

This section considered the effect of rotation speed on drying, with six cylinder rotation speeds tested. No infrared drying time was applied. The initial quantity of solution sprayed was the same in all tests. Figure 2 shows the moisture ratio evolution at different cylinder speeds. It was noticeable that the higher the rotation speed, the greater the reduction in the

moisture ratio. The moisture ratio fell no lower than 0.2. It was assumed that a proportion of the sprayed liquid had been absorbed by the functional coating of CMC and cationic starch. The decrease in the moisture ratio at zero rotational speed corresponded to the natural evaporation of surface liquid. For speeds between 250 m/min and 750 m/min, the moisture ratio decreased similarly. It was at 1000 m/min that the impact of speed was greatest. The final moisture ratio of around 0.3 was achieved in less than 20 seconds. Mass measurements over short periods, specifically less than 20 seconds, were not feasible due to the operational delays inherent to the equipment.

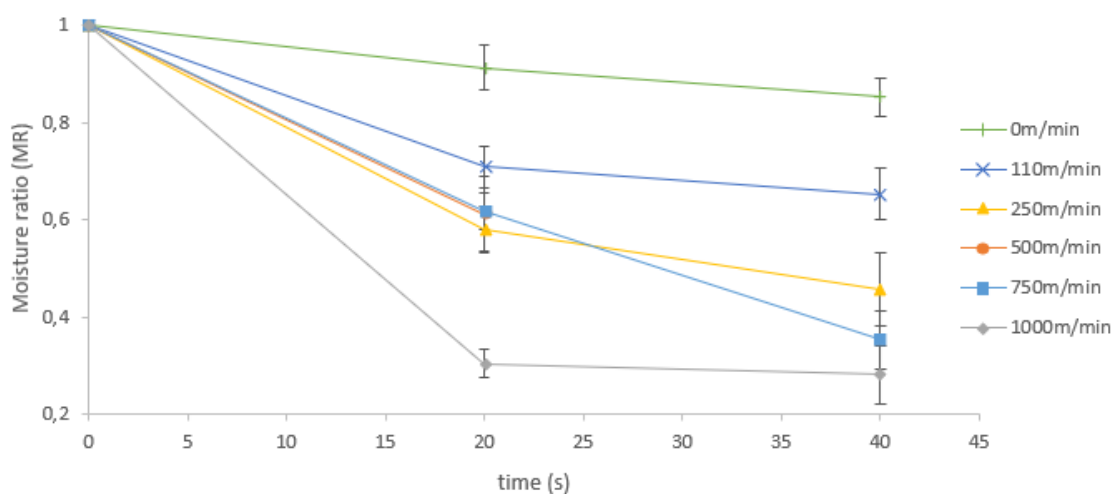


Figure 6-2. Moisture content as a function of rotation speed

When air flows rapidly over a wet surface, the concentration gradient—defined as the difference between the surface humidity and the ambient air humidity—is maintained because the moving air removes the evaporated water vapor. Additionally, the continuous renewal of air in contact with the surface brings in dry or less saturated air, further promoting evaporation. These results supported the hypothesis that the convective

phenomenon plays a significant role in the drying of solutions applied to the surface of the sample.

6.6.1.2. Radiation effect

The thermal analysis of the coating surface exposed to infrared (IR) radiation was conducted. Establishing a temperature range based on the parameters of the Cylindrical Lab Coater (CLC) allowed for the identification of optimal, non-destructive drying conditions for bacteriophages.

An initial analysis of the surface area covered by infrared light revealed several temperature zones. The Figure 3a below shows the thermal profile of the coated paper surface. The surface was divided into three temperature zones, as shown in the Figure 3b. The first zone, A, represented the maximum temperature, just below the infrared lamps. The second zone, B, was the transition temperature. These transition temperature ranges were also influenced by infrared radiation from the IR emitter, divided into two parts: before and after the maximum temperature zone, corresponding to the rise and fall of the surface temperature. The third zone, C, was the standard temperature zone, this corresponds to the basal temperature of the paper without infrared radiation. On the total cylinder circumference of 319 cm, Zone A covered 15 cm, Zone B 5 cm on each side, and Zone C 294 cm. Spraying was conducted just before the paper entered Zone A. The sprayed solution was exposed to the maximum temperature. The time spent in each zone was proportional to the total duration of the drying cycle and the number of revolutions of the cylinder. Proportionally, the time spent in Zones A, B, and C was 4,70%, 3,13%, and 92,16%, respectively.

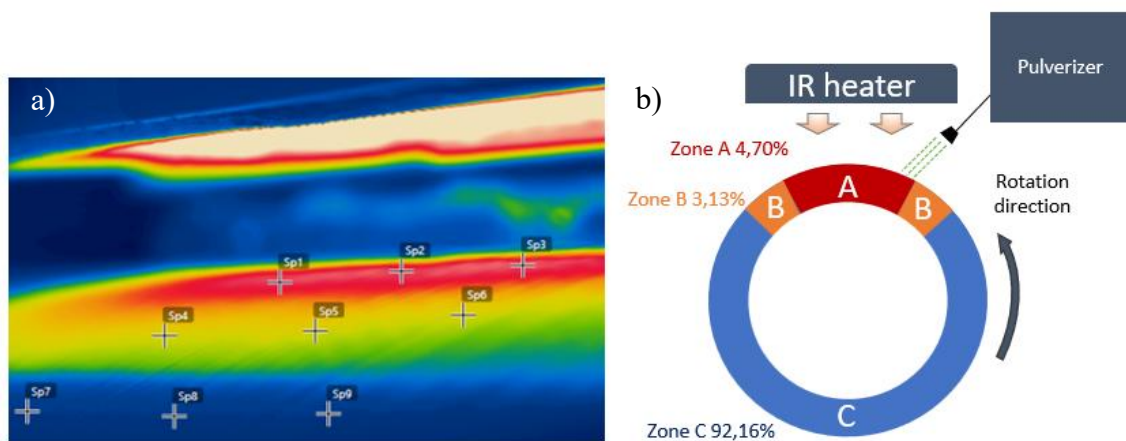


Figure 6-3. Zone of temperature

a) Surface temperature with thermal camera b) temperature zone diagram.

The evolution of surface temperature over time for each zone is presented in Figure 4. The curves represented the average values from three measurement points within each zone (Zone A: Sp1, Sp2, Sp3; Zone B: Sp4, Sp5, Sp6; Zone C: Sp7, Sp8, Sp9). Temperature measurements for zone C were taken approximately twenty centimeters from zone B. It was estimated that infrared radiation caused only a slight increase in the baseline temperature. The example shown corresponded to test E4, with the following parameters: infrared intensity set to 15% and a rolling speed of 1000 m/min. The temperature change from one zone to another was clearly defined. The heat measured on the surface of the paper in Zones A and B was nearly completely dissipated by the time the sample reached Zone C. Furthermore, surface temperature measurements provided valuable insights into the CLC equipment. At a fixed setpoint intensity, the surface temperature increased steadily over time.

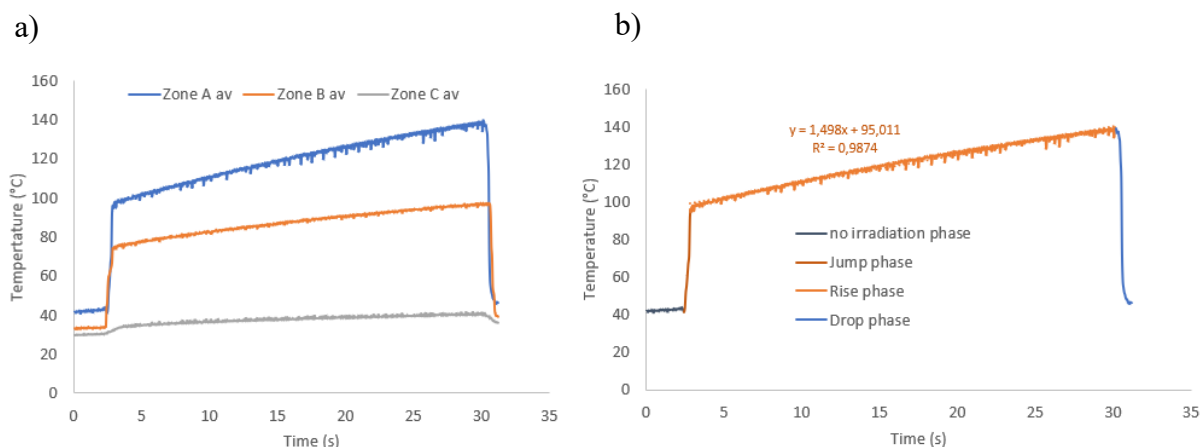


Figure 6-4. Example of temperature variation in different zones a) changes in temperature as a function of zones A, B and C. b) Characteristic temperature variation in zone A.

The temperature curves were divided into four distinct phases (Figure 4b). A non-irradiation phase, lasting a few seconds, occurred before the infrared panels were opened. This was followed by a rapid and immediate temperature rise, known as the "jump phase," which took place once the panels opened and the samples were exposed to the IR lamps. Afterward, the temperature continued to increase throughout the 20-second drying period, although at a slower rate. Finally, when the panels were closed, the temperature rapidly decreased, returning to the initial value. The temperature changes during each phase were consistent and uniform. The temperature evolution for the six experimental conditions is presented in Figure 5. Only the temperature data from Zone A are shown, as this zone more accurately represents the intensity of the infrared exposure.

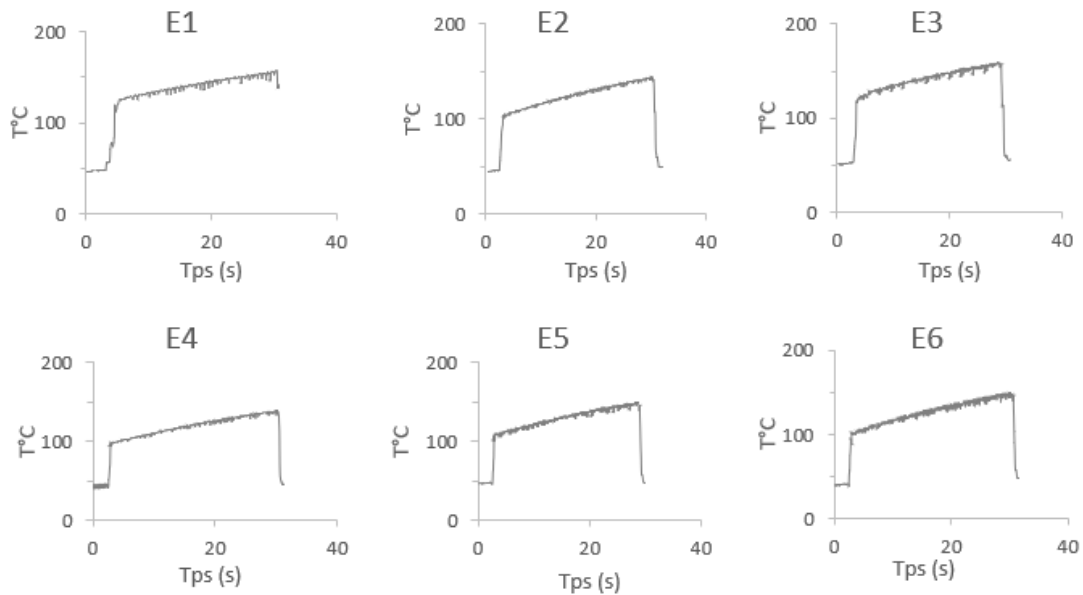


Figure 6-5. Surface temperature as a function of IR speed and intensity

The rate of temperature change, expressed in degrees Celsius per unit of time, was calculated to compare the different conditions. The data for each condition were presented in Table 3. During the jump phase, the rate of temperature increase was so rapid that the data were presented in degrees Celsius per decisecond ($^{\circ}\text{C}/\text{ds}$). For the slower rising phase, the rate of temperature change was presented in degrees Celsius per second ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$).

Table 6-3. Data on surface temperature rise.

Essay	Conditions		Jump phase	Rising phase
	Intensity	Speed	$^{\circ}\text{C}/\text{ds}$	$^{\circ}\text{C}/\text{s}$
E1	15	250	2.93	1.24
E2	15	500	8.15	1.45
E3	15	750	11.75	1.42
E4	15	1000	11.86	1.50
E5	17	1000	12.15	1.60
E6	21	1000	12.59	1.66

The cylinder is 3.19m in circumference, so to make a complete revolution at 250m/min it takes 0,756s, at 500m/min 0,383s, at 750m/min 0,255s and at 1000m/min

0,191s. So, for a fixed duration of time, the number of rotations also increases, and thus the time spent in zone A under the infra-reds. Rotation speed increases the number of passes through each zone by the same proportion; 4,70% of time in zone A; 3,13% in zone B and 92,16% in zone C. It was previously observed that after leaving zones A and B, the measured temperature returned to a basal value. Thus, it was assumed that the increase in temperature was directly linked to the IR lamps. The main increase in temperature occurred during the jump phase. The tendency for temperature to increase per second was less pronounced during the rise phase. To dry a bacteriophage solution using this type of equipment, it is essential to consider both the convective effects and the actual time spent in the different infrared zones. Additionally, the samples were exposed to infrared radiation.

6.6.2. Drying experiments by numerical approach

The samples were fixed to the cylinder, which was rotating during the drying process. The speed in m/min of the cylinder was considered to be the speed of the surrounding air mass. Based on this assumption and considering the rotation speed and temperature, it was possible to calculate the evaporation kinetics over short periods. Convection is the mechanism of heat transfer through a fluid in the presence of bulk fluid motion. Thus, the ambient temperature and pressure of the air mass had an impact on the drying speed (Gómez-de la Cruz et al. 2020).

The drying rate described in Equation 3 was a function of the surrounding temperature, different of partial water pressures, and therefore the properties of the

flowing fluid. The parameters calculated using Equations 3 to 6 are shown in Table 4 below. The calculations were performed with an ambient air temperature of 20°C, a humidity of 30%, and a normal atmospheric pressure of 101325 Pa. The speed of revolution corresponded to the time required to complete one revolution of a point on the cylinder, i.e., 3.19 m.

Table 6-4. Rotation effect data

Vitesse (m/min)	Speed revolution (s)	K_m m/s	F_m $\mu\text{L}/100\text{cm}^2/\text{s}$
110	1.740	0.0142	1.7
250	0.757	0.0274	3.2
500	0.383	0.0478	5.5
750	0.255	0.0661	7.7
1000	0.191	0.0831	9.6

The Reynolds number was calculated to determine the type of flow, whether laminar or turbulent. In all speed conditions, the Reynolds number exceeded 10^5 , limit above which the flow is considered turbulent. In turbulent flow, fluid particles move randomly, resulting in enhanced heat transfer as the fluid carries heat with it. Equation 8, adapted for turbulent flow, is used to calculate the Sherwood number (Sh) and the mass transfer coefficient (K_m). The results showed that as the cylinder's rotational speed increased, the flow velocity also increased, leading to a higher Reynolds number and greater fluid disorder (Incropera et al. 2007). The Sherwood number represents the ratio between mass transfer by convection and mass transfer by diffusion at the fluid-interface boundary. An increase in the Sherwood number indicates enhanced exchange between the two environments. Mass transfer coefficient (K_m), is function of the type of flow (laminar or turbulent), geometry and orientation of the body, fluid properties (such as specific heat,

thermal conductivity, viscosity) (Shang et al. 2011). Therefore, the increase in Reynolds number, which reflects the flow type, resulted in a corresponding increase in the mass transfer coefficient K_m . The calculated convective evaporation rate was considered optimal, as it accounted for the decrease in liquid quantity over time (Berk et al. 2009).

The effect of infrared radiation on the drying process is calculated using Stefan-Boltzmann law (Equation 6-4) (Annaratone et al. 2010). The total energy absorbed by the sample could be calculated from the measured surface temperatures (T). The mass evaporated per unit area and time was calculated by equations 6-5. The evaporation rate m_{evap} as a function of infrared in the surface and the convective drying rate F_m are presented in the following figure: Drying as a function of radiation and rotation speed.

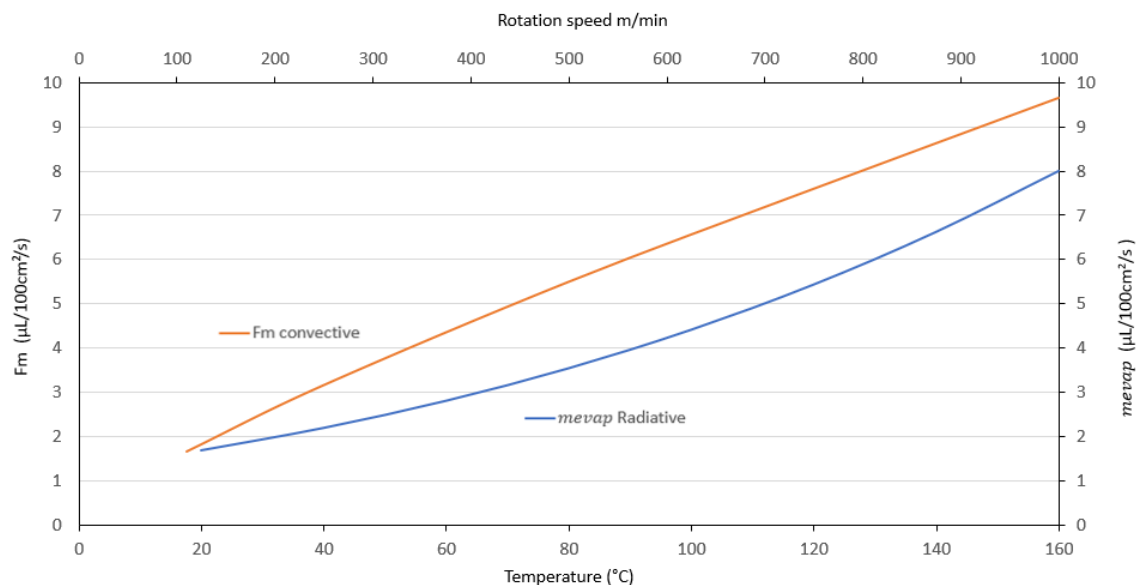


Figure 6-6. Drying rate as a function of radiation and rotation speed

Under the experimental conditions, the highest drying rate (DR) achieved through convective drying was $9.6 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at a rotation speed of 1000 m/min. For infrared (IR) drying, the maximum DR was $8.0 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at a peak temperature of 160°C .

These results highlight the significant contributions of both convective and radiative drying mechanisms to the overall drying process. The combination of the two techniques will allow a greater amount of solution to be added per unit of surface area.

A detailed calculation of the drying rate for each test underscores the relative impact of these methods. For convective drying, the DR increases proportionally with the cylinder rotation speed, reflecting the enhanced air movement around the samples. In contrast, IR drying primarily depends on the intensity of radiation in zones A and B. The numerically predicted IR DR must be nuanced, as the samples only spent 4.7% of the total drying cycle in zone A and 3.13% in zone B. These zones contributed directly to the radiative drying rate, while the remaining drying time involved convective contributions from ambient temperature, ambient pressure, and rotation-induced airflow.

The combined effects of convective and radiative drying are crucial. Convective drying plays a dominant role at higher speeds due to increased evaporation caused by air circulation, which aligns with findings from spray drying studies for bacteriophage stabilization (Leung et al. 2017). Conversely, IR drying is more effective in zones with direct radiation, contributing significantly to the rapid removal of surface moisture (Ek et al. 2009). When considering the theoretical contributions of each method, the results demonstrate that the synergy between convective and radiative drying optimizes the drying process, balancing efficiency and effectiveness across varying conditions (Hammes et al. 2015). The effect of drying by conduction from the supporting cylinder to the wet paper was not considered. This phenomenon is observed in industrial paper machines. Therefore, accounting for it would alter the established conclusions.

By integrating these insights, this analysis highlights the critical roles of both drying mechanisms, offering a comprehensive understanding of their contributions to achieving optimal drying conditions.

6.7. Conclusion

This work carried out enabled us to understand the different effects and their intensities when using paper-making pilot equipment. The convective phenomenon played a major role in drying when using the cylindrical lab coater (CLC). The intensity of the infrared radiation, i.e., the surface temperature measured, was important to regulate so as not to destroy the phages. The rotational speed of the cylinder played a crucial role in the drying process. This factor, when combined with other drying techniques, should be carefully considered in order to optimize the overall efficiency of the drying process. The interaction between rotational speed and other variables, such as infrared exposure and convection, significantly influences the rate of evaporation and heat transfer. Therefore, for more accurate results and improved drying performance, the rotational speed should be precisely controlled and integrated with other methods of drying. The combination of infrared and convection needed to be investigated further to pave the way for the production of bioactive paper on an industrial scale.

6.8 Acknowledgements

We would like to thank NSERC, CRIBIQ, the Foundation of UQTR, and Kruger Inc. for their financial support. We are grateful to Denise Tremblay for discussion.

The research was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant RDCPJ 536470-18, grant number RDA 536574-18), the Consortium de recherche et innovation en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ, grant number 2018-074-PR-C43), the Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), and Kruger Inc. S.M. holds the Canada Research Chair in Bacteriophages.

6.9. References

- Ahmadi, H., D. Radford, A. M. Kropinski, L.-T. Lim and S. Balamurugan (2017). "Thermal-stability and reconstitution ability of *Listeria* phages P100 and A511." *Frontiers in Microbiology* 8: 2375-2375.
- Alves, D., M. A. Cerqueira, L. M. Pastrana and S. Sillankorva (2020). "Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*." *Food Research International* 128: 108791.
- Annaratone, D. (2010). *Radiation. Engineering Heat Transfer*. D. Annaratone. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 139-189.
- Berk, Z. (2009). Chapter 22 - Dehydration. *Food Process Engineering and Technology*. Z. Berk. San Diego, Academic Press: 459-510.
- Carrigy, N. B., L. Liang, H. Wang, S. Kariuki, T. E. Nagel, I. F. Connerton and R. Vehring (2020). "Trileucine and pullulan improve anti-*Campylobacter* bacteriophage stability in engineered spray-dried microparticles." *Annals of Biomedical Engineering* 48(4): 1169-1180.

Chang, R. Y. K., P. C. L. Kwok, D. Khanal, S. Morales, E. Kutter, J. Li and H.-K. Chan (2020). "Inhalable bacteriophage powders: Glass transition temperature and bioactivity stabilization." *Bioengineering & Translational Medicine* 5(2): e10159-e10159.

Chazelas, E., F. Pierre, N. Druet-Pecollo, Y. Esseddik, F. Szabo de Edelenyi, C. Agaesse, A. De Sa, R. Lutchia, S. Gigandet, B. Srour, C. Debras, I. Huybrechts, C. Julia, E. Kesse-Guyot, B. Allès, P. Galan, S. Hercberg, M. Deschasaux-Tanguy and M. Touvier (2022). "Nitrites and nitrates from food additives and natural sources and cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort." *Int J Epidemiol* 51(4): 1106-1119.

Ek, M., G. r. Gellerstedt and G. Henriksson (2009). *Pulp and paper chemistry and technology. Volume 3, Paper chemistry and technology*, Walter de Gruyter.

Endersen, L. and A. Coffey (2020). "The use of bacteriophages for food safety." *Current Opinion in Food Science* 36: 1-8.

FAO (1995). *Codex alimentarius*. GFSA, codex STAN 192-1995, World Health Organization.

Ghiaasiaan, S. M. (2011). *Convective heat and mass transfer*. Cambridge, Cambridge University Press.

Gómez-de la Cruz, F. J., J. M. Palomar-Carnicero, Q. Hernández-Escobedo and F. Cruz-Peragón (2020). "Determination of the drying rate and effective diffusivity coefficients during convective drying of two-phase olive mill waste at rotary dryers drying conditions for their application." *Renewable Energy* 153: 900-910.

Hammes, G. G. and S. Hammes-Schiffer (2015). *Physical chemistry for the biological sciences*. Hoboken, New Jersey, Wiley.

Incropera, F. P., D. P. DeWitt, T. L. Bergman and A. Lavine (2007). *Fundamentals of heat and mass transfer*. Hoboken, N.J., John Wiley & Sons.

Jabrane, T. (2015). *Méthodologies de fabrication de papier bioactif*. PhD, Université du Québec à Trois Rivières.

Javanmardi, F., J. Rahmani, F. Ghiasi, H. Hashemi Gahruie and A. Mousavi Khaneghah (2019). "The Association between the Preservative Agents in Foods and the Risk of Breast Cancer." *Nutr Cancer* 71(8): 1229-1240.

Jończyk, E., M. Kłak, R. Międzybrodzki and A. Górski (2011). "The influence of external factors on bacteriophages—review." *Folia Microbiologica* 56(3): 191-200.

Lai, T. T., T. T. H. Pham, M. van Lingen, G. Desaulniers, G. Njamen, B. Tolnai, T. Jabrane, S. Moineau and S. Barnabé (2022). "Development of antimicrobial paper

coatings containing bacteriophages and silver nanoparticles for control of foodborne pathogens." *Viruses* 14(11).

Leung, S. S. Y., T. Parumasivam, F. G. Gao, E. A. Carter, N. B. Carrigy, R. Vehring, W. H. Finlay, S. Morales, W. J. Britton, E. Kutter and H.-K. Chan (2017). "Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders." *International Journal of Pharmaceutics* 521(1-2): 141-149.

Leung, S. S. Y., T. Parumasivam, A. Nguyen, T. Gengenbach, E. A. Carter, N. B. Carrigy, H. Wang, R. Vehring, W. H. Finlay, S. Morales, W. J. Britton, E. Kutter and H.-K. Chan (2018). "Effect of storage temperature on the stability of spray dried bacteriophage powders." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 127: 213-222.

Lone, A., H. Anany, M. Hakeem, L. Aguis, A.-C. Avdjian, M. Bouget, A. Atashi, L. Brovko, D. Rochefort and M. W. Griffiths (2016). "Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods." *International Journal of Food Microbiology* 217: 49-58.

Malik, D. J. (2021). "Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy." *Current Issues Molecular Biology* 40: 303-316.

Marrero, T. R. and E. A. Mason (1972). Gaseous diffusion coefficients, American Chemical Society and the American Institute of Physics for the National Bureau of Standards.

Midilli, A. (2001). "Determination of pistachio drying behaviour and conditions in a solar drying system." *International Journal of Energy Research* 25(8): 715-725.

NIST (2023). Water. National Institut of Standards and Technology. WebBook of Chimistry NIST SRD 69, U.S Department of Commerce

Pelton, R. (2009). "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics." *Trends in Analytical Chemistry* 28(8): 925-942.

Ranveer, S. A., V. Dasriya, M. F. Ahmad, H. S. Dhillon, M. Samtiya, E. Shama, T. Anand, T. Dhewa, V. Chaudhary, P. Chaudhary, P. Behare, C. Ram, D. V. Puniya, G. D. Khedkar, A. Raposo, H. Han and A. K. Puniya (2024). "Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain." *NPJ Sci Food* 8(1): 1.

Rosner, D. and J. Clark (2021). "Formulations for bacteriophage therapy and the potential uses of immobilization." *Pharmaceutics* 14(4): 359.

Shang, D. (2011). *Theory of heat transfer with forced convection film flows*. Berlin, Springer.

Silva, F. and F. C. Domingues (2017). "Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative." *Crit Rev Food Sci Nutr* 57(1): 35-47.

Stull, D. R. (1947). "Vapor pressure of pure substances. organic and inorganic compounds." *Industrial & Engineering Chemistry* 39(4): 517-550.

WCRF (2018). Preservation and processing of foods and the risk of cancer, World Cancer Research Fund International.

WHO (2018). Red meat and processed meat - IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans *The lancet Oncology*. 114.

Yan, W., R. He, X. Tang, B. Tian, Y. Liu, Y. Tong, K. K. W. To and S. S. Y. Leung (2021). "The influence of formulation components and environmental humidity on spray-dried phage powders for treatment of respiratory infections caused by *Acinetobacter baumannii*." *Pharmaceutics* 13(8).

Zhang, K., T. Su, F. Cheng, Y. Lin, M. Zhou, P. Zhu, R. Li and D. Wu (2020). "Effect of sodium citrate/polyethylene glycol on plasticization and retrogradation of maize starch." *International Journal of Biological Macromolecules* 154: 1471-1477.

Chapitre 7 : Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'aboutir à au développement d'un prototype de papier d'emballage destiné au secteurs alimentaire ayant des propriétés antibactériennes. Le revêtement développer doit répondre à plusieurs prérequis. L'effet antibactérien contre le genre *Listeria monocytogenes* doit être significatif. Les composants utilisés doivent être sans danger pour le consommateur. Enfin le produit développé doit tenir compte des réalités industrielle du partenaire Kruger.

La revue de littérature en matière de développement d'emballage ayant des propriétés antibactériennes ont démontré plusieurs failles. Dont le recours à des agents bioactifs telles les nanoparticules ou les huiles essentielles ont peu de recul sur leurs effets ou encore leurs éliminations. Il est apparu également, que les bactériophages bien que hautement spécifique et très efficace sont fragile. Cela reste un avantage pour leurs éliminations mais apporte de son lot de problème à surmonter. Par conséquent, trois problématiques scientifiques ont pu être formulées :

- (i) Comment modifier la surface de l'emballage pour améliorer la stabilité des bactériophages en surface.
- (ii) Comment protéger les bactériophages lors des procédés de séchage.
- (iii) Comment augmenter la vitesse de séchage des bactériophages pour atteindre des vitesses proches de celle de l'industrie papetière.

Dans une première partie nous nous sommes intéressés à l'application d'un revêtement de biopolymère augmentent la stabilité des bactériophages. Le papier est un support particulier pour les bactériophages. La faible teneur en humidité, la rugosité et les interactions électrostatique de surface en fait un environnement inhospitalier pour les bactériophages. L'application d'une couche hydratante à base de biopolymère augmentera la stabilité de ces derniers. L'utilisation de la carboxyméthylcellulose, l'amidon cationique et un plastifiant le glycérol ont été plébiscités. Leurs biodisponibilités et la connaissance de ces composants par l'industrie papetière en font des candidats idéals. À travers un plan d'expérience 17 mélanges différents ont été testés. L'analyse des propriétés d'absorption d'eau à différentes humidités de conservation a permis faire émerger un mélange prometteur. Le couchage prometteur est composé de 2% de carboxyméthylcellulose, 2% d'amidon cationique et 5% de glycérol. Ce revêtement à une épaisseur de 16µm et augmente la masse par mètre carré de seulement 15%. Il conserve l'activité antibactérienne des bactériophages à sa surface jusqu'à 14 jours à 4°C contre habituellement quelques heures sur un papier sans traitement. L'augmentation de la durée de vie et le maintien de l'activité des bactériophages est possible, mais les procédés de séchage en industrie papetière expose les phages à des températures qui leur sont létales. La température avoisine les 80°C pour le séchage de papier en formation sur toile, et peut atteindre plusieurs centaines de degrés Celsius pour certains couchages.

Dans une deuxième partie, le séchage de bactériophage sur les couchages précédemment développés a été étudié. Dans les travaux réalisés, trois mélanges de lactose et de leucine sont testés. Le séchage des solutions a été réalisé par un équipement d'infrarouge ayant permis d'obtenir une température maximale de surface de 80°C. La vitesse de séchage a été suivie par l'évolution de la masse. Les échantillons ont été conservés à 4°C et à 33%, 60% et 90% d'humidités avant de tester l'activité antibactérienne. Les résultats ont démontré que sans les excipients aucune activité antibactérienne est détectée. À l'inverse en présence d'excipient les bactériophages résistent au procédé de séchage. Parmi les différentes solutions testées, le lactose à 12g/L et la leucine à 8g/L ajoutés à la solution de bactériophage permettent de les maintenir stables lors d'une exposition jusqu'à 80°C pendant 2 minutes. L'activité antibactérienne est détectée jusqu'à 14 jours après traitement est ce que pour une conservation à 4°C et des humidités ambiantes de 33% et 50%. En comparaison, les excipients ajoutés permettent d'atteindre des humidités de conservation plus basses que sans excipients présenté en première partie de conclusion.

Lors de changement d'échelles plusieurs phénomènes et de nouvelles contraintes peuvent apparaître. Pour tester les limites des stratégies développées tout au long de cette thèse, des essais sur un équipement pilote ont été réalisés.

Enfin, dans la dernière partie, toutes les manipulations ont été réalisées sur une coucheuse cylindrique de type pilote (CLC7000) du laboratoire partenaire Innofibre. Le couchage composé de 2% de carboxyméthylcellulose, 2% d'amidon cationique et 5% de

glycérol a été appliqué par un pond à 500m/min puis séché 60s par lampe IR. Les caractéristiques du revêtement sont considérées similaires à celles obtenus lors d'un couchage manuel sur un équipement de laboratoire. Grâce à une caméra infrarouge des relevés thermique de la surface en fonction de la vitesse de roulement et de l'intensité des infrarouges ont été réalisés. Cela a permis de mieux comprendre la répartition de la température à la surface du cylindre lors d'un cycle de séchage. La solution de bactériophages contenant un mélange de lactose à 12g/L et de leucine à 8g/L a été pulvérisée sur les papier couchés. L'analyse de la masse des échantillons lors du séchage a permis d'établir un profil de séchage en fonction de la vitesse de rotation et de l'intensité des infrarouges. Une approche numérique a permis de déterminer l'impact de l'effet de rotation sur le séchage. La rotation du cylindre ajoute un effet de convection très impactant dans le processus de séchage. Par exemple, dans une des conditions expérimentales, la température de surface est fixée à 80°C et 500rpm, le taux d'évaporation sont respectivement de 3,8µl/100cm²/s et 5,4µl/100cm²/s. Dans ce cas l'effet convectif est plus important que celui des IR. Les essais pilotes ont fait apparaître des nouvelles difficultés techniques. L'opération de l'équipement comporte de nombreux temps mort incompressible, limitant ainsi la précision de prise de donnée sur la masse en fonction de l'avancement du séchage. La faible quantité de solution pulvérisée et le séchage trop important n'ont pas permis d'aboutir à un produit fonctionnel. Les quantités doivent être revu à la hausse et des prévisions dans les taux de séchage doivent être adaptés.

En conclusion le travail réalisé dans cette thèse a démontré la faisabilité technique de développer un revêtement ayant des propriétés antibactériennes. Les contraintes

techniques d'un milieu industriel ont été prise en considération. Le revêtement appliqué sur le papier est léger et réalisable avec des équipement papetiers. Les excipients permettent de protéger les bactériophages à des températures élevés. Ils conservent ainsi leur activité après séchage aux infrarouges. Les composés utilisés dans ces travaux sont bon marchés et disponibles. Lors de développement de produits le coût des matières premières et de la faisabilité techniques sont déterminante. De plus, les essais pilotes ont permis de faire avancer les connaissances en vue d'un changement d'échelles. Il a été démontré une réelle possibilité de produire ce genre d'emballage.

Pour un développement plus abouti, de nouveaux essais pilotes doivent être réalisés, et renforcer ainsi les connaissances sur le séchage de bactériophage par infrarouge. L'application de quantités plus importantes de solution pulvérisée en surface permettrait d'augmenter le nombre de bactériophage survivant au procédé de séchage. Des tests sur les performances de la technique de pulvérisation pourraient être investigués. La position, le nombre, le débit et le type de buse sont autant de paramètres à étudier. Il est également nécessaire de tester d'autres vitesses de roulement ayant un impact sur le séchage. Le phénomène de convection dans ce genre de cas est mal connu et pourrait faire l'objet d'analyses plus approfondies. Un plus grand nombre de résultats expérimentaux conforterait le modèle numérique établi sur l'efficacité du séchage. Et ainsi fixer une configuration de vitesse et d'intensité optimale pour le séchage de papier bioactif.

Bibliographie

References

1. DESA, World populations prospects 2024. 2024, UN.
2. Affairs, U.N.-D.o.E.a.S., World population prospects 2019 : Highlights. 2019.
3. FAO, La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture: enseignements des 50 dernières années. 2000.
4. Harwell, M.A., et al., Conceptual Framework for Assessing Ecosystem Health. Integrated environmental assessment and management, 2019. 15(4): p. 544-564.
5. Porobic, J., et al., The impact of fishing on a highly vulnerable ecosystem, the case of Juan Fernández Ridge ecosystem. PloS one, 2019. 14(2): p. e0212485-e0212485.
6. Meurens, F., et al., Animal board invited review: Risks of zoonotic disease emergence at the interface of wildlife and livestock systems. Animal : an international journal of animal bioscience, 2021. 15(6): p. 100241-100241.
7. Chabas, H., et al., Evolutionary emergence of infectious diseases in heterogeneous host populations. PLoS biology, 2018. 16(9): p. e2006738-e2006738.
8. Vouga, M. and G. Greub, Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2016. 22(1): p. 12-21.
9. Koutsoumanis, K., et al., Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. EFSA journal. European Food Safety Authority, 2021. 19(6): p. e06651-e06651.
10. WHO, Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens. 2016. p. 45.
11. IRC, I.I.a.R.C.-. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024. p. 72.
12. Murray, C.J.L., et al., Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet, 2022. 399(10325): p. 629-655.
13. Jonas, O.B., et al., Drug-resistant infections : a threat to our economic future (Vol. 2) : final report. 2017.
14. Founou, L.L., R.C. Founou, and S.Y. Essack, Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. Frontiers in microbiology, 2016. 7: p. 1881-1881.
15. EMA, EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA), in EFSA journal. European Food Safety Authority. 2017, John Wiley and Sons Inc. p. e04666-e04666.

16. Thomas, M.K., Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2013. 10(7): p. 639-648.
17. ASPC, A.d.l.s.p.d.C.-. Programme national de surveillance des maladies entériques (PNSME). 2022, Agence de la santé publique du Canada.
18. Thomas, M.K., et al., Estimates of Foodborne Illness–Related Hospitalizations and Deaths in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2015. 12(10): p. 820-827.
19. Kerry, J., *Advances in meat, poultry and seafood packaging*. 2012, Woodhead Pub.: Cambridge.
20. Chiellini, E., *Environmentally compatible food packaging*. 2008, CRC ;Woodhead: Boca Raton Cambridge.
21. He, F.J. and G.A. MacGregor, Role of salt intake in prevention of cardiovascular disease: controversies and challenges. *Nature Reviews Cardiology*, 2018. 15(6): p. 371-377.
22. Cappuccio, F.P., Cardiovascular and other effects of salt consumption. *Kidney international supplements*, 2013. 3(4): p. 312-315.
23. Cordova, R., et al., Consumption of ultra-processed foods and risk of multimorbidity of cancer and cardiometabolic diseases: a multinational cohort study. *The Lancet Regional Health – Europe*, 2023. 35.
24. Barbaresco, J., et al., Ultra-processed food consumption and human health: an umbrella review of systematic reviews with meta-analyses. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024: p. 1-9.
25. Harrison, R.M. and R.E. Hester, *Plastics and the Environment. Issues in Environmental Science and Technology*. 2019, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
26. Galić, K., Food Packaging Methods, in *Packaging Materials and Processing for Food, Pharmaceuticals and Cosmetics*. 2021. p. 257-300.
27. Kaza, S., et al., *What a Waste 2.0 : A global snapshot of solid waste management to 2050*. 2018-09-20: Washington, DC: World Bank.
28. OCDE, *Global Plastics Outlook*. 2022.
29. Jieying, S., et al., Paper-based material with hydrophobic and antimicrobial properties: Advanced packaging materials for food applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2024. 23(3): p. e13373.
30. Harada, L.K., et al., Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 2018. 212-213: p. 38-58.
31. Mahy, B.W.J., *The Dictionary of Virology*. 2008, Elsevier: Burlington.

32. Hurst, C.J., Studies in viral ecology. 2021, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ.
33. Serge, M., R.K. Boris, and D.T.J. Littlewood, Parasite Diversity and Diversification : Evolutionary Ecology Meets Phylogenetics. 2015, Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
34. Garcia, L.S., Diagnostic medical parasitology. 2016, ASM Press: Washington, DC.
35. Matle, I., K.R. Mbatha, and E. Madoroba, A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. The Onderstepoort journal of veterinary research, 2020. 87(1): p. e1-e20.
36. Low, J.C. and W. Donachie, A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J, 1997. 153(1): p. 9-29.
37. Gahan, C.G.M. and C. Hill, Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. Journal of Applied Microbiology, 2005. 98(6): p. 1345-1353.
38. Mateus, T., et al., Listeriosis during Pregnancy: A Public Health Concern. ISRN obstetrics and gynecology, 2013. 2013: p. 851712-851712.
39. Gaillard, J.L., et al., Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. Cell, 1991. 65(7): p. 1127-1141.
40. Seveau, S., Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. Subcell Biochem, 2014. 80: p. 161-95.
41. Fischetti, V.A., et al., Gram-positive pathogens. 2019, American Society for Microbiology: Washington, DC.
42. Rajabian, T., et al., The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. Nature Cell Biology, 2009. 11(10): p. 1212-1218.
43. Raposa, B., et al., Food additives: Sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine, and tartrazine modify the expression of NF κ B, GADD45 α , and MAPK8 genes. Physiol Int, 2016. 103(3): p. 334-343.
44. Chazelas, E., et al., Nitrites and nitrates from food additives and natural sources and cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort. Int J Epidemiol, 2022. 51(4): p. 1106-1119.
45. Ozturk, B., et al., Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural biopolymers: Whey protein isolate and gum arabic. Food Chemistry, 2015. 188: p. 256-263.
46. Ameta, S.K., et al., Use of Nanomaterials in Food Science, in Biogenic Nano-Particles and their Use in Agro-ecosystems, M. Ghorbanpour, et al., Editors. 2020, Springer Singapore: Singapore. p. 457-488.

47. Othman, S.H., Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2014. 2: p. 296-303.
48. Hamad, A.F., et al., The intertwine of nanotechnology with the food industry. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2018. 25(1): p. 27-30.
49. Guerrero Correa, M., et al., Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein journal of nanotechnology*, 2020. 11: p. 1450-1469.
50. Chaudhary, P., F. Fatima, and A. Kumar, Relevance of Nanomaterials in Food Packaging and its Advanced Future Prospects. *Journal of inorganic and organometallic polymers and materials*, 2020: p. 1-13.
51. Shao, Y., et al., Green synthesis of sodium alginate-silver nanoparticles and their antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. 111: p. 1281-1292.
52. Krol, A., et al., Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018. 249: p. 37-52.
53. Siddiqi, K.S., et al., Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. *Nanoscale Research Letters*, 2018. 13(1): p. 141.
54. Pasquet, J., et al., Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015. 479(1): p. 88-95.
55. Applerot, G., et al., Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury. *Advanced Functional Materials*, 2009. 19(6): p. 842-852.
56. McClements, D.J. and H. Xiao, Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. *npj Science of Food*, 2017. 1(1): p. 6.
57. Hendrickson, O.D., et al., Toxicity of nanosilver in intragastric studies: Biodistribution and metabolic effects. *Toxicology Letters*, 2016. 241: p. 184-192.
58. de Oliveira Mallia, J., et al., Nanoparticle Food Applications and Their Toxicity: Current Trends and Needs in Risk Assessment Strategies. *Journal of Food Protection*, 2022. 85(2): p. 355-372.
59. Peters, R.J.B., et al., Silicon dioxide and titanium dioxide particles found in human tissues. *Nanotoxicology*, 2020. 14(3): p. 420-432.
60. Esther, E.F. and F. Eleonore Cytotoxicity of Nanoparticles Contained in Food on Intestinal Cells and the Gut Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. 17, 509 DOI: 10.3390/ijms17040509.

61. FDA, 21CFR182.20 Substances generally recognized as safe, U.F.D. Administration, Editor. 2024: Code of Federal Regulations.
62. Wink, M., Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988. 75(2): p. 225-233.
63. Farmer, E.E. and C.A. Ryan, Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(19): p. 7713-6.
64. Gupta, A., et al., Essential Oils, in *Essential Oils*. 2023. p. 871-889.
65. Noori, S., F. Zeynali, and H. Almasi, Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*, 2018. 84: p. 312-320.
66. Talón, E., et al., Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*, 2017. 157: p. 1153-1161.
67. Dong, F. and X. Wang, Guar gum and ginseng extract coatings maintain the quality of sweet cherry. *LWT*, 2018. 89: p. 117-122.
68. Silva, F. and F.C. Domingues, Antimicrobial activity of coriander oil and its effectiveness as food preservative. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017. 57(1): p. 35-47.
69. Di Pasqua, R., et al., Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J Agric Food Chem*, 2006. 54(7): p. 2745-9.
70. El Bourakadi, K., A.E.K. Qaiss, and R. Bouhfid, Essential Oils Used in Packaging, in *Essential Oils*. 2023. p. 1009-1024.
71. Sinigaglia, M., M.R. Corbo, and A. Bevilacqua, Application of Alternative Food-preservation Technologies to Enhance Food Safety and Stability. 2010, [S.l.]: Bentham Science Publishers.
72. Lourenço, S.C., M. Moldão-Martins, and V.D. Alves, Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2019. 24(22): p. 4132.
73. Phoenix, D., S.R. Dennison, and F. Harris, Antimicrobial peptides. 2013, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim, Germany.
74. Huang, Y., J. Huang, and Y. Chen, Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & Cell*, 2010. 1(2): p. 143-152.
75. Rowe-Magnus, D.A., et al., Cathelicidin Peptides Restrict Bacterial Growth via Membrane Perturbation and Induction of Reactive Oxygen Species. *mBio*, 2019. 10(5).

76. Xuan, J., et al., Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resistance Updates*, 2023. 68: p. 100954.
77. Carmona-Ribeiro, A.M. and L.D. De Melo Carrasco, Novel Formulations for Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014. 15(10): p. 18040-18083.
78. Li, X., et al., Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules*, 2022. 27(9).
79. Xu, K., et al., A systematical review on antimicrobial peptides and their food applications. *Biomaterials Advances*, 2023. 155: p. 213684.
80. Fael, H. and A.L. Demirel, Nisin/polyanion layer-by-layer films exhibiting different mechanisms in antimicrobial efficacy. *RSC Advances*, 2020. 10(17): p. 10329-10337.
81. Shwaiki, L.N., A.W. Sahin, and E.K. Arendt, Study on the Inhibitory Activity of a Synthetic Defensin Derived from Barley Endosperm against Common Food Spoilage Yeast. *Molecules*, 2020. 26(1).
82. Bucataru, C. and C. Ciobanasu, Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. *Microbiological Research*, 2024. 286: p. 127822.
83. Chen, C.H. and T.K. Lu, Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. *Antibiotics*, 2020. 9(1): p. 24.
84. Sharp, D.G., et al., Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1946. 165(1): p. 259-270.
85. Breitbart, M., et al., Phage community dynamics in hot springs. *Appl Environ Microbiol*, 2004. 70(3): p. 1633-40.
86. Ranveer, S.A., et al., Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *NPJ Sci Food*, 2024. 8(1): p. 1.
87. Whitman, P.A. and R.T. Marshall, Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef. *Appl Microbiol*, 1971. 22(3): p. 463-8.
88. Carlton, R.M., et al., Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2005. 43(3): p. 301-312.
89. Klumpp, J., et al., The Terminally Redundant, Nonpermuted Genome of *Listeria* Bacteriophage A511: a Model for the SPO1-Like Myoviruses of Gram-Positive Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2008. 190(17): p. 5753-5765.

90. Stone, E., et al., Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Phage vB_LmoH_P61, a Phage With Biocontrol Potential on Different Food Matrices. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2020. 4.
91. Ahmadi, H., et al., Thermal-stability and reconstitution ability of *Listeria* phages P100 and A511. *Frontiers in Microbiology*, 2017. 8: p. 2375-2375.
92. Fister, S., et al., Influence of environmental factors on phage-bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Frontiers in Microbiology*, 2016. 7: p. 1152-1152.
93. Chen, X., et al., Characterization and adsorption of a *Lactobacillus plantarum* virulent phage. *Journal of Dairy Science*, 2019. 102(5): p. 3879-3886.
94. Hosseinioust, Z., A.L.J. Olsson, and N. Tufenkji, Going viral: Designing bioactive surfaces with bacteriophage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. 124: p. 2-16.
95. Rosner, D. and J. Clark, Formulations for bacteriophage therapy and the potential uses of immobilization. *Pharmaceuticals*, 2021. 14(4): p. 359.
96. Tytgat, H.L., et al., Endogenous biotin-binding proteins: an overlooked factor causing false positives in streptavidin-based protein detection. *Microb Biotechnol*, 2015. 8(1): p. 164-8.
97. Gervais, L., et al., Immobilization of biotinylated bacteriophages on biosensor surfaces. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. 125(2): p. 615-621.
98. Tolba, M., et al., Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications. *Applied and environmental microbiology*, 2010. 76(2): p. 528-535.
99. Pearson, H.A., et al., Phage-bacterium war on polymeric surfaces: can surface-anchored bacteriophages eliminate microbial infections? *Biomacromolecules*, 2013. 14(5): p. 1257-1261.
100. Nogueira, F., et al., Immobilization of bacteriophage in wound-dressing nanostructure. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2017. 13(8): p. 2475-2484.
101. Janczuk, M., et al., Bacteriophage-Based Bioconjugates as a Flow Cytometry Probe for Fast Bacteria Detection. *Bioconjug Chem*, 2017. 28(2): p. 419-425.
102. Van Voorthuizen, E.M., N.J. Ashbolt, and A.I. Schäfer, Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *Journal of Membrane Science*, 2001. 194(1): p. 69-79.
103. Singh, A., et al., Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. 24(12): p. 3645-3651.

104. Anany, H., et al., Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77(18): p. 6379-6387.
105. Vonasek, E., et al., Bacteriophages immobilized on electrospun cellulose microfibers by non-specific adsorption, protein–ligand binding, and electrostatic interactions. *Cellulose*, 2017. 24(10): p. 4581-4589.
106. Meyer, A., et al., Stabilization of T4 bacteriophage at acidic and basic pH by adsorption on paper. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017. 160: p. 169-176.
107. Drab, M., Phage aggregation–dispersion by Ions: striving beyond antibacterial therapy. *Trends in Biotechnology*, 2018. 36(9): p. 875-881.
108. Bone, S., et al., Physisorption and chemisorption of T4 bacteriophages on amino functionalized silica particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018. 532: p. 68-76.
109. Choi, I., et al., Polycaprolactone film functionalized with bacteriophage T4 promotes antibacterial activity of food packaging toward *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 2021. 346: p. 128883.
110. Jabrane, T., M. Dubé, and P. Mangin. Bacteriophage immobilization on paper surface: effect of cationic pre coat-layer. 2009.
111. Nail, S.L., et al., Fundamentals of Freeze-Drying, in *Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals*, S.L. Nail and M.J. Akers, Editors. 2002, Springer US: New York, NY. p. 281-360.
112. Zheng, H., Devitrification of lyoprotectants: A critical determinant for bacteriophages inactivation in freeze-drying and storage. *Food Res Int*, 2023. 173(Pt 1): p. 113307.
113. Dini, C. and P.J. de Urraza, Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage. *Cryobiology*, 2013. 66(3): p. 339-42.
114. Zierdt, C.H., Stabilities of lyophilized *Staphylococcus aureus* typing bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988. 54(10): p. 2590.
115. Śliwka, P., et al., Freeze-Drying of Encapsulated Bacteriophage T4 to Obtain Shelf-Stable Dry Preparations for Oral Application. *Pharmaceutics*, 2023. 15(12).
116. Borges Sebastião, I., T.D. Robinson, and A. Alexeenko, Atmospheric Spray Freeze-Drying: Numerical Modeling and Comparison With Experimental Measurements. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017. 106(1): p. 183-192.
117. Ishwarya, S.P., C. Anandharamakrishnan, and A.G.F. Stapley, Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends in Food Science & Technology*, 2015. 41(2): p. 161-181.

118. Wang, Z.L., et al., Powder formation by atmospheric spray-freeze-drying. *Powder Technology*, 2006. 170(1): p. 45-52.
119. Sampath, K., et al., Experimental analysis of convective drying of paper and board. *Drying Technology*, 2024. 42(5): p. 880-895.
120. Puapermpoonsiri, U., S.J. Ford, and C.F. van der Walle, Stabilization of bacteriophage during freeze drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. 389(1): p. 168-175.
121. Zhang, Y., et al., Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018. 542(1): p. 1-7.
122. Alvarez-Gonzalez, E., et al., Bioprocessing of bacteriophages via rapid drying onto microcrystals. *Biotechnology Progress*, 2012. 28(2): p. 540-548.
123. Leung, S.S., et al., Production of Inhalation Phage Powders Using Spray Freeze Drying and Spray Drying Techniques for Treatment of Respiratory Infections. *Pharm Res*, 2016. 33(6): p. 1486-96.
124. Carrigy, N.B., et al., Trileucine and pullulan improve anti-Campylobacter bacteriophage stability in engineered spray-dried microparticles. *Annals of Biomedical Engineering*, 2020. 48(4): p. 1169-1180.
125. Malik, D.J., Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy. *Current Issues Molecular Biology*, 2021. 40: p. 303-316.
126. Jończyk, E., et al., The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica*, 2011. 56(3): p. 191-200.
127. Vandenheuvel, D., et al., Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014. 472(1-2): p. 202-5.
128. Leung, S.S.Y., et al., Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017. 521(1-2): p. 141-149.
129. Li, M., et al., Phage cocktail powder for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021. 596: p. 120200.
130. Chang, R.Y.K., et al., Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions. *Int J Pharm*, 2019. 560: p. 11-18.
131. Fu, Y., et al., Delivery systems of antimicrobial compounds to food. *Trends in Food Science & Technology*, 2016. 57: p. 165-177.
132. Kim, Y., et al., Bio-based antimicrobial compositions and sensing technologies to improve food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023. 79: p. 102871.

133. Raven, P.H., R.F. Evert, and S.E. Eichhorn, *Biology of plants*. Eighth edition. ed. 2013, New York: W.H. Freeman.
134. Karakelle, B., et al., Effect of process conditions and amylose/amylopectin ratio on the pasting behavior of maize starch: A modeling approach. *Journal of Cereal Science*, 2020. 94: p. 102998.
135. Cano, A., et al., Effect of amylose:amylopectin ratio and rice bran addition on starch films properties. *Carbohydrate polymers*, 2014. 111: p. 543-55.
136. Tako, M., et al., *The Principles of Starch Gelatinization and Retrogradation*. Food and Nutrition Sciences, 2014. 05(03): p. 280-291.
137. Biliaderis, C.G., The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1991. 69(1): p. 60-78.
138. Reddy, N. and Y. Yang, Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 2010. 118(3): p. 702-711.
139. Menzel, C., et al., Molecular structure of citric acid cross-linked starch films. *Carbohydrate Polymers*, 2013. 96(1): p. 270-276.
140. Olsson, E., et al., Influence of citric acid and curing on moisture sorption, diffusion and permeability of starch films. *Carbohydrate Polymers*, 2013. 94(2): p. 765-772.
141. Sharma, M., et al., A review on cationic starch and nanocellulose as paper coating components. *International journal of biological macromolecules*, 2020. 162: p. 578-598.
142. Vaezi, K., G. Asadpour, and S.H. Sharifi, Bio nanocomposites based on cationic starch reinforced with montmorillonite and cellulose nanocrystals: Fundamental properties and biodegradability study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. 146: p. 374-386.
143. Şen, F., et al., Antimicrobial agent-free hybrid cationic starch/sodium alginate polyelectrolyte films for food packaging materials. *Carbohydrate Polymers*, 2017. 170: p. 264-270.
144. Ridley, B.L., M.A. O'Neill, and D. Mohnen, Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 2001. 57(6): p. 929-967.
145. Mellinas, C., et al., Recent Trends in the Use of Pectin from Agro-Waste Residues as a Natural-Based Biopolymer for Food Packaging Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 2020. 13(3): p. 673.
146. Grant, G.T., et al., Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 1973. 32(1): p. 195-198.
147. Han, W., et al., Mathematical model of Ca²⁺ concentration, pH, pectin concentration and soluble solids (sucrose) on the gelation of low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 2017. 66: p. 37-48.

148. Lara-Espinoza, C., et al., Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2018. 23(4): p. 942.
149. Makaremi, M., et al., Safely Dissolvable and Healable Active Packaging Films Based on Alginate and Pectin. *Polymers*, 2019. 11(10): p. 1594.
150. Nisar, T., et al., Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. 106: p. 670-680.
151. Lei, Y., et al., Investigation of the structural and physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of pectin-konjac glucomannan composite edible films incorporated with tea polyphenol. *Food Hydrocolloids*, 2019. 94: p. 128-135.
152. Chiarappa, G., et al., Mathematical modeling of L-(+)-ascorbic acid delivery from pectin films (packaging) to agar hydrogels (food). *Journal of Food Engineering*, 2018. 234: p. 73-81.
153. Zare-Akbari, Z., et al., PH-sensitive bionanocomposite hydrogel beads based on carboxymethyl cellulose/ZnO nanoparticle as drug carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016. 93: p. 1317-1327.
154. Li, X., et al., Characterization and antibacterial activity of edible films based on carboxymethyl cellulose, *Dioscorea opposita* mucilage, glycerol and ZnO nanoparticles. *Food Chemistry*, 2021. 349: p. 129208.
155. Roy, S. and J.-W. Rhim, Carboxymethyl cellulose-based antioxidant and antimicrobial active packaging film incorporated with curcumin and zinc oxide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. 148: p. 666-676.
156. Synytsya, A., et al., Cell Wall Polysaccharides of Marine Algae, in *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, S.-K. Kim, Editor. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 543-590.
157. Clementi, F., Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1997. 17(4): p. 327-361.
158. Francis, R., S. Sasikumar, and G.P. Gopalan, Synthesis, Structure, and Properties of Biopolymers (Natural and Synthetic), in *Polymer Composites*. 2013. p. 11-107.
159. Gamini, A., et al., Gelation mechanism of ionic polysaccharides. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 1990. 39(1): p. 143-154.
160. Rojas-Graü, M.A., M.S. Tapia, and O. Martín-Belloso, Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. *LWT - Food Science and Technology*, 2008. 41(1): p. 139-147.
161. Singh, P., P. Baisthakur, and O.S. Yemul, Synthesis, characterization and application of crosslinked alginate as green packaging material. *Heliyon*, 2020. 6(1): p. e03026-e03026.

162. Alves, D., et al., Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Research International*, 2020. 128: p. 108791.
163. Senturk Parreidt, T., K. Müller, and M. Schmid, Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2018. 7(10): p. 170.
164. Kontominas, M.G., Use of Alginates as Food Packaging Materials. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2020. 9(10): p. 1440.
165. Pereira, L., Carrageenans : Sources and Extraction Methods, Molecular Structure, Bioactive Properties and Health Effects. *Environmental Science, Engineering and Technology*. 2016, Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc.
166. Tavassoli-Kafrani, E., H. Shekarchizadeh, and M. Masoudpour-Behabadi, Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 2016. 137: p. 360-374.
167. Lin, Y., et al., Fabrication and Characterization of Carrageenan/ZnO/Chitosan Composite Films. *Langmuir*, 2023. 39(22): p. 7930-7938.
168. El-Fawal, G., Preparation, characterization and antibacterial activity of biodegradable films prepared from carrageenan. *J Food Sci Technol*, 2014. 51(9): p. 2234-9.
169. Zhou, F., et al., Preparation and Characterization of Biodegradable κ -Carrageenan Based Anti-Bacterial Film Functionalized with Wells-Dawson Polyoxometalate. *Foods*, 2022. 11(4).
170. Martiny, T.R., et al., Bio-Based Active Packaging: Carrageenan Film with Olive Leaf Extract for Lamb Meat Preservation. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2020. 9(12): p. 1759.
171. Jiménez-Gómez, C.P. and J.A. Cecilia, Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules*, 2020. 25(17).
172. Egorov, A.R., et al., Chitosan and Its Derivatives: Preparation and Antibacterial Properties. *Materials (Basel)*, 2023. 16(18).
173. Annu, et al., Chitin and Chitosan: History, Composition and Properties, in *Chitosan*. 2017. p. 1-24.
174. Islam, S., M.A.R. Bhuiyan, and M.N. Islam, Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 2017. 25(3): p. 854-866.
175. Aranaz, I., et al., Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers (Basel)*, 2021. 13(19).

176. Kong, M., et al., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 2010. 144(1): p. 51-63.
177. Priyadarshi, R. and J.-W. Rhim, Chitosan-based biodegradable functional films for food packaging applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2020. 62.
178. Fonseca-García, A., E.J. Jiménez-Regalado, and R.Y. Aguirre-Loredo, Preparation of a novel biodegradable packaging film based on corn starch-chitosan and poloxamers. *Carbohydr Polym*, 2021. 251: p. 117009.
179. Leceta, I., P. Guerrero, and K. de la Caba, Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 2013. 93(1): p. 339-346.
180. Pasini Cabello, S.D., et al., Influence of plasticizers in pectin films: Microstructural changes. *Materials Chemistry and Physics*, 2015. 162: p. 491-497.
181. Sanyang, M.L., et al., Effect of plasticizer type and concentration on physical properties of biodegradable films based on sugar palm (*arenga pinnata*) starch for food packaging. *Journal of Food Science and Technology*, 2016. 53(1): p. 326-336.
182. Ruan, C., et al., Preparation and antioxidant activity of sodium alginate and carboxymethyl cellulose edible films with epigallocatechin gallate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. 134: p. 1038-1044.
183. Seligra, P.G., et al., Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*, 2016. 138: p. 66-74.
184. Ortega-Toro, R., et al., Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids*, 2014. 38: p. 66-75.
185. Muscat, D., et al., The physicochemical characteristics and hydrophobicity of high amylose starch–glycerol films in the presence of three natural waxes. *Journal of Food Engineering*, 2013. 119(2): p. 205-219.
186. Jabrane, T., *Méthodologies de fabrication de papier bioactif*. 2015, Université du Québec à Trois Rivières.
187. Hossain, K.M.Z., et al., Cationic surfactants as a non-covalent linker for oxidised cellulose nanofibrils and starch-based hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 2020. 233: p. 115816.
188. Tajik, B., et al., The study of polymer–surfactant interaction in catanionic surfactant mixtures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2013. 436: p. 890-897.
189. Khan, S., et al., Berry wax improves the physico-mechanical, thermal, water barrier properties and biodegradable potential of chitosan food packaging film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024. 261.

190. Lu, H., et al., Polyolefin Wax Modification Improved Characteristics of Nutrient Release from Biopolymer-Coated Phosphorus Fertilizers. *ACS Omega*, 2019. 4(23): p. 20402-20409.
191. Oliveira Filho, J.G.d., et al., Bio-nanocomposite edible coatings based on arrowroot starch/cellulose nanocrystals/carnauba wax nanoemulsion containing essential oils to preserve quality and improve shelf life of strawberry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022. 219: p. 812-823.
192. Nurul Syahida, S., et al., Effects of palm wax on the physical, mechanical and water barrier properties of fish gelatin films for food packaging application. *Food Packaging and Shelf Life*, 2020. 23: p. 100437.
193. Forsman, N., et al., Open coating with natural wax particles enables scalable, non-toxic hydrophobation of cellulose-based textiles. *Carbohydrate Polymers*, 2020. 227: p. 115363.
194. Koch, K. and W. Barthlott, Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2009. 367(1893): p. 1487-1509.
195. Samyn, P. and V.K. Rastogi, Stabilization of an Aqueous Bio-Based Wax Nano-Emulsion through Encapsulation. *Nanomaterials (Basel)*, 2022. 12(23).
196. Ek, M., G.r. Gellerstedt, and G. Henriksson, Pulp and paper chemistry and technology. Volume 2, Pulping chemistry and technology. 2009, Walter de Gruyter: Berlin.
197. Utracki, L.A. and L. Rapra Technology, Clay-containing Polymeric Nanocomposites. 2004, Shrewsbury: Rapra Technology Ltd.
198. Sen, T.K., Clay Minerals : Properties, Occurrence, and Uses. *Geology and Mineralogy Research Developments*. 2017, Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc.
199. Müller, C.M.O., J.B. Laurindo, and F. Yamashita, Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. *Industrial Crops and Products*, 2011. 33(3): p. 605-610.
200. Iamareerat, B., et al., Reinforced cassava starch based edible film incorporated with essential oil and sodium bentonite nanoclay as food packaging material. *Journal of food science and technology*, 2018. 55(5): p. 1953-1959.
201. Kwaśniewska, A., et al., The Influence of Kaolin Clay on the Mechanical Properties and Structure of Thermoplastic Starch Films. *Polymers*, 2020. 12(1).
202. Yu, L., et al., Preparation of zeolite-A/chitosan hybrid composites and their bioactivities and antimicrobial activities. *Materials Science and Engineering: C*, 2013. 33(7): p. 3652-3660.

203. Eroglu, N., M. Emekci, and C.G. Athanassiou, Applications of natural zeolites on agriculture and food production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017. 97(11): p. 3487-3499.
204. Azizi-Lalabadi, M., et al., Active packaging for Salmon stored at refrigerator with Polypropylene nanocomposites containing 4A zeolite, ZnO nanoparticles, and green tea extract. *Food science & nutrition*, 2020. 8(12): p. 6445-6456.
205. Chamberlain, D. and M.J. Kirwan, Paper and paperboard – raw materials, processing and properties, in *Handbook of Paper and Paperboard Packaging Technology*. 2013. p. 1-49.
206. Sangl, R., et al., Coating Colors – Components, Make Down, and Properties, in *Handbook of Paper and Board*. 2013. p. 235-290.
207. Bajpai, P., Biermann's Handbook of Pulp and Paper. Volume 1, Raw Material and Pulp Making. Third editon. ed. 2018, Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
208. Chen, G., Impingement and Through Air Drying of Paper. *Drying Technology*, 1995. 13(1-2): p. 479-480.
209. Brahic, M.H.A.S.A., *Sciences de la terre et de l'univers*. Vol. 1 vol. 1999.
210. Ek, M., G.r. Gellerstedt, and G. Henriksson, Pulp and paper chemistry and technology. Volume 3, Paper chemistry and technology. 2009, Walter de Gruyter.
211. Hashemi, S.J., S. Sidwall, and W.J.M. Douglas, PAPER DRYING: A STRATEGY FOR HIGHER MACHINE SPEED. II. IMPINGEMENT AIR DRYING FOR HYBRID DRYER SECTIONS. *Drying Technology*, 2001. 19(10): p. 2509-2530.
212. Valmet. Valmet impingement drying. 2024; Available from: <https://www.valmet.com/board-and-paper/board-and-paper-machines/impingement-drying/>.
213. Andritz. Pulp & paper. 2024; Available from: <https://www.andritz.com/pulp-and-paper-en/paper-production>.
214. Martín, E., I. Viéitez, and F. Varas, A predictive model for the industrial air-impingement drying of resin impregnated paper. *Applied Thermal Engineering*, 2021. 199.
215. Mujumdar, A.S., *Handbook of industrial drying*. Fourth edition ed. 2015, Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group.
216. Kuang, H.D., et al., Pilot scale investigation of infrared drying of paper. *Tappi journal*, 1995. 78(7): p. 129-137.
217. Papermaking, Part 2 Drying, ed. P.S.a. Technology. 2005: Finnish Paper Engineers Association.
218. Karlsson, M., Drying of Paper – An Overview, the State of Paper Drying Knowledge. 2001. 709-736.

219. TAPPI, Grammage of paper and paperboard (weight per unit area), Test Method TAPPI/ANSI T 410 om-23, T.A.o.t.P.a.P. Industry, Editor. 2023.
220. CIE, CIE 015:2018, Colorimetry. Vol. 44. 2018. 674-675.
221. Choudhury, A. and I. Textile, Principles of colour appearance and measurement. Volume 1, Object appearance, colour perception and instrumental measurement. 2014, Woodhead Pub.: Cambridge, U.K.
222. Basiak, E., A. Lenart, and F. Debeaufort, How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. *Polymers*, 2018. 10(4).