UNIVERSITE DE MONTREAL

# ELABORATION DE TECHNIQUES DE SEPARATION POUR DES BIOPOLYMERES D'ORIGINE BACTERIENNE : LES ACIDES POLY-ß-HYDROXYALCANOIQUES

par

Eric BERGER

DEPARTEMENT DE GENIE CHIMIQUE

ECOLE POLYTECHNIQUE

MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION

DU GRADE DE MAITRE EN SCIENCES APPLIQUEES (M.Sc.A)

Mars 1990

c Eric Berger, 1990

ıl Library
ada

Bibliothèque nationale
du Canada

an Theses Service

Service des thèses canadiennes

Canada
ı

author has granted an irrevocable non-
ısive licence allowing the National Library
ınada to reproduce, loan, distribute or sell
es of his/her thesis by any means and in
orm or format, making this thesis available
terested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

author retains ownership of the copyright
is/her thesis. Neither the thesis nor
tantial extracts from it may be printed or
wise reproduced without his/her per-
ion.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-58106-9

nadä

UNIVERSITE DE MONTREAL

ECOLE POLYTECHNIQUE

Ce mémoire intitulé:

ELABORATION DE TECHNIQUES DE SEPARATION

POUR DES BIOPOLYMERES D'ORIGINE BACTERIENNE:

LES ACIDES POLY-ß-HYDROXYALCANOIQUES

Présenté par : Eric Berger

en vue de l'obtention du grade de : M.Sc.A.

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de:

M. Pierre Lafleur Ph.D., président-rapporteur

M. Robert Marchessault Ph.D.

M. Bruce Ramsay Ph.D., co-directeur de recherche

A Carole

A la mémoire de mon grand-père

## SOMMAIRE

Les travaux reportés dans ce mémoire sont consacrés à l'élaboration de plusieurs techniques de séparation des poly-ß-hydroxyalcanoates.

Les poly-ß-hydroxyalcanoates (PHA) sont des polymères biodégradables d'intérêt économique, accumulée intracellulairement par de nombreux microorganismes. Cette étude porte sur le plus commun de ces polymères, l'homopolymère de l'acide 3-hydroxybutyrique aussi appelé PHB.

Les efficacités de différents solvants chlorés (chlorure de méthylène, chloroforme, 1,2-dichloroéthane) pour des extractions de PHB à partir de biomasse d'Alcaligenes eutrophus contenant 60 % de PHB en poids sec ainsi que l'influence de différents paramètres ont été évaluées . Alors que la pureté du produit isolé est toujours supérieure à 90 % et n'est guère influencée par ces paramètres, le rendement de séparation augmente avec la température et le rapport solvant/biomasse. Le prétraitement à l'acétone améliore de 1 à 3 % la pureté du produit et augmente de plus de 10 % le rendement de la séparation. Lors d'extractions au reflux du solvant, on observe 67 % de diminution du poids moléculaire après 3 h d'extraction dans le 1,2-dichloréthane au reflux. Cette dégradation par

libération de petits oligomères en bout de chaîne suit une cinétique d'ordre 0 par rapport au temps de mise en contact.

Des solutions d'hypochlorite furent utilisées pour digérer la biomasse permettant une séparation des granules de PHB. Pour éviter la coupure des chaînes de PHB qui constitue l'inconvénient reconnu de la méthode, la température et le temps de digestion ont été diminués et ajustés tout comme le pH de la solution alcaline d'hypochlorite. Du PHB d'une pureté supérieure à 90 % , présentant un poids moléculaire de 800 000 ( 75 % du poids moléculaire "in vivo") et un indice de polydispersité de 4.5 a pu être isolé de cette manière.

Des détergents ne présentant qu'un effet délétère minimal sur le biopolymère, ont été utilisés pour la digestion des composants cellulaires autres que le PHB. Le poids moléculaire après séparation était équivalent à celui du matériel original avec une pureté légèrement inférieure à 90 % . Différents détergents conventionnels comme Tide$^{R}$, Triton X-100$^{R}$, ou le sodium dodecyl sulfate ont été testés. En combinant les digestions avec détergent et hypochlorite, une nouvelle technique permettant d'isoler avec un rendement supérieur à 90 % , un polymère pur à 96 % présentant un poids moléculaire représentant 90 % de la valeur initiale.

**ABSTRACT**

This thesis was devoted to the development of separation techniques for poly-ß-hydroxyalkanoic acids.

Poly-ß-hydroxyalkanoic acids (PHA) are biodegradable polyester thermoplastic of economic value, accumulated intracellularly by many microorganisms. The studies were specifically made on the most common of these polymers, poly-ß-hydroxybutyrate homopolymer (PHB).

The effectiveness of using different chlorinated solvents to extract PHA from Alcaligenes eutrophus cells containing 60 % dry weight PHA as well as the influence of different parameters were compared. The influence of parameters as temperature, ratio solvent/biomass and the efficiency of a treatment by acetone prior to the extraction have been investigated. PHB purity was always above 90 % , while extraction yield increased with extraction temperature and the quantity of solvent involved in the separation. Preatreatment consisting of a washing by acetone increased separation yield and the purity of recovered PHB. Extractions by refluxing solvents gave 67 % decrease of polymer molecular weight after 3 h extraction in refluxing 1,2-dichloroethane. Degradation involving a mechanism of release of small oligomers at the chain-ends, followed zero order kinetics .

Sodium hypochlorite solutions were used to digest bacterial biomass allowing the separation of PHA granules. To avoid breakdown of PHA, main drawback of this technique, the digestion time and temperature decreased and the pH of the alkaline hypochlorite solution was lowered. PHA of high purity, a weight average molecular weight of 800 000 (75 % of the "in vivo" molecular weight) and a polydispersity index of 4.5 were obtained in this manner.

Detergents, that had little deleterious effect on PHA molecular weight were also used to digest non-PHA cell components. The molecular weight after separation by this method was comparable to the original material. Different commercial detergents as Tide$^R$, Triton X-100$^R$, and sodium dodecyl sulphate have been tested. By combining detergent and hypochlorite digestion, a new method was developed that allowed the recovery of up to 90 % of the original PHA. A purity of 96 % was achieved 90 % of the original molecular weight was retained.

**REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier en premier tous les membres de l'équipe de recherche à laquelle j'ai collaboré au cours des 2 dernières années et principalement mon directeur de recherches le Docteur Bruce RAMSAY et mon co-directeur, le Professeur Claude CHAVARIE. J'ai eu un grand plaisir à participer à l'expansion du groupe aujourd'hui riche d'une dizaine de personnes et je souhaite bonne réussite à ceux qui me succèderont au sein de cette équipe.

J'adresse également des remerciements au Conseil Régional Rhône-Alpes et à la société Roussel-Uclaf pour les bourses d'études, qu'ils m'ont respectivement alloués.

## TABLE DES MATIERES

**SOMMAIRE** ..... v

**ABSTRACT** ..... vii

**REMERCIEMENTS** ..... ix

**LISTE DES TABLEAUX** ..... xv

**LISTE DES FIGURES** ..... xviii

**LISTE DES ANNEXES** ..... xx

**LISTE DES SYMBOLES** ..... xxi

**CHAPITRE I: INTRODUCTION** ..... 1

**CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE** ..... 4

**II.1. Historique des PHA** ..... 4

**II.2. Présentation du produit** ..... 5

**II.3. Propriétés du produit** ..... 6

**II.4. Voies métaboliques menant à la formation du PHA** ..... 9

II.4.1. Synthèse de PHB à partir d'acétyl-CoA ... 9

II.4.2. Synthèse de copolymères de PHA ..... 11

II.4.3. Microorganismes synthétisant des copolymères PHA ..... 12

**II.5. Techniques de séparation répertoriées ..... 12**

II.5.1. Introduction ..... 12

II.5.2. Extractions par solvants ..... 13

II.5.3. Digestion chimique à l'hypochlorite de sodium ..... 16

II.5.4. Séparation par digestion enzymatique .... 18

II.5.5. Systèmes aqueux à 2 phases ..... 19

II.5.6. Autres techniques développées ..... 21

**II.6. Séparations mettant en jeu surfactants et détergents ..... 24**

II.6.1. Définitions ..... 24

II.6.2. Propriétés en phase aqueuse ..... 25

II.6.3. Action des détergents sur les constituants cellulaires ..... 27

**CHAPITRE III: MATERIELS ET METHODES**

**III.1. Fermentation d'Alcaligenes eutrophus en discontinu alimenté ..... 32**

**III.2. Caractérisation de la biomasse et du PHB isolé 32**

III.2.1. Contenu en PHB de la biomasse et pureté des échantillons de PHB ..... 32

III.2.2. Détermination du poids moléculaire ..... 35

III.2.3. Analyse sur la biomasse issue de la fermentation d'A. eutrophus ..... 39

**III.3. Séparation par extraction à l'aide de solvants chlorés** ..... 40

III.3.1. Extraction à température ambiante ..... 41

III.3.2. Extraction à chaud ..... 42

III.3.3. Extraction à chaud avec prétraitement à l'acétone ..... 43

III.3.4. Suivi de l'évolution du PHB dans les solvants à haute température ..... 43

**III.4. Séparation par digestion à l'hypochlorite de sodium** ..... 45

III.4.1. Préparation des solutions d'hypochlorite 45

III.4.2. Procédure de digestion de la biomasse .. 46

**III.5. Séparation mettant en jeu un surfactant** ..... 47

III.5.1. Séparation du PHB par le détergent "Tide" ..... 47

III.5.2. Séparation du PHB par action conjuguée d'un détergent et d'hypochlorite ..... 48

III.5.3. Mesures de viscosité sur les suspensions après séparation ..... 49

III.5.4. Séparation mettant en jeu un détergent et de l'ADNase ..... 49

**CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSIONS** ..... 51

**IV.1. Production de PHB témoin par fermentation en discontinu alimenté d'A. eutrophus** ..... 51

**IV.2. Extractions par solvants** ..... 56

IV.2.1. A température ambiante ..... 56

IV.2.2. A reflux du solvant (sans prétraitement) 57

IV.2.3. Extraction à reflux (avec prétraitement) 58

IV.2.4. Influence du volume de solvant sur le rendement de la séparation ..... 62

IV.2.5. Destination du PHB non extrait ..... 62

IV.2.6. Evolution du PHB en milieu solvant ..... 65

IV.2.7. Discussions ..... 72

**IV.3. Digestion à l'hypochlorite** ..... 76

IV.3.1. Optimisation du pH ..... 76

IV.3.2. Evaluation du temps de digestion ..... 78

IV.3.3. Détermination de la concentration limite en biomasse ..... 80

IV.3.4. Influence de la température de séparation 83

IV.3.5. Etude de l'influence de la concentration en hypochlorite et du temps de digestion sur les caractéristiques du PHB isolé ... 87

IV.3.6. Relation liant pureté et poids moléculaire ..... 92

IV.3.7. Discussions ..... 94

**IV.4. Séparation mettant en jeu un détergent .....** 97

IV.4.1. Séparation du PHB par le détergent "Tide" ..... 97

IV.4.2. Séparation du PHB par action combinée de détergent et d'hypochlorite ..... 101

IV.4.3. Tests sur d'autres surfactants commerciaux ..... 111

IV.4.4. Séparation mettant en jeu un détergent et l'ADNase ..... 118

IV.4.5. Discussions ..... 121

**CHAPITRE V: CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS** ..... 123

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ..... 128

**ANNEXES** ..... 136

## LISTE DES TABLEAUX


II.2. Propriétés physiques du PHB et de l'homopolymère polypropylène ..... 8

IV.2.1. Caractéristiques des échantillons de PHB isolés par extraction à température ambiante 57

IV.2.2. Caractéristiques du PHB séparé par extraction au reflux du solvant ..... 58

IV.2.3. Caractéristiques du PHB isolé par extraction dans des solvants au reflux après traitement à l'acétone ..... 60

IV.2.5. Bilan de masse sur le PHB lors d'une extraction au solvant ..... 64

IV.2.6.2. Suivi du PHB en milieu solvant ..... 67

IV.3.1. Rendement de séparation et poids moléculaire du PHB isolé en fonction du pH ..... 78

IV.3.2. Optimisation du temps de digestion dans l'hypochlorite ..... 79

IV.3.3. Détermination de la concentration limite en biomasse ..... 83

IV.3.4. Caractéristiques du PHB obtenu pour des séparations dans l'hypochlorite à 0°C ..... 84

IV.3.5a. Variation du poids moléculaire avec le temps de digestion et la concentration en hypochlorite ..... 90

IV.3.5b. Taux de diminution du poids moléculaire en fonction des concentrations de biomasse et d'hypochlorite engagées ..... 91

IV.4.1a. Séparations à différentes concentrations de détergent "Tide" ..... 98

IV.4.1b. Variation des caractéristiques en fonction du pH de séparation ..... 99

IV.4.1. Séparations de PHB par le détergent "Tide" 100

IV.4.2.1a Effet du temps de traitement pour des séparations avec le détergent "Tide" ..... 102

IV.4.2.1b Séparation par détergent "Tide" puis hypochlorite ..... 104

IV.4.2.2. Séparation de PHB par traitement à l'hypochlorite suivi d'un traitement par le détergent "Tide" ..... 106

IV.4.2.3. Pureté du biopolymère après le seul traitement au détergent "Tide" ..... 109

IV.4.3. Séparations à l'aide de différents détergents commerciaux ..... 113

IV.4.3a. Proportion de biopolymère dissout lors du traitement au détergent ..... 116

IV.4.3b. Viscosités des milieux de digestion avant et après séparation au détergent ..... 117

IV.4.4. Viscosités des milieux de digestion avec ou sans traitement à l'ADNase ..... 120

V.1. Résultats comparatifs des différents types de séparation ..... 124

## LISTE DES FIGURES


IV.1.1. Concentration en glucose et en biomasse en fonction du temps de fermentation ..... 52

IV.1.2. Concentration en ammonium et en protéines en fonction du temps de fermentation ..... 53

IV.1.3. Concentration en PHB et poids moléculaire en fonction du temps de fermentation ..... 54

IV.2.3. Variation du poids moléculaire en fonction du temps d'extraction dans des solvants au reflux ..... 61

IV.2.4. Taux de récupération du PHB en fonction du volume de solvant d'extraction ..... 63

IV.2.6.3a Poids moléculaire en foncttion du temps de mise en contact ..... 69

IV.2.6.3b Rapport des surfaces d'oligomères et de PHB en fonction du temps de mise en contact .... 70

IV.3.1. Optimisation du pH pour des digestions dans l'hypochlorite ..... 77

IV.3.3. Pureté du PHB isolé en fonction de la quantité de biomasse traitée ..... 81

IV.3.4a. Pureté et poids moléculaire en fonction du temps de digestion à basse température ..... 85

IV.3.4b. Efficacité de séparation pour des digestions à température ambiante et à 0°C ..... 86

IV.3.5. Influence de la concentration en hypochlorite et du temps de digestion sur le poids moléculaire ..... 89

IV.3.6. Poids moléculaire en fonction de la pureté pour des séparations avec hypochlorite ..... 93

IV.4.2.2. Efficacité de différents types de séparation avec détergent ..... 107

IV.4.3.4. Pureté du PHB isolé en fonction du rapport biomasse/détergent ..... 119

III.4.2. Concentration en hydroxybutyrique en fonction du rapport (acide hydroxybutyrique/standard interne) ..... 147

III.5.4. Calibration du viscosimètre "Brookfield" par des huiles standards ..... 148

## LISTE DES ANNEXES

**ANNEXE 1:** Matériels et méthodes utilisées lors de la fermentation d'Alcaligenes eutrophus en discontinu alimenté ..... 136

**ANNEXE 2:** Courbe de calibration donnant le poids moléculaire en fonction du temps de rétention pour les mesures par chromatographie à perméation de gel ..... 146

**ANNEXE 3:** Figure III.4.2: Concentration en acide hydroxybutyrique en fonction du rapport (acide hydroxybutyrique/standard interne) ... 147

**ANNEXE 4:** Figure III.5.4: Calibration du viscosimètre "Brookfield" par des huiles standards ..... 148

## LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

I.P = indice de polydispersité (mesure la largeur de la distribution de poids moléculaire).

P.M = poids moléculaire moyen en masse (g/mole)

P.M.R = poids moléculaire résiduel (%).

D.P = degré de polymérisation.

PHB = taux de PHB récupéré (%)

$n$ = viscosité (cPo).

$n_r$ = viscosité relative.

$n_{sp}$ = viscosité spécifique.

$n_1$ = viscosité du solvant (cPo).

$n_2$ = viscosité du soluté dans le solvant (cPo).

$t_1$ = temps d'écoulement du solvant dans le viscosimètre (s).

$t_2$ = temps d'écoulement du soluté dans le solvant (s).

C = concentration en soluté (%).

K,a = paramètres de l'équation de Mark-Houwink.

# CHAPITRE I : INTRODUCTION

La protection de l'environnement et le maintien de notre bien-être justifient aujourd'hui le développement et la mise en marché de produits nouveaux. Dans le domaine des biens de consommation jetables, on s'oriente vers le remplacement des matériaux usuels par d'autres, qui ont des propriétés semblables, mais peuvent être naturellement dégradés par les différentes composantes de notre environnement.

De fait, dans le domaine des polymères, des recherches visant à découvrir de tels composés dits biodégradables, ont été réalisés depuis les années 70 par quelques grandes sociétés telles Imperial Chemical Industries (I.C.I) ou Solvay. Ces travaux ont été axés sur une famille de composés: les poly-ß-hydroxyalcanoates (PHA). Découvert en 1920 puis resté longtemps une simple curiosité scientifique, le PHA est un produit d'accumulation intracellulaire de beaucoup de bactéries: il constitue en effet une source de réserve en carbone et en énergie lorsque la croissance du microorganisme est limitée par un substrat autre qu'une source carbonée. Du point de vue chimique, les PHA sont des polyesters thermoplastiques biodégradables. Les recherches entreprises par I.C.I ont

abouti à l'élaboration d'un procédé de fabrication par fermentation à grande échelle d'un polymère biodégradable appelé "BIOPOL", qui est mis en marché sous forme de bouteilles (2).

Un procédé de fabrication à échelle industrielle implique trois étapes avec la production du biopolymère par fermentation, sa séparation des autres constituants cellulaires et sa mise en forme pour l'élaboration de produits finis ou semi-finis.

Cette étude porte sur la deuxième phase du procédé et consiste à élaborer une méthode de séparation du biopolymère. L'objectif n'est pas de mettre au point une méthode universelle, mais plutôt d'élaborer et de tester différentes procédures de manière à définir les avantages et les limites de chacune.

Trois types de séparation seront examinés:

1. L'extraction directe ou après pré-traitement du polymère par des solvants chlorés.
2. La digestion par des solutions d'hypochlorite de sodium des constituants cellulaires autres que le PHA.
3. Le traitement de la biomasse par différents détergents de manière à éliminer les constituants cellulaires en laissant le PHA en suspension.

L'évaluation des différentes procédures est guidée par le souci d'isoler, avec un bon rendement, un biopolymère très pur présentant un poids moléculaire suffisant, qui le rend utilisable à la plupart des applications.

# CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## II.1. Historique des PHA.

Dans les années 1920, LEMOIGNE (1), un scientifique français observa des inclusions hydrophobes dans certaines bactéries. Il assuma d'abord que celles-ci étaient de nature lipidique, mais il put établir, après les avoir isolées, que ces inclusions étaient en fait des granules constitués d'une macromolécule formée par polymérisation d'un acide organique: l'acide ß-hydroxybutyrique. Le nom de poly ß-hydroxybutyrate (PHB) fut donné à ce polymère, qui devint le membre prédominant de la famille des poly ß-hydroxy-alcanoates (PHA).

Demeuré longtemps une simple curiosité scientifique, le PHB connut un premier essor dans les années 50, lorsqu'une compagnie américaine W&R GRACE and Co évalua le potentiel économique du produit et entreprit d'élaborer un procédé de fabrication du biopolymère, qui n'aboutit jamais (2).

Dans les années 70, du fait de la crise pétrolière et d'un désir de chercher de nouvelles sources de production, la société britannique Imperial Chemical Industries (I.C.I)

a mis sur pied un programme de recherches sur les biopolymères et principalement les poly ß-hydroxyalcanoates, qui donna naissance à un procédé de fabrication original, permettant une ouverture sur la grande industrie (3).

## II.2. Présentation du produit.

Le poly ß-hydroxyalcanoate (PHA) est un polyester thermoplastique linéaire dont les monomères sont des ß-hydroxyacides monocarboxyliques de petite taille (4).

Le PHA peut être synthéthisé chimiquement (5), mais il peut être produit plus économiquement par de nombreux microorganismes, qui l'accumulent en grandes quantités dans la mesure où il constitue un produit de stockage en carbone et énergie. L'accumulation du PHA se fait intracellulairement lorsque la croissance des microorganismes est limitée par un élément autre que la source carbonée (6), qui est alors convertie en PHA (7). Par contre, lorsque l'élément limitant est à nouveau fourni au microorganisme, il y a hydrolyse du PHA et utilisation du monomère pour sa croissance (8).

Le PHA peut être accumulé dans des proportions très importantes (9); l'espèce Alcaligenes eutrophus peut l'accumuler jusqu'à des concentrations représentant 90 % de

la biomasse totale en poids sec (10). A l'intérieur de la bactérie, le PHA se trouve sous forme de granules distincts entourés d'une membrane et présente une structure cristalline (11).

Le type de PHA le plus communément produit par les microorganismes est l'homopolymère d'acide 3-hydroxybutyrique, qui présente la structure suivante:

$$H-[-O-CH(CH_3)-CH_2-(CO)-]_n-OH$$

En fonction du microorganisme considéré et de la méthode de séparation utilisée, n peut varier de 500 à 30 000.

### II.3. Propriétés du produit.

Le PHA possède de nombreuses propriétés valorisables dont certaines le distinguent des autres polymères thermoplastiques. Etant produit biologiquement, il présente l'avantage d'être optiquement actif, tous ses monomères présentant la même stéréochimie. Le poly ß-hydroxybutyrate (PHB) ne contient, par exemple, que des 3-hydroxybutyrates de configuration D(-). Ces monomères issus du PHB peuvent être utilisés comme principe actif de certains médicaments contre le diabète (12), ou comme agent de dédoublement pour la production d'autres molécules stéréospécifiques en chimie organique (13); ils sont disponibles après hydrolyse

chimique (13,14) ou enzymatique (15) du PHB.

Le PHA possède des propriétés piézoélectriques (16), c'est-à-dire qu'il a la capacité de produire un potentiel électrique lorsqu'il est soumis à des tensions de cisaillement. L'activité piézoélectrique du PHA est liée à la présence d'un carbone asymétrique associé à un groupement polaire sur la molécule (caractéristique qu'on retrouve sur la plupart des molécules biologiques), et semble imputable à une structure mixte non-cristalline et cristalline, qui est associée au biopolymère pour des températures voisines de la transition vitreuse (17). Ces propriétés pourraient permettre au PHA de trouver certaines utilisations en électronique.

Le PHA est immunologiquement compatible avec les tissus humains. On peut l'utiliser pour la fabrication d'implants, de prothèses ou pour l'élaboration de "vésicules" pouvant contenir un médicament ou un principe actif, ensuite libéré lentement dans l'organisme du receveur lors de la dégradation du PHA. La libération du principe actif se fait alors souvent selon une cinétique d'ordre 0, ou d'ordre 1 pour des doses plus concentrées. Ce système est bien adapté pour les médicaments à libération lente et contrôlée (18,19).

La propriété la plus valorisante démarquant le PHA des

autres thermoplastiques est sa biodégradabilité. Bien que certains polymères photodégradables aient été mis sur le marché, le PHA est le seul polymère totalement biodégradable existant. La dégradation du PHA dans les sols humides se fait en quelques semaines (6 semaines pour une plaque épaisse de 1 mm); ce qui en fait un produit tout désigné pour l'élaboration de produits jetables (3).

Les propriétés physiques du PHA sont assimilables à celles de la plupart des grands thermoplastiques. L'élément principal de la famille des PHA, le poly ß-hydroxybutyrate (ou PHB), présentent des propriétés physiques proches de celles de l'homopolymère polypropylène (16).

**Tableau II.3: Propriétés physiques du PHB et de l'homopolymère polypropylène (16).**

| | PHB | PP |
|---|---|---|
| Point de fusion (C) | 175 | 176 |
| Cristallinité (%) | 80 | 60 |
| Poids moléculaire | 500 000 | 200 000 |
| Tp. de trans. vitreuse (C) | +15 | -10 |
| Module de flexibilité (GPa) | 4 | 1.7 |
| Force de tension (MPa) | 40 | 38 |
| Allongement à la rupture (%) | 6 | 400 |
| Résist. aux U.V | Bonne | Faible |
| Résist. aux solvants. | Faible | Bonne |

La différence la plus importante entre les 2 produits

est l'allongement à la rupture, qui fait du PHB un polymère très cassant. La recherche s'est orientée sur des copolymères, composés d'acide ß-hydroxybutyrique et d'autres composés, qui présentent des allongements à la rupture de l'ordre de 100 à 300 %.

BIOPOL, produit développé par I.C.I, est un copolymère composé d'acide ß-hydroxybutyrique et d'acide ß-hydroxyvalérique; il présente un allongement à la rupture comparable à celui de l'homopolymère polypropylène.

Les propriétés physiques du polymère obtenu dépendent alors du pourcentage d'HV qu'il contient. A faible teneur en HV, le biopolymère présente des propriétés de flexibilité et d'allongement à la rupture voisine de celles du chlorure de polyvinyle (module d'Young élevé, faible résistance à l'impact), mais avec des teneurs en HV voisines de 40 %, on a un produit proche du polyéthylène (faible module d'Young, forte résistance à l'impact).

## II.4. Voies métaboliques menant à la formation du PHA.

### II.4.1. Synthèse de PHB à partir d'acétyl-CoA.

La ß-cétothiolase est l'enzyme-clé pour la production et la dégradation de PHB, car elle est soumise à une

régulation contrôlée par les concentrations des substrats et produits présents. L'enzyme catalyse la condensation de 2 molécules d'acétyl-CoA pour former l'acétoacétyl-CoA, de même que la réaction inverse (hydrolyse de l'acétoacétyl CoA).

L'acétoacétyl-CoA stimule la vitesse de réaction de sa propre synthèse, alors que son hydrolyse est favorisée par la présence d'acétyl-CoA libre (20,21). Une limitation dans les substrats d'une substance non-carbonée entraîne un surplus d'acétyl-CoA.

L'acétoacétyl-CoA produite est réduite stéréospécifiquement par une réductase dont l'activité est intimement liée à un apport de NADH ou de NADPH. Le produit de cette réaction est le D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA, décelé d'abord chez Azotobacter beijerinckii (22), puis chez A. eutrophus (23).

Par contre, pour d'autres espèces comme Rhodospirillum rubrum, du L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA est produit avant d'être racémisé en D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA par des énoyl-CoA hydrases (24). Ces dernières enzymes sont absentes chez A. beijerinckii (25).

La dernière étape de la synthèse consiste à condenser les monomères de D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA à la chaîne de PHB naissante. La réaction est effectuée par une polymérase complexe d'une grande spécificité.

## II.4.2. Synthèse des copolymères de PHA.

L'acide propionique ajoutée au milieu de culture se combine avec le CoA libre pour former du propionyl-CoA. Cette molécule, condensée avec l'acétyl-CoA, produit le valéryl-CoA, qui peut être insérée dans la chaîne de PHA. L'acétyl-CoA peut provenir du pyruvate ou d'autres sources telles que des alcanes ou des acides carboxyliques. Une partie du propionyl-CoA est d'ailleurs décarboxylée en acétyl-CoA. Cette dernière molécule, nécessaire à la production du valéryl-CoA, rend la production d'acétoacétyl-CoA inévitable.

C'est pour cette raison qu'il n'est pas possible de produire du polyhydroxyvalérate homopolymérique au cours des fermentations où il y a ajout d'acide propionique. Différents copolymères de PHA ont été produits à partir d'acide pentanoïque (26), d'acide 5-chloropentanoïque (27), d'acide 4-hydroxybutyrique (28) et de 1,4 butanediol (29). Dans chacun des cas, les monomères sont polymérisés dans un ordre aléatoire.

### II.4.3. Microorganismes synthétisant des copolymères de PHA.

Une grande variété de microorganismes peuvent accumuler du PHB (homopolymère), mais il semble que toute bactérie, détenant ce potentiel, peut aussi accumuler un copolymère. Ce phénomène a été observé chez A. eutrophus (23,30,31,32), Bacillus megaterium (33,34), une espèce de cyanobactérie (35), Pseudomonas pseudoflava (35) et Pseudomonas cepacia (36).

A. eutrophus ne peut synthétiser que des PHA dont les monomères possèdent 4,5 ou 6 atomes de carbone (37) à cause de la stéréospécificité des enzymes impliquées. Enfin P. oleovorans peut produire des PHA à partir d'un plus grand nombre de monomères lorsque des n-alcanes spécifiques sont utilisés comme substrat (25).

## II.5. Techniques de séparation répertoriées.

### II.5.1. Introduction.

Les PHA étant des produits d'accumulation intracellulaire, deux types de séparation peuvent être utilisés:

a. On peut dissoudre tous les composants cellulaires en maintenant finalement le PHA seul en solution.

b. La membrane est perméabilisée de manière à permettre l'extraction du PHA par un solvant spécifique.

Ce dernier genre de méthodes comprend les procédés d'extraction liquide-solide du PHA par des solvants spécifiques.

L'autre type de séparation groupe différentes méthodes permettant de dissoudre, simultanément ou séquentiellement, tous les composants cellulaires autres que le PHA, et met en jeu toute une gamme de produits chimiques et biologiques.

### II.5.2. Extraction par solvants.

Un grand nombre de techniques de séparation des PHA par extraction avec solvants ont été répertoriées. La plupart d'entre elles sont consacrées à la séparation de l'homopolymère PHB; certaines sont brevetées par de grandes compagnies (I.C.I, Solvay, Chemie Linz).

La procédure consiste à mettre en contact la biomasse issue de la fermentation avec le solvant pour une durée donnée sous une pression et à une température déterminée.

Par solvant, nous désignons un liquide capable de dissoudre le PHA contenu dans les cellules pour les

conditions d'extraction spécifiées. Les solvants les plus couramment utilisés sont des produits halogénés tels le chloroforme (38), le dichlorométhane ou le 1,1,2 trichloroéthane (39).

A l'issue de l'étape d'extraction, on récupère une suspension de laquelle sont éliminés, par filtration, les résidus cellulaires issus de la biomasse. Cette étape est difficile, les solutions de PHA dans les solvants halogénés étant très visqueuses dès que des concentrations de 5 % (en poids) sont atteintes. Le PHA est alors précipité par ajout d'un non-solvant, défini comme un liquide ne dissolvant pas le PHA, puis séparé par filtration.

L'extraction peut aussi être réalisée à chaud par le mélange d'un solvant et d'un non-solvant, miscible avec le solvant (41); la précipitation du PHA a alors lieu par refroidissement du mélange.

Une technique d'extraction par l'anhydride acétique a été répertoriée (42), mais elle semble induire des dégradations importantes du biopolymère, les poids moléculaires reportés étant faibles (vers 10 000 - 15 000 g/mole).

Une méthode originale élaborée par des scientifiques autrichiens utilisent la solubilité variable du PHA dans le carbonate d'éthylène et le carbonate de propylène en

fonction de la température (43). Dans ces 2 solvants, le PHA présente une solubilité de 200 g/L à 120°C et une solubilité inférieure à 20 g/L à 90°C. La précipitation du PHA ne nécessite donc aucun ajout de non-solvant et se fait spontanément lors du refroidissement de la solution.

Bon nombre de variantes à ces méthodes ont été reportées et l'efficacité du procédé a parfois été améliorée par des procédures supplémentaires. En effet, lorsqu'on soumet directement la biomasse à l'extraction, le solvant tend à dissoudre certaines substances cellulaires comme des lipides ou certaines protéïnes de faible poids moléculaire.

Pour éliminer ces substances du PHA, il est nécessaire d'ajouter une étape de pré-traitement de la biomasse avant l'extraction, pour éliminer les composés présentant une affinité pour le solvant sans pour autant toucher au PHA. De tels traitements ont été mis au point en utilisant des solvants comme l'acétone ou le méthanol (38), qui permettent le séchage de la biomasse avant l'extraction.

Certaines réserves ont été émises sur ce genre de séparation par solvant. Il semble que l'étape d'extraction induisent des coupures au sein des chaînes polymériques probablement occasionnées par les radicaux libres présents dans les solvants halogénés. De plus, l'étape de reprécipitation nécessaire à la récupération résulte en une

diminution importante du poids moléculaire (44).

Enfin, du fait de la forte viscosité des solutions de PHA, l'extraction nécessite de grandes quantités de solvants. Le volume utilisé dépend de la quantité de PHA accumulé dans les microorganismes (41), mais les concentrations des solutions en PHA ne peuvent dépasser 10 % en masse. La récupération des solvants peut être réalisée par distillation, mais certains mélanges solvant + non-solvant comme dichlorométhane ou chloroforme et méthanol forment des azéotropes.

### II.5.3. Digestion chimique à l'hypochlorite de sodium.

Cette méthode fut une des premières répertoriées vers 1958 (45). Elle consiste à dissoudre sélectivement les constituants cellulaires autres que le PHA; tout le procédé reposant sur le pouvoir oxydant de l'hypochlorite et sur l'insolubilité du PHA dans les solutions d'hypochlorite.

La séparation est menée par une mise en contact de la biomasse contenant le PHA avec la solution d'hypochlorite. Le résidu obtenu après un temps donné de traitement est purifié par différentes techniques comme des lavages par solvants, des recristallisations ou des dialyses (46,47,48).

Le défaut d'une telle méthode, facile à mettre en oeuvre, est la diminution importante du poids moléculaire qu'elle engendre. Certains polymères isolés étant impropres à certains usages postérieurs. Lundgren (49), par des mesures de viscosité à partir d'échantillons de PHB issus de Bacillus megaterium et de Rhodospirillum rubrum, montra que l'extraction à chaud au chloroforme induisait des diminutions de poids moléculaires moins importantes que la séparation à l'hypochlorite de sodium (procédure de Williamson et Wilkinson (45)). Nuti (50), opérant avec l'hypochlorite, montra que le poids moléculaire est augmenté si on utilise de la biomasse préalablement lyophilisée au lieu d'une biomasse humide directement issue de la fermentation. D'autres travaux mettent en exergue le faible poids moléculaire des échantillons isolés par cette méthode (51,52).

Néanmoins, l'ensemble de la méthode repose sur plusieurs paramètres qui, s'ils sont optimisés, pourraient permettre d'obtenir des PHA de bonne qualité. Un tel procédé serait d'une mise en oeuvre facile avec des coûts convenables si on peut s'affranchir des problèmes posés par l'usage de l'hypochlorite (pollution et corrosion). Cette méthode n'a été utilisée que pour des études de caractérisation des PHA (53,54).

## II.5.4. Séparation par digestion enzymatique (55).

Cette méthode originale de séparation du PHA a été élaborée et brevetée par la société I.C.I et est aujourd'hui utilisée pour la production à grande échelle du copolymère poly-ß-hydroxybutyrate-hydroxyvalérate (P(HB-HV)). Elle consiste en une digestion par diverses enzymes spécifiques des différents constituants cellulaires autres que le PHA.

La première phase du procédé est un traitement thermique de la biomasse vers 100-150°C , qui se doit de solubiliser partiellement les acides nucléïques tout en dénaturant les protéïnes et les acides nucléïques résiduels.

Ce traitement est généralement effectué sur un temps très court à des pH 6-8, de manière à éviter la dégradation du biopolymère. Suite à cette première phase, le résidu est soumis à l'action de plusieurs enzymes tels la phospholipidase, le lysosyme, la lécithase ou encore l'alcalase. Ces traitements sont faits en milieu tamponné, à une température et dans des conditions permettant une efficacité maximale de l'enzyme. On veille à traiter par une seule enzyme à la fois.

La concentration en biomasse des solutions contenant les enzymes est importante (environ 50 g/L); le résidu isolé

titre environ 90 % en PHA et contient 6-7 % en composés protéïques, quelques % en peptidoglycane et autres constituants. Après une séparation de ce type, le polymère n'a subi aucune modification majeure.

### II.5.5. Systèmes aqueux à 2 phases.

Ces systèmes ne constituent pas à eux seuls un moyen de séparation du PHA, mais ils peuvent permettre d'isoler les différents constituants cellulaires après que la cellule ait été dissociée par une autre méthode (action d'enzymes, presse mécanique).

Les systèmes aqueux à 2 phases sont constitués de 2 polymères, qui forment des solutions immiscibles lorsqu'ils sont mis dans l'eau. Le système ainsi constitué tend à distribuer les molécules, les cellules ou les particules entre les 2 phases.

La séparation a lieu après un temps très court et elle est générée par un équilibre thermodynamique qu'on peut représenter par un diagramme de phases (56).

Ces systèmes sont caractérisés par 2 phases aqueuses contenant chacune entre 85 et 98 % d'eau avec des différences de densité et de tension interfaciale très faibles et des viscosités très fortes. La durée de

décantation est très longue, mais peut être réduite par centrifugation.

Les produits sont séparés selon leurs propriétés de surface, la séparation n'est permise que si les cellules et les substrats sont capables d'enrichir une des phases, alors que le produit diffuse dans l'autre phase. En biotechnologie, la séparation des constituants cellulaires se fait en fonction de leur caractère hydrophile ou hydrophobe.

Une technique de séparation des PHA utilisant de tels systèmes a déjà été répertoriée (57). La première étape de la procédure consiste à briser les cellules de manière à séparer physiquement les granules de PHA du reste de la biomasse. La technique proposée est l'action d'ulta-sons en milieu tampon. Le système aqueux à 2 phases utilisé était constitué de Dextran T-500 (5 % en poids/volume) et de poly-éthylèneglycol (3.5 % en poids/volume), la concentration de la biomasse (en poids sec) dans la solution étant fixée à 1 % . Le PHA est récolté dans la phase inférieure riche en Dextran T-500.

Une telle méthode présente l'avantage d'être "biologique" dans la mesure où les produits nécessaires à la séparation sont biodégradables et compatibles avec les tissus humains. De plus, des procédés utilisant de systèmes

aqueux à 2 phases ont déjà été développés à grande échelle pour la purification d'enzymes (58).

Cette technique développée par GRIEBEL ne semble pas extrapolable car le Dextran T-500 utilisé est très coûteux ($310/kg) (59) et n'est pas totalement récupérable en fin d'opération.

De nombreux polymères moins coûteux entrant dans la composition de systèmes aqueux à 2 phases ont été élaborés au cours des dernières années comme l'Aquaphase PPT, molécule d'amidon greffée de groupements hydroxypropyls, dont le coût est d'environ $21/kg.

En conclusion, la modélisation et l'optimisation d'une telle méthode serait sans doute longue, mais le PHA, de par son caractère hydrophobe, peut se prêter à ce genre de séparation.

### II.5.6. Autres techniques développées.

#### II.5.6.1. Utilisation d'ultrasons.

Celle-ci fut uniquement reportée dans des travaux inhérents à des études de structure sur le PHA (50,53,60). Elle consiste en une séparation des granules de polymères des débris cellulaires par action d'ultrasons sur une suspension contenant, outre la biomasse, du lysosyme et de

la désoxyribonucléase. La récupération des granules de PHA se fait par centrifugation sur gradient (chlorure de césium ou glycérol). Les échantillons isolés par une telle technique sont d'une pureté convenable et présentent des poids moléculaires élevés (50).

La méthode telle que décrite ne peut être extrapolable à grande échelle, mais l'usage d'ultrasons pour un bris préliminaire des cellules est une méthode d'intérêt à un moment où la technologie liée aux ultrasons se développe dans différents domaines comme la synthèse organique.

II.5.6.2. Usage d'un réactif à base d'acide thioglycolique.

Cette technique (50) ne permet pas une séparation complète des granules de PHA, mais seulement une perméabilisation des cellules de façon à faciliter la récupération du polymère réalisée au moyen d'un solvant. Cette méthode nécessite une lyophilisation préalable des cellules, ensuite mises en suspension dans un réactif contenant de l'acide thioglycolique et un agent complexant, comme l'E.D.T.A. Après ajustement du pH vers 8, la solution est recouverte d'une couche d'huile, qui a pour but de protéger l'acide thioglycolique de l'oxygène de l'air. L'ensemble est maintenu à 50°C durant 16-24 h.

L'isolation du PHA est finalement réalisée par centrifugation ou par extraction à l'aide d'un solvant.

Bien que peu de résultats soient disponibles sur cette méthode, il semble que les polymères obtenus soient de forts poids moléculaires ( > 300 000 g/mole).

II.5.6.3. Lamination mécanique de la biomasse.

Peu de travaux font référence à ces méthodes. Un brevet de la société I.C.I (61) décrit une méthode d'isolation consistant à infliger à la biomasse de rapides et violentes variations de température et de pression.

La biomasse, en solution dans l'eau, est chauffée jusqu'à des températures de 200°C environ (autoclave). A l'issue de ce chauffage, la suspension est comprimée et entraînée à travers un orifice de faible diamètre jusqu'à un réservoir contenant de l'eau glacée. Après avoir été récupérée, le résidu subit une série de lavages à l'acétone. Aucune donnée sur la pureté et le poids moléculaire du polymère isolé n'est disponible.

## II.6. Séparation mettant en jeu surfactants et détergents.

L'usage d'un surfactant dans un procédé de séparation du PHA n'a pas été répertoriée, excepté dans un brevet d'I.C.I où une solution de surfactant est utilisée pour un dernier rinçage des granules. Devant le grand nombre de techniques utilisant des surfactants et des détergents, il semblait judicieux de vérifier leur effet sur les PHA dont les propriétés de solubilité spécifiques pouvaient laisser espérer un succès.

### II.6.1. Définitions.

Un surfactant est un agent de surface contenant dans sa structure moléculaire des groupements de polarités opposées, formant des monocouches orientées aux interphases. Ces composés présentent des propriétés mouillantes, moussantes et emulsifiantes permettant la dispersion des composés en solution.

Un détergent est un agent de surface soluble dans l'eau capable de "mouiller" une grande variété de surfaces tout en éliminant les graisses et les dépôts organiques, puis en les maintenant en suspension avant la phase de rinçage.

On peut assimiler les détergents à une catégorie particulière de lipides. La famille des lipides englobe différents types de composés comme des pigments, des cholestérols, des phospholipides et des glycolipides, dont la plupart sont amphiphiles; leur molécule contient une partie apolaire (généralement constituée d'une chaîne hydrocarbonée) et une partie polaire dont la nature peut varier.

Les détergents sont divisés en 3 familles en fonction de leur structure chimique.

a. Les "anioniques" comme le dodecylsulfate et le dodocylsulfonate.

b. Les "cationiques" comme le bromure de cétyltriméthylammonium (CETAB) et le bromure de tetradécylammonium.

c. Les "non-ioniques" regroupent différents produits généralement connus sous des noms commerciaux, qui ont pour point commun une partie polaire constituée d'une chaîne de polyéthylèneglycol. Les plus répandus sont les séries des Triton X, Triton N et Tween.

### II.6.2. Propriétés en phase aqueuse.

Les groupements apolaires présentent peu d'affinité pour

l'eau dans la mesure où leur énergie d'interaction avec l'eau est faible (62,63), alors que les groupements polaires présentent une forte affinité pour elle (établissement de liaisons non-covalentes).

Différentes techniques et plusieurs échelles ont été établies pour comparer les détergents. La plus généralement admise est l'échelle HLB ("hydrophile-lipophile balance") (64,65), basée sur la taille de la molécule ainsi que sur les forces d'interaction entre les groupements hydrophiles et les groupements hydrophobes.

Le comportement d'un détergent dans l'eau est directement relié à sa concentration. Quand une faible quantité de détergent est dissoute dans l'eau, une partie se retrouve sous forme de monomères alors que le reste forme une monocouche à l'interphase air/eau. Lorsque la concentration en monomère atteint une valeur critique et que les surfaces deviennent saturées, les nouvelles molécules s'associent pour former des micelles, définis comme des agrégats de type colloïdal thermodynamiquement stables formés spontanément par des amphiphiles au dessus d'une certaine concentration (concentration micellaire critique ou CMC) à une température supérieure à la température micellaire critique (CMT) (66). L'agrégation des molécules de surfactant et la formation de micelles sont occasionnés

par l'hydrophibicité des groupements apolaires. L'intérieur des micelles est constitué de groupements hydrophobes, emprisonnés par les groupements polaires, qui couvrent la surface du micelle (67).

En règle générale, la CMC diminue quand le caractère hydrophobe de la queue apolaire diminue, les groupements hydrophiles s'opposent à la formation de micelles. Par exemple, les composés ayant un groupement polaire ionique ont souvent des CMC 100 fois supérieures à leurs analogues non ioniques (68).

### II.6.3. Action des détergents sur les constituants cellulaires.

Les détergents ont des modes d'action spécifiques vis-à-vis des différents constituants cellulaires et il est nécessaire de pratiquer une étude séparée des différents cas.

#### II.6.3.1. Interactions entre détergents et protéines.

La liaison du détergent sur les protéïnes suit les lois thermodynamiques de l'équilibre, mais elle se fait sur des sites spécifiques dépendant de la concentration en détergent libre en équilibre avec les protéïnes (68).

Différents degrés d'affinités caractérisent cette association, qui est fonction de la protéïne considérée et du type de surfactant utilisé.

Par exemple, les détergents anioniques présentant dans leur structure une longue chaîne hydrocarbonée, se fixent en grand nombre par rapport aux détergents cationiques ou non-ioniques (71).

On reporte que, dans le cas de détergents de type non-ionique comme le Triton X-100, il y a délipidation de la glycoprotéïne et formation d'un complexe protéïnes-détergent (72).

Etant difficile d'étudier l'action du détergent sur chaque espèce chimique, il est préférable de poursuivre la discussion par des études dirigées sur le comportement des détergents sur les membranes biologiques.

II.6.3.2. Solubilisation des bicouches lipidiques.

Les membranes sont assimilables à des structures présentant une bicouche lipidique et des liposomes (69).

Lors de l'attaque d'une bicouche, une partie du détergent interagit avec la bicouche, alors que l'autre partie reste en solution, la concentration du détergent libre en solution étant inférieure à la CMC.

En pratique, lorsque la bicouche est saturée en

détergent, il y a formation de micelles et, à des concentrations intermédiaires, il y a coexistence de micelles concentrés en phospholipides et de micelles concentrés en détergent (68).

L'attaque du détergent sur une bicouche lipidique suit la séquence suivante.

a. Incorporation du détergent dans la bicouche et changement des propriétés chimiques.

b. Phase de transition lamellaire-micellaire et début de formation de micelles.

c. Augmentation du rapport détergent/phospholipides dans les micelles, qui induit une diminution de leur taille.

La formation et la dissociation des micelles répond à une cinétique de 1er ordre avec une constante de vitesse très élevée ( = 10 $s^{-1}$) (70).

II.6.3.3. Effet du détergent sur les membranes biologiques.

La membrane biologique est assimilable à la somme des constituants, qui la composent, même si, dans certains cas, cette règle peut être affectée par des interactions électrostatiques et hydrophobes.

Une augmentation de la concentration en détergent présente l'effet suivant:

a. attaque et liaison du détergent sur la membrane.

b. éclatement de la membrane, formation d'un mélange de micelles et de complexes formés de protéïnes et de lipoprotéïnes.

c. dernière phase de séparation entre lipides et protéïnes.

La 2$^{ième}$ phase est caractérisée par un accroissement du volume membranaire visant à stabiliser la membrane et à la protéger des chocs osmotiques. La phase de lyse membranaire est mal définie, mais il semble que la présence du surfactant induise un changement de l'organisation moléculaire et une altération de la perméabilité membranaire (73).

Dans ce genre de procédés, il est nécessaire de référencer concentration en détergent et concentration en biomasse pour évaluer l'efficacité de la séparation car, parallèlement à l'établissement de liaisons sur la membrane, il y a formation de micelles de détergent pur. Les détergents les plus efficaces sont ceux qui présentent une grande affinité pour la membrane comparativement à leur tendance à former des micelles (74).

Pour les détergents non-ioniques, lipides et protéïnes ne sont éliminés qu'à haut pH. L'efficacité des détergents non-ioniques est liée à la capacité du détergent à disperser

la membrane lipidique.

D'autres détergents, comme le sulfate de dodecyl, permettent une séparation complète des lipides et des protéïnes à de très fortes concentrations ( > 4 mg de dodecylsulfate pour 1 mg de lipides). Pour la plupart des cas, on va distinguer la lyse de la cellule et la dissolution des constituants cellulaires, qui nécessitent des concentrations 5 à 10 fois plus grandes.

# CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

## III.1. Fermentation d'Alcaligenes eutrophus en discontinu alimenté.

Toutes les données inhérentes à la préparation et à la stratégie de fermentation ainsi que les techniques pertinentes à l'analyse de la fermentation sont reportées à l'annexe # 1.

## III.2. Caractérisation de la biomasse et du PHB isolé.

### III.2.1. Contenu en PHB de la biomasse et pureté des échantillons de PHB.

#### III.2.1.1. Méthode d'analyse employée

L'analyse du contenu en PHB de la biomasse est réalisée selon la méthode décrite par Braunegg et al (76). Le PHB est soumis à une hydrolyse douce en milieu acido-méthanolique qui le transforme en esters méthylés d'acide hydroxybutyrique. L'acide benzoïque est le standard interne de la méthode, le sel de sodium de l'acide ß-hydroxybutyrique (Sigma Chemical Co) en est le standard externe.

III.2.1.2. Préparation des standards

On prépare des solutions de standard interne d'acide benzoique à 0.1 % et des solutions de standard externe respectivement à 0.1, 0.25, et 0.5 % en acide benzoique et en ß-hydroxybutyrate de sodium. Chacune des solutions est réalisée dans du méthanol à 3 % en $H_2SO_4$.

III.2.1.3. Préparation des échantillons

A une masse connue de biomasse, on ajoute 2 mL de chloroforme et 2 mL de standard interne. Les échantillons de standard sont réalisés à partir de 2 mL de solution de standard interne, auxquels on ajoute 2 mL de chloroforme. Afin de tester la reproductibilité des mesures et d'éviter des erreurs dues à une mauvaise manipulation, les échantillons sont faits en double. Ils sont alors placés dans des tubes vissés Kimax hermétiques et maintenus à 110°C durant 3 heures. Les tubes sont ramenés à température ambiante. Un mL d'eau déminéralisée est ajoutée et on agite vigoureusement de façon à transférer, dans la phase aqueuse, les impuretés solubles susceptibles de gêner l'analyse. La phase organique inférieure contenant l'ester méthylé est prélevée au moyen d'une pipette Pasteur pour l'analyse.

III.2.1.4. Conditions d'opérations.

Les esters méthyliques formés sont quantifiés par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil H.P-5890 couplé à un intégrateur HP-3396-A. La séparation des constituants est faite sur une colonne capillaire longue de 25 m, de diamètre 0.2 $\mu$m de type polaire constituée d'une silice à 10 % en Carbowax.

Le gaz vecteur est l'hélium (débit: 0.5 mL/min), le détecteur à ionisation de flammes est alimenté par un débit d'air de 500 mL/min, un débit d'hydrogène de 20 ml/mn et un débit auxiliaire d'hélium de 30 mL/min.

Une bonne séparation du benzoate de méthyle (issu du standard interne) et de l'hydroxybutyrate de méthyle (issu du PHB) requiert une analyse en gradient de température entre 90°C et 150°C pour un taux d'élévation de température de 8°C/min. Les temps de rétention des différents composés évoqués sont inférieures à 8 min dans les conditions d'analyse décrites.

III.2.1.5. Calcul du contenu en PHB.

Pour chaque échantillon de standard externe, on calcule le rapport des surfaces de l'hydroxybutyrate de méthyle sur le benzoate de méthyle (rapport 1). Le même rapport est calculé pour chacun des échantillons réalisés avec la

biomasse (rapport 2).

Le pourcentage de PHB dans la solution analysée est donné par:

(Rapport 2/Rapport 1)x(86/126) en % (g de PHB pour 100 g de biomasse).

Le rapport 86/126 tient compte de la différence de poids moléculaire entre l'acide ß-hydroxybutyrique et l'hydroxybutyrate de sodium à partir duquel est calibrée la mesure tout en considérant la perte d'une molécule d'eau lors de la polycondensation.

Connaissant la quantité initiale de biomasse, on peut déterminer la teneur en PHB (exprimée en %) de la biomasse.

Pour les échantillons de PHB, la pureté est définie (en termes de %) comme le poids de PHB sur le poids de biomasse totale.

### III.2.2. Détermination du poids moléculaire.

#### III.2.2.1. Viscosité intrinsèque

Ne pouvant calculer directement la viscosité des échantillons de PHA en solution dans le chloroforme, une mesure comparative donnant accès à une valeur relative de la viscosité est donnée par:

$$n_r = n_2 / n_1$$

Dans notre cas, $n_2$ représente la viscosité d'une solution de PHB dans un solvant donné et $n_1$, celle du solvant (dans notre cas le chloroforme. L'expérimentation consistant à mesurer le temps d'écoulement d'un volume donné de solution dans un viscosimètre de type Ubbeloyde, on peut ramener le paramètre $n_r$ au rapport suivant:

$$n_r = t_2 / t_1$$

$t_2$ est le temps d'écoulement d'une solution de concentration connue en PHB et $t_1$ celui d'un même volume de solvant pur. Pour cette simplification, on utilise la variation linéaire de la viscosité avec le temps pour de faibles concentrations. Pour les mesures, des solutions à 0.1, 0.05, 0.025 et 0.01 % sont utilisées.

On définit aussi une viscosité spécifique par:

$$n_{sp} = n_r - 1$$

La loi de Huggins permet de relier cette viscosité spécifique à la viscosité intrinsèque [n] par:

$$n_{sp} / C = [n] + k'[n]^2C$$

Pour des solutions très diluées, nous avons utilisé le fait que:

$$n_{sp} / C = [n]$$

L'équation de Mark-Houwink nous donne:

$$[n] = K\ [MW]^a$$

Pour les paramètres K et a spécifiques du système polymère-

solvant considéré, les valeurs définies par Akita et al (80) ont été utilisées: $K = 0.000118$

$a = 0.78$.

D'autres publications donnent des valeurs assez voisines (81):

$K = 0.000077$

$a = 0.82$

III.2.2.2. Chromatographie à perméation de gel.

Ce type de chromatographie couplé à un logiciel moderne et original de traitement des données donne directement les paramètres suivants:

- les poids moléculaires moyens: Les résultats de poids moléculaire présentés subséquemment sont des poids moléculaires moyens en poids ($M_w$).
- la viscosité intrinsèque évaluée selon l'équation de Mark-Houwink.
- l'indice de polydispersité, qui exprime la dispersion des différents poids moléculaires du polymère autour du poids moléculaire moyen.

Les échantillons de PHB solides sont dissouts dans du chloroforme (grade H.P.L.C; Anachemia) de manière à avoir des solutions à 0.5 %. La dissolution n'étant pas instantanée, les solutions sont maintenues durant 24 h à

température ambiante. Avant injection, les solutions sont filtrées sur Millipore 0.22 $\mu$m.

La séparation est réalisée par 3 colonnes PL assemblées en série (Polymer Laboratories Inc., Amherst, MA) couplées à un détecteur Spectra-Physics 8430 RI et à un intégrateur 4290 muni du logiciel GPC plus (Spectra-Physics Inc.). Le débit d'éluant, du chloroforme grade H.P.L.C (Anachemia), était régulé à 1.6 ml/mn au moyen d'une pompe SP8800 LC. Durant l'analyse, la température des colonnes était régulée à 30°C.

Utilisant la méthode de calibration universelle (77,78), l'évaluation des poids moléculaires est faite par référence à une courbe de calibration réalisée à partir d'échantillons de polystyrène monodisperse de poids moléculaires différents (voir courbe de calibration en annexe #2). Les constantes de MARK-HOUWINK utilisées pour la calibration de l'intégrateur, sont K=0.000049 et a=0.794 pour le polystyrène (79) et K=0.000118, a=0.78 pour le PHB (80).

## III.2.3. Analyse sur la biomasse issue de la fermentation d'**A. eutrophus.**

### III.2.3.1. Teneur en PHB de la biomasse.

Utilisant la méthode décrite plus haut, nous avons caractérisé le % de PHB contenu dans la biomasse. Trois échantillons contenant 40 mg de biomasse lyophilisée (pesée sur balance SARTORIUS type 1712) sont préparés selon la procédure habituelle avec pour standard interne une solution d'acide benzoique à 0.1 % . Le calcul de la pureté à partir des chromatogrammes est réalisée comme décrit en tenant compte des masses de standard externe et de biomasse respectivement engagées.

### III.2.3.2. Détermination du poids moléculaire moyen "in vivo" du PHB.

Cette valeur est difficile à évaluer car l'analyse par chromatographie à perméation de gel necessite des échantillons de haute pureté, ce qui n'est pas conciliable avec une étude "in vivo". On peut néanmoins approcher la valeur de ce paramètre en utilisant une méthode ne générant pas trop de dégradations du polymère. La technique retenue consiste en une extraction du biopolymère à température ambiante par du chloroforme.

5 g de biomasse lyophilisée sont mis en agitation à 150 rpm dans 50 mL d'acétone à T=30°C durant 48 h. Après élimination de l'acétone par filtration, la biomasse est agitée durant 48 h à T=30°C dans 100 mL de chloroforme.

La biomasse est filtrée sur buchner, le filtrat est ensuite concentré jusqu'à un volume de 20 mL par évaporation sous vide. Le sirop obtenu est coulé sur 50 mL d'éthanol préalablement refroidi à T=0°C, ce qui induit une précipitation instantanée du PHB. Après avoir maintenu la suspension à 0°C durant 15 min, le PHB est isolé par filtration sur buchner, puis séché durant 24 h à 60°C en étuve ventilée.

A partir de l'échantillon sec, on prépare une solution à 0.5 % dans le chloroforme et on mesure le poids moléculaire par chromatographie à perméation de gel ou par viscosité intrinsèque selon la procédure décrite.

### III.3. Séparation par extraction à l'aide de solvants chlorés.

Pour chacune de nos expériences, la biomasse lyophilisée produite par fermentation d'A. eutrophus a été utilisée.

### III.3.1. Extraction à température ambiante.

Chaque expérience fut conduite avec 5 g de biomasse. Trois solvants furent testés au cours des extractions: le chloroforme, le chlorure de méthylène et le dichloréthane. Les 3 produits étaient de grade technique, l'objectif étant de dégager des techniques industrialisables.

La biomasse est mise en contact avec le solvant (10 vol. soit 50 mL) pour des durées variables (de 12 à 96 h). L'opération est réalisée en flacons agités dans un incubateur donnant une température de 25°C et une agitation de 150 rpm. A l'issue du temps d'extraction, la biomasse est éliminée par filtration sous vide; le solvant enrichi en PHB est concentré sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif (Buchi 461). Le "sirop" obtenu est coulé sur 50 mL d'éthanol (grade technique) préalablement refroidi vers 0-4°C, ce qui induit une précipitation instantanée du PHB. Après avoir été maintenue durant 15 minutes environ vers 0°C, la suspension est filtrée sur buchner et papier-filtre. L'échantillon est séché durant 24 h en étuve ventilée à 60°C, avant d'être pesé; la pureté est mesurée par chromatographie en phase gazeuse, le poids moléculaire déterminé par chromatographie à perméation de gel ou par viscosimétrie.

L'étude consiste à déterminer l'influence du temps

d'extraction sur la masse de PHB isolé, la pureté et la masse moléculaire du polymère. L'efficacité de l'extraction est évaluée par rapport à la masse moléculaire et au pourcentage de PHB recueilli (rendement de séparation) définie par:

(masse de PHB recueilli/masse de PHB attendue) x Pureté du PHB recueilli.

### III.3.2. Extraction à chaud.

Les expériences sont conduites dans des conditions semblables à III.3.1, mais les extractions sont réalisées au reflux de chacun des solvants (chlorure de méthylène (42°C), chloroforme (63°C), dichloréthane (85°C); l'extraction est conduite dans un ballon de 200 ml surmonté d'un réfrigérant ascendant. La chaleur nécessaire à l'ébullition du solvant est fournie par un chauffe-ballon, qui permet un contrôle de l'intensité du chauffage. A l'issue de l'extraction, la suspension est ramenée à température ambiante, le PHA est isolé comme décrit en III.3.1.

### III.3.3. Extraction avec prétraitement à l'acétone.

L'opération préalable à l'extraction choisie, consiste à mettre en contact la biomasse dans 10 volumes (50 mL ici) d'acétone durant 24 h sous agitation. Des expériences d'extraction semblables à celles décrites en III.3.1 et III.3.2, ont été réalisées de façon à évaluer s'il y a ou non amélioration des résultats après prétraitement.

### III.3.4. Suivi de l'évolution du PHB dans les solvants à haute température.

#### III.3.4.1. Procédure expérimentale.

Le PHB utilisé pour ces travaux a été isolé par des techniques mettant en jeu un surfactant et une solution d'hypochlorite. Les analyses montrent qu'il présente une pureté de 95 % et un poids moléculaire moyen de 1 200 000.

On prépare 2 x 20 mL de solution de PHB (concentration de 0.5 %) dans chacun des 3 solvants désignés. La première série d'échantillons est mise dans des tubes scellés, placés en étuve à 110°C. La seconde série d'échantillons, également en tubes scellés, est placée à 70°C.

Toutes les 24 heures, des échantillons sont pris selon la procédure suivante: on prélève 2 mL de solution dans

chacun des tubes. 1 ml est coulé sur 2 mL d'une solution de méthanol à 3 % en $H_2SO_4$ préalablement refroidie. Le PHB non soluble dans le méthanol précipite, la suspension est maintenue durant 15 min à (-18°C). A l'issue de cette opération, le PHB est éliminé par filtration sur Millipore à 0.45 $\mu$m; le filtrat est maintenu à (-20°C) jusqu'à l'analyse. En fin d'expérimentation, ces solutions sont analysées par chromatographie en phase gazeuse; le pic de l'hydroxybutyrate de méthyle permet de calculer la concentration en monomères par rapport à une courbe de calibration (figure III.3.4.2 à l'annexe #3).
L'autre partie de l'échantillon est maintenue à (-20°C) en vue d'une mesure de poids moléculaire par chromatographie à perméation de gel.

III.3.4.2. Courbe de calibration donnant la concentration en acide ß-hydroxybutyrique en fonction du rapport (Ac. ß-hydroxybut./Ac. benzoïque).

A partir d'hydroxybutyrate de sodium (Sigma Chemical), 100 mL de solution à 1 % sont préparés dans du méthanol à 3 % en $H_2SO_4$. Par dilution, on obtient des solutions titrant respectivement 0.5 %, 0.25 %, 0.125 %, 0.0625 %, 0.03125% et 0.0156 % . A 1 mL de ces solutions, on ajoute 1 mL de solution d'acide benzoïque à 1 % dans du méthanol (3 % en

$H_2SO_4$) et 2 mL de chloroforme. Les échantillons sont préparés selon la procédure décrite pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. La courbe de calibration donne le rapport des surfaces (Ac. ß-hydroxybutyrique/Ac. benzoïque) en fonction de la concentration en acide ß-hydroxybutyrique. La courbe de calibration est donnée en annexe # 3 (figure III.3.4.2). De la même façon, pour un échantillon de 1 mL, on ajoute 1 mL de solution d'acide benzoïque à 1 % et 2 mL de chloroforme pour l'analyse.

## III.4. Séparation par digestion à l'hypochlorite de sodium.

Cette méthode consiste en une dissolution sélective des constituants autres que le PHA en utilisant le pouvoir oxydant de l'hypochlorite.

### III.4.1. Préparation des solutions d'hypochlorite.

La préparation des solutions d'hypochlorite est faite selon la procédure établie par Williamson et Wilkinson. Les expériences ont été réalisées avec des solutions d'hypochlorite de sodium commerciale (A.C.S Reagent) titrant 5 % en chlore libre, soit 10.5 % en hypochlorite de sodium.

Cette solution est ajoutée à une solution de carbonate de sodium à 30 %, pour donner une solution finale titrant environ 5.25 % en hypochlorite. La solution titrant 10.5 % en hypochlorite est préparée en ajoutant directement 150 g de carbonate de sodium à 1 litre de solution commerciale d'hypochlorite de sodium (5 % en chlore libre soit 10.5 % en hypochlorite de sodium).Le pH de ces solutions, initialement à 13.6, était ajusté, le cas échéant, par ajout d'acide chlorhydrique concentré (36-38 %).

### III.4.2. Procédure de digestion de la biomasse.

La biomasse contenant le PHB est mise en contact avec la solution d'hypochlorite dans un flacon de 250 mL placé dans un incubateur de cellules à 30°C, à une agitation de 150 rpm. Après la digestion, le PHB est séparé de la fraction aqueuse par centrifugation à 4000 x g durant 15 min. Le PHB est remis en suspension, rincé dans 50 mL d'eau puis recentrifugé. On pratique 3 rinçages similaires et à l'issue du dernier, on ajoute 5 volumes d'acétone au PHB avant de le remettre en suspension et de le récupérer par filtration sur buchner. Les échantillons sont séchés durant 24 h à 60°C en étuve ventilée.

## III.5. Séparation mettant en jeu un surfactant.

### III.5.1. Séparation du PHB par le détergent "Tide".

L'usage de surfactant pour la séparation de biopolymères semblait une méthode digne d'intérêt. Pour ces travaux, le choix s'est porté sur un détergent de type commercial: TIDE$^{R}$. Les principes actifs de ce détergent sont 2 surfactants de type anionique: - le sel de sodium du sulfate de dodecyl.

- le sel de sodium du sulfonate de dodecyl.

On prépare des solutions aqueuses du détergent de différentes concentrations. Celles de concentration supérieure à 2 % étant trop visqueuses, on utilise des concentrations de 2 %, 1 %, 0.5 %, 0.25 % et 0.125 % . Le pH initial de ces solutions diminue légèrement avec la concentration passant ici de 11.5 à 10.9. Pour chacune, on prépare, par ajout d'HCl dilué (concentration à 4 %) 100 ml de solution aux pH 7, 8, 9, 10.

Pour chaque concentration et chaque pH, on met en contact 1 g de biomasse dans 100 mL de détergent durant 1 heure à 30°C avec une vitesse d'agitation d'environ 150 rpm. A l'issue du traitement par le détergent, le PHA est séparé du détergent enrichi en biomasse par centrifugation à 4000

x g durant 15 min, puis remis en suspension dans 50 mL d'eau déminéralisée. On effectue encore 2 centrifugations et un rinçage à l'eau déminéralisée avant que le PHA ne soit finalement remis en suspension dans 50 mL d'acétone.

Le PHA est isolé par filtration sur buchner avant d'être séché durant 24 h à 60°C en étuve ventilée. L'échantillon est alors pesé, sa pureté évaluée par chromatographie en phase gazeuse. son poids moléculaire mesuré par chromatographie à perméation de gel.

### III.5.2. Séparation du PHB par action conjuguée d'un détergent et d'hypochlorite de sodium.

Le début de la procédure expérimentale est assimilable à celle décrite en III.5.1, mais, au lieu d'être ajouté à de l'acétone, le PHB est remis en solution dans 50 mL de solution d'hypochlorite puis agité violemment durant 1 min. La suspension est centrifugée durant 15 min à 4000 x g, le surnageant composé d'hypochlorite enrichi en biomasse est alors éliminé. Le PHB est alors rincé à 2 reprises par 50 mL d'eau et centrifugé, puis il est remis en solution et agité durant 2 min dans 25 mL d'acétone avant d'être isolé par filtration sur buchner. Après séchage, les échantillons sont pesés, leur pureté et leur poids moléculaire sont

mesurés.

### III.5.3. Mesures de viscosité sur les suspensions après séparation.

La viscosité a été mesurée au moyen d'un viscosimètre de type "Brookfield", muni d'un adapteur UL de type cylindrique. Le système a été calibré à partir d'huiles standards de viscosité connue. Le volume de chaque échantillon était de 25 mL et le couple était mesuré pour plusieurs vitesses de rotation. On accède aux valeurs de viscosité grâce à des courbes de calibration (figure III.5.4).

### III.5.4. Séparation mettant en jeu un détergent et de l'ADNase.

L'enzyme utilisée est la désoxyribonucléase (SIGMA Chemical Company), qui présente une activité maximale à pH 7, à 25°C, dans une solution de NaCl (0.15 mole par litre) contenant une concentration en magnésium de 4.2 millimoles par litre.

La quantité de détergent est ajustée de façon à obtenir des solutions à 1 % en S.D.S.

L'échantillon-témoin est réalisé par ajout de 1 g de biomasse dans 100 mL de solution suivi d'une mise en contact par agitation de 15 min. La viscosité du milieu est à ce moment mesurée.

La désoxyribonucléase est d'abord utilisée simultanément avec le détergent. 25 mg d'enzyme sont ajoutées simultanément à la biomasse.

# CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSIONS.

Si on excepte la fermentation-témoin d'A. eutrophus, chacune des valeurs présentées est la moyenne des données obtenues pour 3 expériences réalisées dans les mêmes conditions. Les données de chromatographie à perméation de gel sont des moyennes réalisées à partir des données fournies par 5 chromatogrammes.

## IV.1. Production de PHB témoin par fermentation en discontinu alimenté d'A.eutrophus

L'essentiel des informations recueillies sur cette fermentation est résumé sur les figures IV.1.1, IV.1.2 et IV.1.3. L'addition de glucose et d'azote se fait en 2 temps, soit au début de la fermentation et après 15 heures, au moment où ces 2 nutriments sont épuisés. Après 25 heures d'opération, on atteint une concentration de biomasse à 30 g/L, la source d'azote est épuisée, la phase d'accumulation de PHB devrait alors débuter. Celle-ci a débuté après seulement 15 heures d 'opération lorsque la concentration d'ammonium est tombée à 0.2 mg/L dans le fermenteur. Elle s'est poursuivie lentement entre 15 et 20 h avec une concentration en ammonium supérieure à 1 g/L, puis s'est accéléré après 23 heures d'opération.

**FIGURE IV.1.1. Concentration en glucose et en biomasse en fonction du temps de fermentation.**

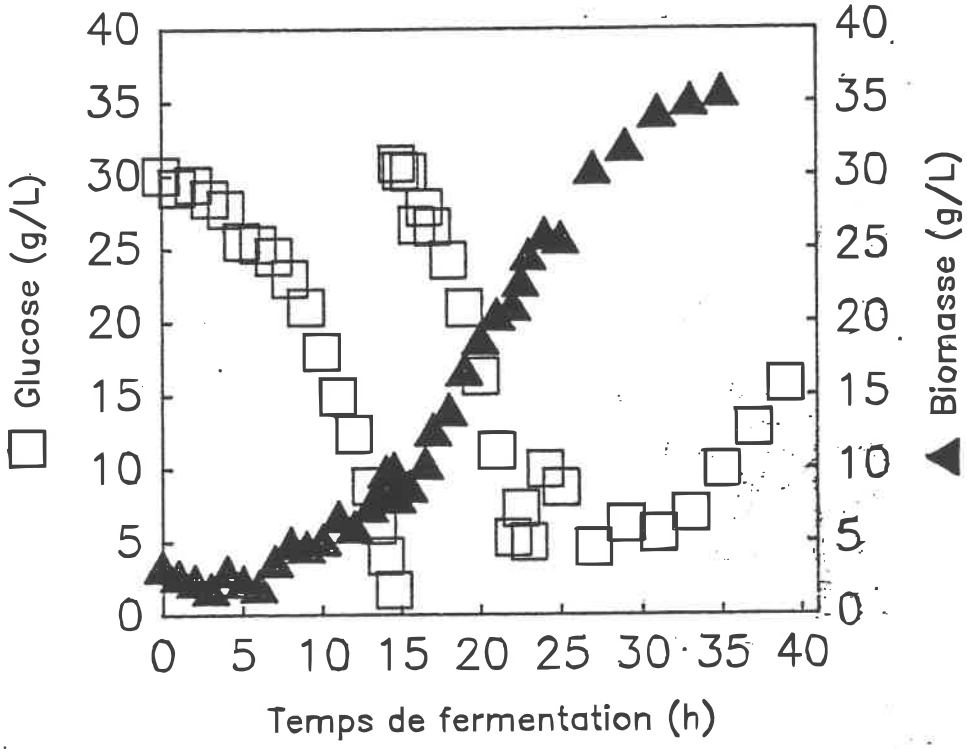


**FIGURE IV.1.2. Concentration en ammonium et en protéines en fonction du temps de fermentation.**

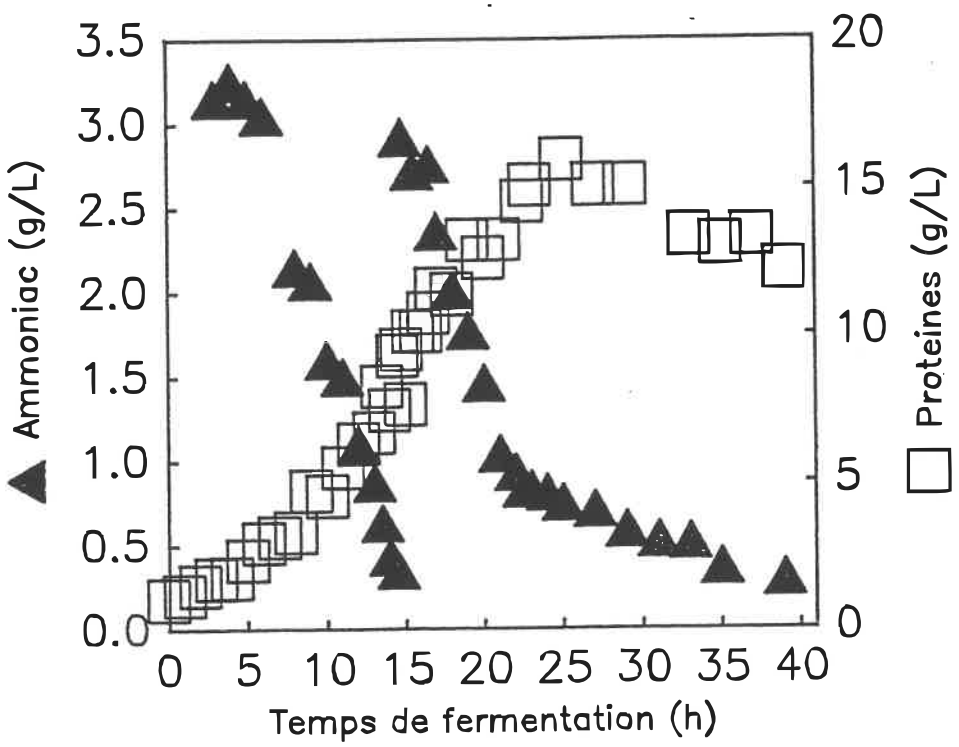
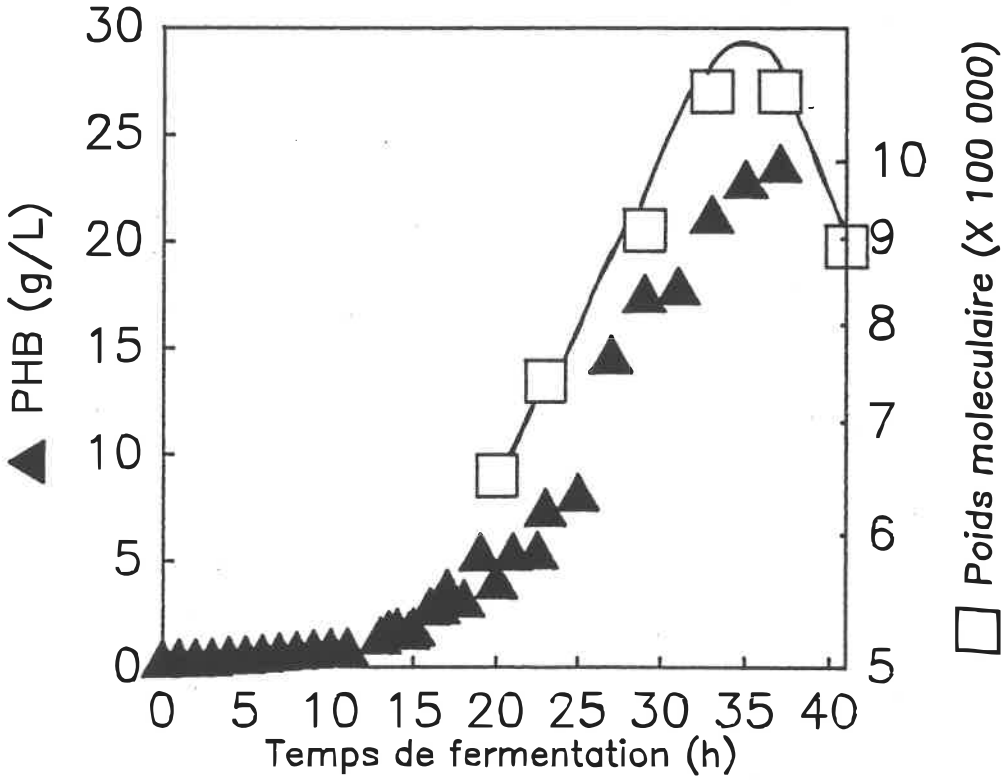


**FIGURE IV.1.3. Concentration et poids moléculaire en fonction du temps de fermentation.**



L'évolution du poids moléculaire du PHB au cours de la fermentation suggère un possible mécanisme d'accumulation du polymère incluant une phase d'initiation avec formation de granules en début de fermentation, qui grossiraient ensuite par allongement des chaînes polymériques. L'augmentation de la concentration en PHB peut être due en partie à l'augmentation de taille des granules, mais ce n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la mesure où le poids moléculaire double lorsque la concentration de PHB est multiplié par 5. Globalement, les résultats sont différents de ceux présentés par I.C.I (83).

Les 19 L de bouillon de fermentation ont permis d'isoler 660 grammes de biomasse sèche. Cette biomasse a constitué la base de toutes les expériences de séparation subséquentes.

Le contenu en PHB de cette biomasse a été évalué par chromatographie en phase gazeuse. Les chromatogrammes obtenus donnent une concentration de 50 % (poids de PHB/poids de biomasse sèche) en PHB.

Des extractions et analyses par chromatographie à perméation de gel ont montré que le PHB présente un poids moléculaire moyen de 1 250 000 g/mol pour un indice de polydispersité égal à 2.5.

## IV.2. Extractions par solvants.

L'influence de différents paramètres inhérents à la technique d'extraction comme la température, le rapport des volumes solvant/biomasse ou l'influence d'un prétraitement à l'acétone ont été étudiés. Le PHB n'étant pas récupéré à 100 % par ces techniques, des analyses sur les effluents de séparation ont permis de positionner le polymère non-extrait. Dans la dernière partie, on suit le comportement dans des solvants au reflux.

### IV.2.1. A température ambiante.

Le PHB isolé par des extractions conduites à température ambiante étaient caractérisées par une grande pureté et des poids moléculaires élevés (tableau IV.2.1). Le taux de récupération était extrêmement faible. Les poids moléculaires très élevés ont conduit à faire de cette méthode la procédure utilisée pour la mesure des poids moléculaires "in vivo". Ces valeurs constituent un paramètre important pour la caractérisation du biopolymère fourni par une souche ou une espèce à l'étude. Le 1,2-dichloréthane est inefficace à température ambiante.

**Tableau IV.2.1: Caractéristiques des échantillons de PHB isolé par extraction à température ambiante.**

| Conditions d'opération | Pureté(%) | PHB(%) | PM(g/mole) |
|---|---|---|---|
| **Dans 8 vol. de solvant durant 6h.** | | | |
| Chloroforme | 95 | 3.5 | 1 250 000 |
| Chlo. de méthylène | 94 | 7 | 1 200 000 |
| Dichloréthane | ---- | --- | ---- |
| **Dans 8 vol. de solvant durant 12 h.** | | | |
| Chloroforme | 95 | 27 | 1 200 000 |
| Chlo. de méthylène | 96 | 26 | 1 200 000 |
| Dichloréthane | ---- | -- | ---- |

## IV.2.2. A reflux du solvant (sans prétraitement)

L'extraction du polymère a eu lieu dans les premières minutes (tableau IV.2.2). Des échantillons purs à 88-90 % étaient isolés avec un taux de récupération assez faible. Cinq grammes de biomasse sont susceptibles de fournir 2.5 g de PHB, mais les quantités isolées sont voisines de 1.5 g avec le chloroforme et le dichloréthane, et beaucoup plus faibles avec le chlorure de méthylène.

La sélectivité était plus faible avec des puretés moins bonnes comparativement aux résultats obtenus à température ambiante.

**Tableau IV.2.2: Caractéristiques de séparation de PHB par extraction au reflux du solvant.**

| Solvant | Temps extraction (min) | Pureté (%) | PHB (%) |
|---|---|---|---|
| Chlorof. | 15 | 90 | 50 |
| | 30 | 94 | 55 |
| | 60 | 92 | 55 |
| | 120 | 91 | 56 |
| Chlo. de méthylène | 15 | 89 | 15 |
| | 30 | 90 | 20 |
| | 60 | 93 | 20 |
| | 120 | 91 | 19 |
| Dichloréth. | 15 | 90 | 50 |
| | 30 | 93 | 54 |
| | 60 | 92 | 54 |
| | 120 | 92 | 55 |

### IV.2.3. Extraction à reflux (avec prétraitement)

Après les expériences déjà décrites, les résultats étaient peu satisfaisants quant à la pureté du PHB isolé, alors que la sélectivité supposée des solvants aurait du garantir une pureté supérieure à 95 % . Ce défaut de pureté peut être attribuée à une dissolution simultanée d'autres espèces chimiques (lipides, petites protéïnes,...), ensuite emprisonnées lors de l'étape de précipitation du PHB. L'influence d'un prétraitement permettant d'éliminer ces impuretés solubles dans le solvant d'extraction a été

étudiée.

Le traitement pré-extraction par mise en contact dans l'acétone (tableau IV.2.3) a permis d'augmenter la pureté du biopolymère, qui se situait à des valeurs voisines de 95%

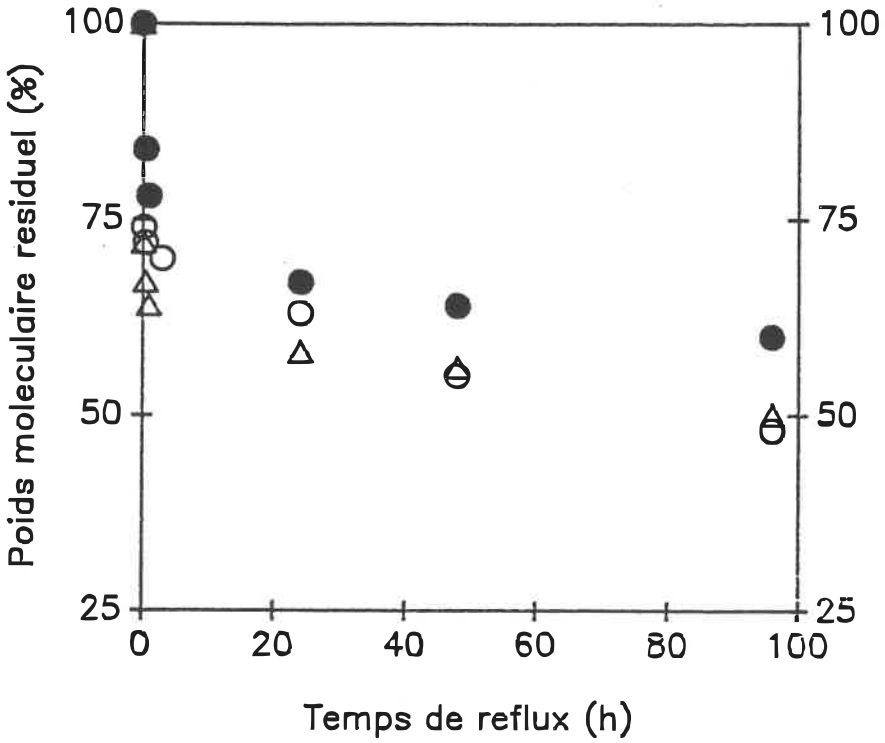
Pour les extractions à reflux, la diminution du poids moléculaire en fonction du temps d'extraction a été étudiée. Le taux de diminution du poids moléculaire n'était pas constant; maximum en début d'extraction, il tendait à diminuer pour devenir pratiquement nul après 96 hr (figure IV.2.3). Pour les 3 solvants, la variation du poids moléculaire avec le temps est présentée à la figure IV.2.3.

On peut supposer un mécanisme de dégradation probablement similaire de type radicalaire. Différentes supputations sur le mécanismes s'imposent. En chromatographie par perméation de gel, un seul pic correspondant au PHB a été décelé. Ce pic s'est peu à peu déplacé vers de plus faibles poids moléculaires, mais aucun dédoublement n'a été constaté alors que l'appareil était susceptible de détecter des poids moléculaires de 10 000 g/mole. La dégradation du polymère décelée par la diminution du polymère ne peut se faire que par libération de petites entités polymériques (oligomères de poids moléculaire inférieur à 10 000).

**Tableau IV.2.3: Caractéristiques du PHB isolé par extraction dans des solvants au reflux après prétraitement à l'acétone.**

| Temps d'extraction | Pureté (%) | PHB (%) | PM (g/mole) |
|---|---|---|---|
| Chloroforme: | | | |
| 15 min | 96 | 70 | 930 000 |
| 30 min | 94 | 67 | 900 000 |
| 60 min | 96 | 68 | 925 000 |
| 180 min | 94 | 68 | 780 000 |
| 24 h | 94 | 65 | 680 000 |
| 48 h | 94 | 65 | 630 000 |
| 96 h | 95 | 65 | 600 000 |
| Chlorure de méth. | | | |
| 15 min | 95 | 24 | 1 050 000 |
| 45 min | 95 | 25 | 990 000 |
| 75 min | 97 | 25 | 950 000 |
| 24 h | 98 | 25 | 840 000 |
| 48 h | 97 | 24 | 800 000 |
| 96 h | 98 | 25 | 760 000 |
| Dichloréthane: | | | |
| 7 min | 93 | 66 | 935 000 |
| 15 min | 93 | 66 | 900 000 |
| 30 min | 98 | 68 | 805 000 |
| 60 min | 97 | 69 | 800 000 |
| 24 h | 97 | 70 | 740 000 |
| 48 h | 95 | 68 | 680 000 |
| 96 h | 95 | 66 | 650 000 |

**FIGURE IV.2.3. Variation du poids moléculaire en fonction du temps d'extraction dans des solvants au reflux**




(○) chloroforme (●) chlorure de méthylène (△) dichloréthane

### IV.2.4. Influence du volume de solvant sur le rendement de la séparation.

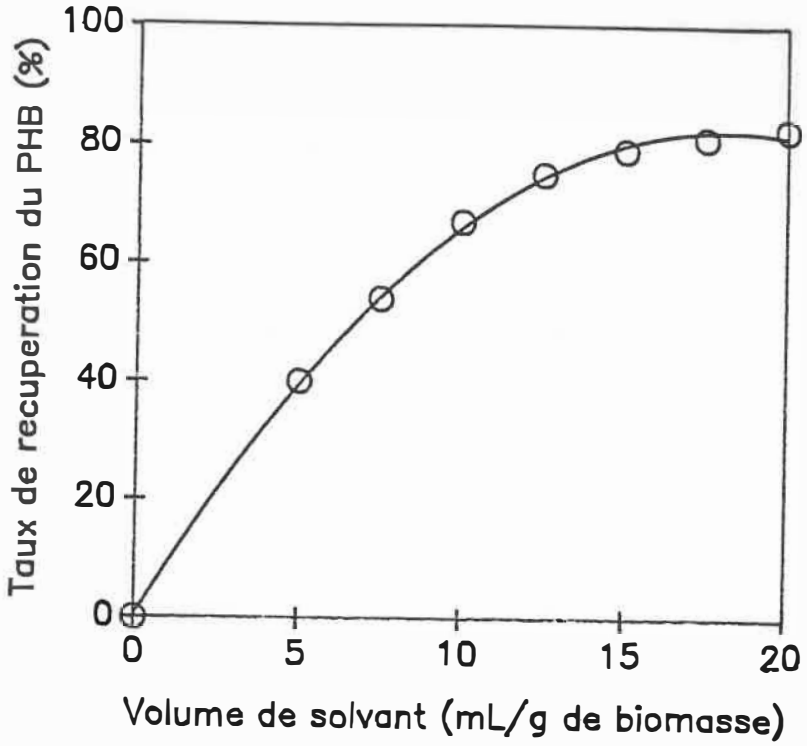
La biomasse est mise en contact durant 24 h dans l'acétone. L'étude a été menée avec un seul solvant: le chloroforme. L'extraction a été menée avec différents volumes de solvant (de 6 à 20 volumes par rapport à la biomasse engagée). Après extraction, le PHB est isolé comme décrit puis analysé selon les procédures décrites .
Le pourcentage de PHB recueilli augmentait avec le volume de chloroforme utilisé jusqu'à ce que ce taux de récupération atteigne 83 % environ (figure IV.2.4). Au delà de cette valeur, le volume de solvant utilisé cessait d'être un facteur limitant.

### IV.2.5. Destination du PHB non-extrait.

Une partie importante du PHB n'ayant pas été récupérée durant l'opération d'extraction, l'analyse des différents effluents d'extraction permet de déterminer leur teneur éventuelle en PHB.

Aprés avoir déterminé le pourcentage de PHB dans la biomasse résiduelle, celle-ci est réextraite dans 10 volumes de chloroforme au reflux sans traitement préalable. Le PHB

**FIGURE IV.2.4. Taux de récupération du PHB en fonction du volume de solvant d'extraction.**




(O) chloroforme au reflux

est isolé selon la procédure décrite avant une nouvelle analyse de PHB sur la biomasse (tableau IV.2.5). Une 3ème extraction et centrifugation est conduite dans les mêmes conditions .

Le PHB est recherché dans les mélanges chloroforme-éthanol issus de la précipitation du PHB. Ces solvants sont éliminés jusqu'à l'extrait sec par un évaporateur rotatif (vide de 20 mm de Hg et bain thermostaté à 60°C). L'extrait sec est récupéré, puis analysé par chromatographie en phase gazeuse selon la procédure décrite pour détecter une présence éventuelle de PHB.

Aucun biopolymère n'a pu être décelé dans les différentes fractions de solvant; la totalité du PHB est demeuré dans la biomasse.

**Tableau IV.2.5: Bilan de masse sur le PHB lors d'une extraction par solvant**

| | PHB (%) | % de PHB dans la biomasse | PHB total (%) |
|---|---|---|---|
| 1ère extraction<br>réextraction | 55<br>20 | 42<br>20 | 96<br>95 |
| PHB récupéré | 75 | 25 | 95 |

Les résultats obtenus sont relativement médiocres car le taux de récupération n'a pas passé le seuil des 75 % . Il est judicieux de considérer l'environnement et la position du PHB dans la cellule. Les granules de biopolymères sont contenus dans une membrane de type non-unitaire à laquelle ils sont fixés par certains sites spécifiques (11). Cette membrane peut rendre le biopolymère moins accessible au solvant, ce qui justifierait les faibles rendements obtenus. On pourrait étayer cette hypothèse par une procédure expérimentale permettant de détruire la paroi et les systèmes membranaires de la cellule. Après prétraitement, une augmentation du rendement d'extraction mettrait en évidence le rôle joué par les systèmes membranaires durant l'extraction.

## IV.2.6. Evolution du PHB en milieu solvant.

### IV.2.6.1. Objectif et introduction.

De nombreuses publications rapportent une dégradation du PHB en milieu solvant, sans donner aucune référence ou valeur permettant de la chiffrer, annonçant seulement qu'elle induit une diminution de poids moléculaire.

On veut caractériser la dégradation en proposant un mécanisme et en évaluant sa vitesse aux températures de 70

et 110°C dans les solvants suivants: chloroforme, chlorure de méthylène et 1,2-dichloréthane.

Le PHB peut s'hydrolyser en libérant des monomères d'acide-ß-hydroxybutyrique (phénomènes de "unzipping"), mais les chaînes peuvent aussi se couper de façon aléatoire avec libération d'oligomères (degré de polymérisation entre 3 et 100) ou de molécules de plus grande taille. La quantité de monomères en solution a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse et la distribution des poids moléculaires par chromatographie à perméation de gel. La chromatographie en phase gazeuse permettait d'évaluer l'importance du phénomène d'hydrolyse par les bouts, alors que la distribution des poids moléculaires met en évidence l'apparition de nouveaux pics, résultats d'autres types d'hydrolyse.

IV.2.6.2. Analyse des concentrations en monomères.

Les concentrations de monomères décelés sont très faibles (environ 0.01 %). Ayant travaillé avec des concentrations de 0.5 % en PHB, on peut relier la quantité de monomères en solution à une quantité équivalente de PHB (tableau IV.2.6.2). Ceci permet d'évaluer le pourcentage de dégradation subie par le PHB, imputable à une hydrolyse par les bouts.

Ces pourcentages étant très faibles, le phénomène de

**Tableau IV.2.6.2: Suivi du PHB en milieu solvant.**

Conc.ac.but.= concentration en acide-ß-hydroxybutyrique
Conc.PHB équiv.(%)= concentration en PHB équivalente à l'acide hydroxybutyrique en solution.
Dimin. pds molec. eq. = diminution de poids moléculaire équivalent au monomère en solution.

| | I.P | Conc.ac.but (%) | Conc. PHB équiv.(%) | Dimin.pds molec. eq |
|---|---|---|---|---|
| Chloroforme T=70°C | | | | |
| 0 h | 5.5 | 0 | 0 | 0 |
| 24 h | 5.8 | 0.0066 | 0.0055 | 13 750 |
| 48 h | 5.4 | 0.0057 | 0.0048 | 12 500 |
| 72 h | 4.6 | 0.0066 | 0.0055 | 13 750 |
| 96 h | 2.2 | 0.0068 | 0.0056 | 13 750 |
| 120 h | 2.3 | 0.0087 | 0.0072 | 18 750 |
| T=110°C | | | | |
| 0 h | 5.6 | 0 | 0 | 0 |
| 24 h | 5 | 0.012 | 0.0099 | 25 000 |
| 48 h | 4.6 | 0.011 | 0.0090 | 21 250 |
| 72 h | 3.6 | 0.011 | 0.0090 | 21 250 |
| 96 h | 3.2 | 0.011 | 0.0091 | 22 000 |
| 120 h | 3.2 | 0.012 | 0.0099 | 25 000 |
| 144 h | 2.4 | 0.021 | 0.0175 | 43 000 |
| Chlorure de méthylène. T=70°C | | | | |
| 0 h | 5.5 | 0 | 0 | 0 |
| 48 h | 6.0 | 0 | 0 | 0 |
| 72 h | 5.8 | 0 | 0 | 0 |
| 96 h | 4.5 | 0 | 0 | 0 |
| 120 h | 4.3 | 0 | 0 | 0 |
| 144 h | 4.2 | 0 | 0 | 0 |
| T=110°C | | | | |
| 0 h | 5.5 | 0 | 0 | 0 |
| 24 h | 5.8 | 0.0053 | 0.0044 | 11 000 |
| 48 h | 5.3 | 0.01 | 0.0083 | 20 500 |
| 72 h | 4.3 | ---- | ---- | ---- |
| 96 h | 3.8 | 0.013 | 0.011 | 27 000 |
| 120 h | 3.6 | 0.0135 | 0.0111 | 28 000 |
| Dichloréthane: T=110°C | | | | |
| 0 h | 5.5 | 0 | 0 | 0 |
| 24 h | 5.6 | 0.0064 | 0.0053 | 12 500 |
| 72 h | 2.9 | 0.013 | 0.011 | 27 500 |
| 96 h | 3.3 | 0.013 | 0.011 | 27 500 |
| 120 h | 2.5 | 0.012 | 0.010 | 25 000 |
| 144 h | 2.1 | 0.0125 | 0.105 | 26 250 |
| 168 h | 3.1 | 0.0136 | 0.0112 | 28 125 |

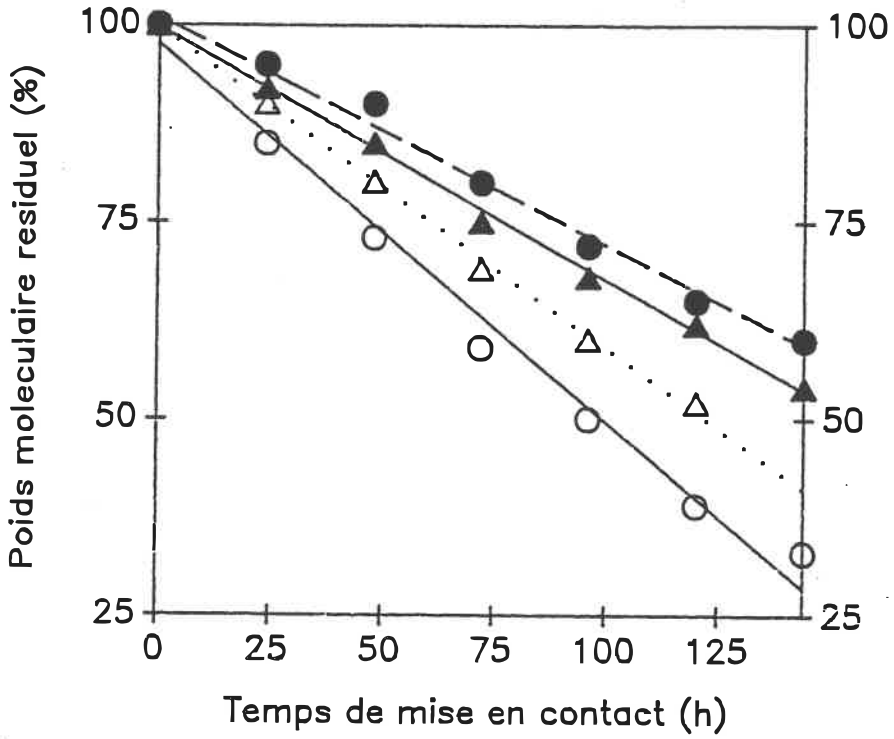
dégradation par les bouts ne constitue qu'un mécanisme de dégradation parallèle et négligeable.

IV.2.6.3. Distribution des poids moléculaires.

Les chromatogrammes montraient un double pic à un temps de rétention d'environ 15 min, qui correspond à des poids moléculaires compris entre 250 et 2000 g/mole. Avec un monomère de masse moléculaire 86 g/mole, ces poids moléculaires correspondent à de petits oligomères présentant des degrés de polymérisation compris entre 3 et 25. Aucun autre pic (hormis le pic du PHB initial) n'a été décelable sur les chromatogrammes, mais la taille du double pic a augmenté avec le temps de mise en contact par rapport au pic de PHB. La figure IV.2.6.3b montre l'évolution du rapport des surfaces entre le pic du aux oligomères et le pic principal du PHB proportionnellement au temps de mise en contact. Hormis pour le dichloréthane à 110°C, le rapport des surfaces des pics suit donc les courbes de poids moléculaires (figure IV.2.6.3a).

La dégradation du PHB se fait par génération d'oligomères présentant des poids moléculaires compris entre 250 et 2 000 g/mole. L'hydrolyse par les bouts est un mécanisme négligeable voire complètement inexistant, les concentrations en monomères décelés pouvant être attribuées

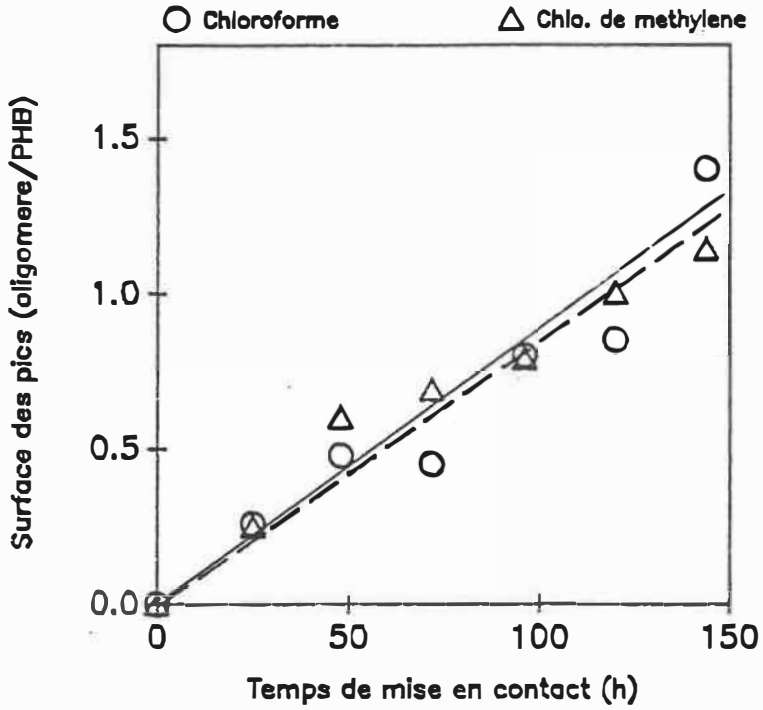
**FIGURE IV.2.6.3a: Poids moléculaire en fonction du temps de mise en contact**

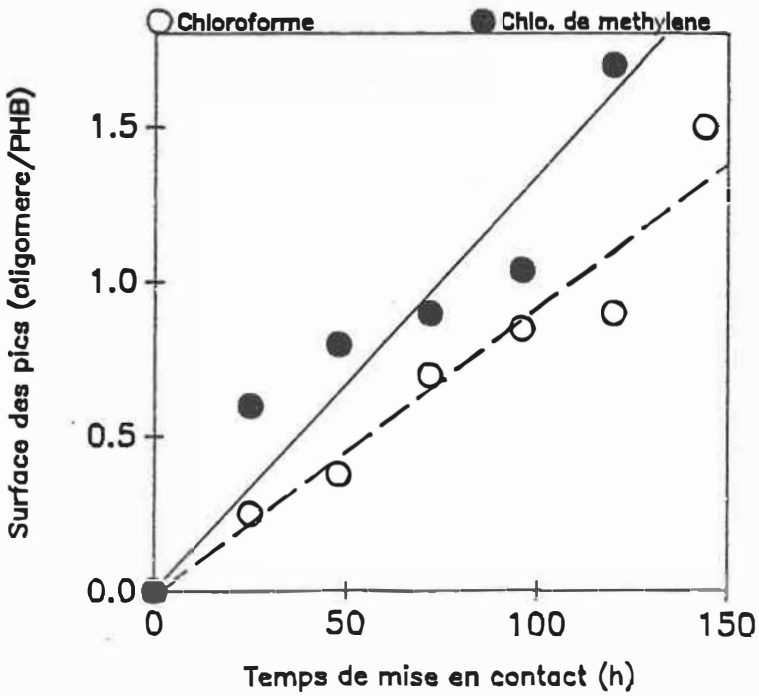



(●) Chloroforme à 70°C (○) Chloroforme à 110°C

(▲) Chlorure de méthylène à 70°C (△) Chlorure de méthylène à 110°C

**FIGURE IV.2.6.3b. Rapport des surfaces d'oligomères et de PHB en fonction du temps de mise en contact.**



à une dégradation des oligomères.

IV.2.6.4. Evolution du poids moléculaire.

Les données présentées à la figure IV.2.6.3 constituent un complément intéressant aux valeurs fournies aux figures IV.2.3. Les profils de dégradation sont linéaires et on ne retrouve pas comme en IV.2.3 un arrêt de la dégradation après quelques minutes de mise en contact. En IV.2.2, on réalisait une extraction de biomasse et le milieu contenait de nombreux constituants autres que le PHB. Ici, le biopolymère pur est mis en solution dans différents solvants.

Lors d'extractions de biomasse (IV.2.2), de nombreuses macromolécules passent en solution et induisent une augmentation de viscosité (55), qui peut limiter les échanges. Pour les études de dégradation, la cinétique n'était influencée par aucun facteur, elle suit une cinétique d'ordre 0 par rapport au temps avec des taux de dégradation, constant dans le temps.

IV.2.6.5. Indice de polydispersité.

Pour chaque chromatogramme, l'indice de polydispersité autour du pic principal de PHB a été mesuré. Le polymère initial présentait un indice de polydispersité d'environ 5.

Pour chaque cas (tableau IV.2.6.2), on note une diminution de l'indice de polydispersité avec le temps.

### IV.2.7. Discussions.

La démarche expérimentale a été guidée par le souci de dégager des paramètres susceptibles de permettre une mise à l'échelle du procédé. L'importance de la température d'extraction, d'un pré-traitement de la biomasse pour les extractions au reflux du solvant, et la quantité de solvant utilisée sur le rendement de l'extraction ont été mis en évidence.

Les extractions à température ambiante permettent d'isoler des polymères de très hauts poids moléculaires, mais ne présente aucun intérêt réel du fait des faibles taux de récupération enregistrés avec chacun des solvants.

Au reflux, le chloroforme et le 1,2-dichloréthane ont des performances semblables, mais très supérieures au chlorure de méthylène. Les données obtenues ne permettent pas de relier le potentiel d'extraction à la température d'ébullition pour un solvant donné. Dans l'optique d'une mise à l'échelle, les coûts en énergie feraient préférer le chloroforme au 1,2-dichloréthane.

Le prétraitement à l'acétone permet une augmentation de

la pureté du PHB et du rendement de séparation. En augmentant le rapport solvant/biomasse, on obtient jusqu'à 82.5 % de rendement. Différents prétraitements sont référencés dans des travaux récents. Après séchage par atomisation à 150°C de la biomasse, des rendements de 98 % ont été rapportés avec des extractions au reflux du 1,2-dichloréthane (rapport solvant/biomasse = 20 ) à partir de biomasse de Methylobacter organophilum (84). Avec des extractions dans le chloroforme à partir de biomasse d'A. eutrophus (préalablement flocculée et laissée au reflux dans le méthanol), Walker et al. (38) atteignent 80 % de récupération en biopolymère avec un rapport solvant/biomasse de 20.

Malgré un prétraitement de la biomasse différent, ces résultats s'accordent bien avec les données présentées. La différence avec les données de Senior (84) est attribuable soit à une meilleure perméabilisation des cellules par un séchage par atomisation à 150°C, soit à la différence des compositions chimiques des parois de A. eutrophus et M. organophilum, une espèce méthanogène.

Dans les solvants au reflux, la dégradation du PHB se fait par libération de petits oligomères en bout de chaîne. Le poids moléculaire varie linéairement avec le temps de mise en contact suggérant une cinétique d'ordre 0, le taux

de dégradation restant constant avec le temps.

Ne récupérant au mieux que 75 % du PHB contenu dans la biomasse, la présence de PHB non-extrait dans la biomasse résiduelle a pu être démontrée. A partir de 80 %, le volume de solvant mis en jeu cessait d'être un facteur limitant pour le rendement.

Les variations de poids moléculaires présentées lors des études de dégradation ne correspondent pas à l'évolution du poids moléculaire obtenue lors des extractions au reflux de différents solvants. Dans ce cas, le poids moléculaire diminue rapidement en début d'extraction, puis se stabilisent après quelques heures de mise en contact. Cela peut s'expliquer par la présence en solution de composés tels des enzymes qui peuvent accélérer l'hydrolyse du biopolymère. De plus, lors des études de dégradation, le PHB est extrait et dissout par le solvant au reflux; l'hypothèse d'une chute de poids moléculaire liée à une dissolution à chaud du polymère est acceptable.

La procédure expérimentale elle-même peut justifier les variations dans les résultats. Pour les études de dégradations, l'échantillon prélevé est utilisé directement pour la mesure de poids moléculaire par chromatographie à perméation de gel. Par contre, après extraction, le polymère est isolé et purifié par précipitation avant d'être

redissout dans le chloroforme pour l'analyse de poids moléculaire. Or, on rapporte que la précipitation de PHB par un non-solvant engendre une diminution importante du poids moléculaire (44). Une partie de la diminution du poids moléculaire est donc attribuable à la technique de récupération du polymère.

Finalement, un mécanisme de dégradation du PHB en milieu solvant a pu être dégagé de ces travaux.

La technique d'extraction par solvants présente un certain intérêt, mais elle se trouve limitée par plusieurs facteurs. La viscosité des milieux post-extraction nécessite l'usage de grandes quantités de solvants car la concentration en biopolymère ne peut guère excéder 5 % . L'usage de procédé à grande échelle demande l'utilisation de grandes quantités de solvants toxiques et explosifs. Les infrastructures inhérentes à la sécurité d'une telle installation et aux opérations de récupération et de traitement des solvants représentent de lourds investissements. En plus, ce mode de séparation ne permet pas une récupération du polymère sous la forme d'une poudre, ce qui engendre des problèmes supplémentaires pour les opérations de mise en oeuvre du polymère notamment pour des mélanges avec d'autres constituants.

## IV.3. Digestion à l'hypochlorite.

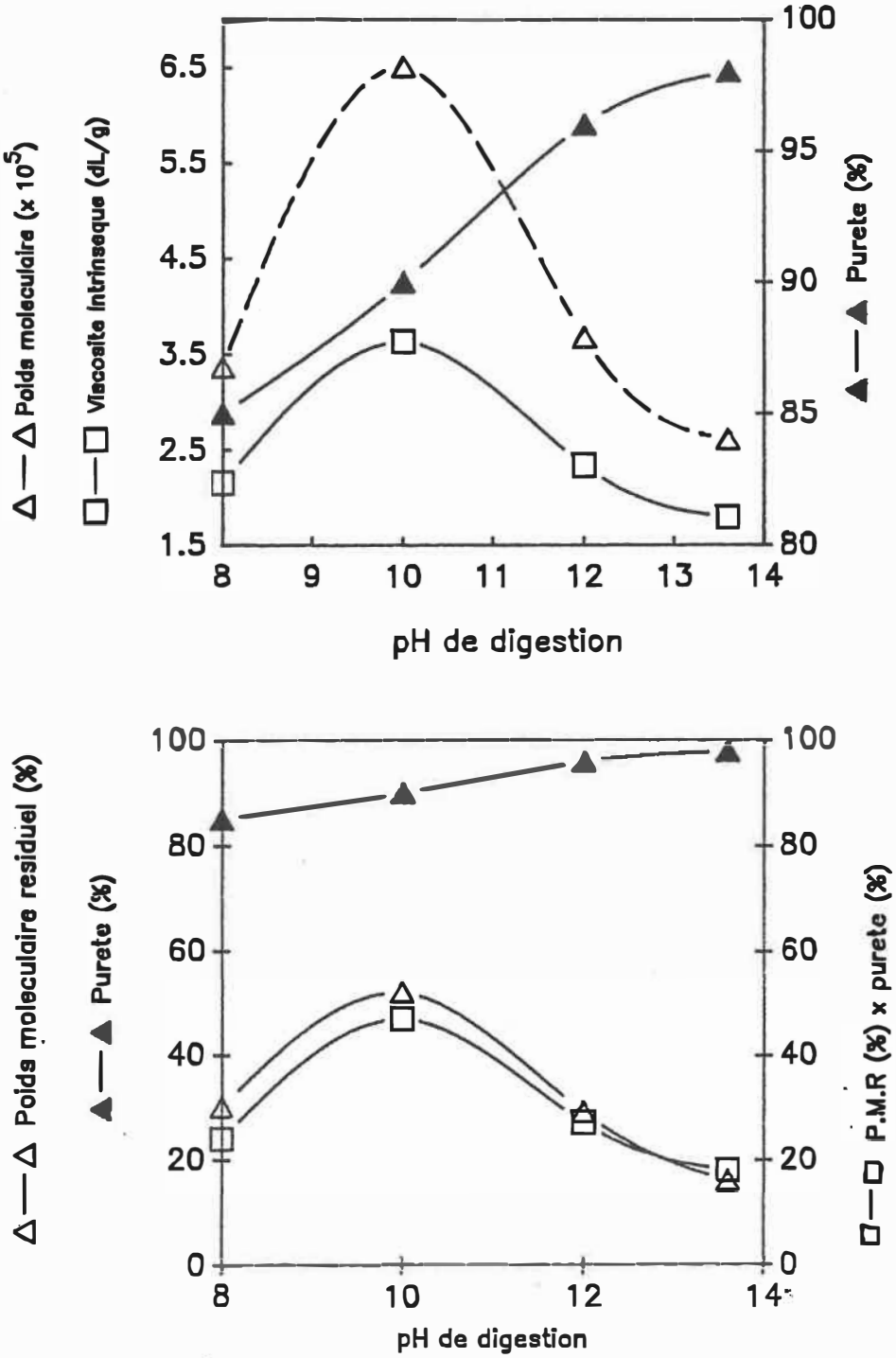
Les influences du pH, de la durée et de la température de digestion ont été étudiées. Le rapport optimal des quantités de biomasse et d'hypochlorite impliquées dans la séparation a été recherché de façon à limiter l'effet délétère de l'hypochlorite sur le PHB.

### IV.3.1. Optimisation du pH.

Quatre solutions de pH différents à 8, 10, 12, 13.6 ont été préparées. Les temps de digestion ont été fixés à 1 ou 2 heures avec une concentration en biomasse dans la solution de digestion égale à 1 % . Après isolation du PHB selon la procédure donnée en III.4.2, on évalue sa pureté par chromatographie en phase gazeuse et son poids moléculaire moyen par chromatographie à perméation de gel.

La figure IV.3.1. exprime la viscosité intrinsèque (en dL/g) et la pureté en fonction du pH après 1 heure de digestion. La pureté du PHB isolé augmente avec le pH de digestion, alors que dans le même temps le poids moléculaire moyen du biopolymère diminue. Un pH de 10 présente le compromis le plus raisonnable (figure IV.3.1) avec une pureté de 90 % et un poids moléculaire de 650 000 soit 55

**FIGURE IV.3.1. Optimisation du pH pour des digestions dans l'hypochlorite.**



% du poids moléculaire initial. En évaluant les poids moléculaires résiduels, les pourcentages de biomasse autre que le PHB et en faisant le produit de ces 2 paramètres, on dégage aisémant le pH le plus avantageux (tableau IV.3.1)

**Tableau IV.3.1: Rendement de séparation et poids moléculaire du PHB isolé en fonction du pH du milieu de digestion.**

| | pH de digestion | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 8 | 10 | 12 | 13.6 |
| Imp. éliminés (%) | 54 | 80 | 80 | 96 |
| Pds molec. resid.(%) | 37 | 55 | 37 | 21 |
| Paramètre 1 | 0.20 | 0.44 | 0.29 | 0.19 |

Paramètre 1 = (Pds molec. resid.(%)) x (Impuretés éliminées (%))

IV.3.2. Evaluation du temps de digestion.

Le pH de la solution de digestion étant fixé à 10, plusieurs séparations avec des temps de digestion inférieurs à 1 heure ont été réalisées avec une concentration en biomasse traitée de 1 % . Le PHB est isolé et analysé comme décrit au paragraphe III.4.2.

On obtient une dégradation très faible du PHB après que l'essentiel des impuretés aient été éliminées avec un poids moléculaire qui demeure presque constant après 60 min de

digestion (tableau IV.3.2). De façon plus pratique, l'essentiel du traitement a lieu dans les 20 premières minutes où 76 % des impuretés sont éliminées. Après 60 min, 90 % des impuretés ont été éliminées et la pureté n'évolue plus de façon notable. Le poids moléculaire du biopolymère diminue rapidement en début de séparation, avant de se stabiliser vers 50 % de sa valeur initiale soit 620 000 g/mole. Un bon compromis se dégage pour des mises en contact de 12 et 20 min (valeur de P1 les plus fortes au tableau IV.3.2).

**Tableau IV.3.2: Optimisation du temps de digestion dans l'hypochlorite.**

| Temps dig. (min) | Pureté (%) | PHB (%) | P.M (x $10^5$ g/mole) | P.M.R (%) | P1 |
|---|---|---|---|---|---|
| 12 | 85 | 89 | 9.6 | 80 | 0.68 |
| 20 | 88 | 90 | 9.2 | 77 | 0.68 |
| 40 | 90 | 90 | 8.1 | 67 | 0.60 |
| 60 | 95 | 93 | 6.5 | 55 | 0.52 |
| 120 | 94 | 90 | 6.0 | 50 | 0.47 |
| 180 | 93 | 88 | 5.9 | 49 | 0.45 |

P1 = (Pureté (%)) x (P.M.R (%))

Deux hypothèses s'imposent:

L'hypochlorite a un effet délétère sur le PHB lorsqu'il dissout les autres constituants cellulaires de la biomasse.

La dégradation du PHB cesse dès que toute la biomasse est éliminée. Au niveau mécanistique, l'attaque des constituants cellulaires par l'hypochlorite pourrait produire dans le milieu un composé, susceptible d'induire une hydrolyse du PHB.

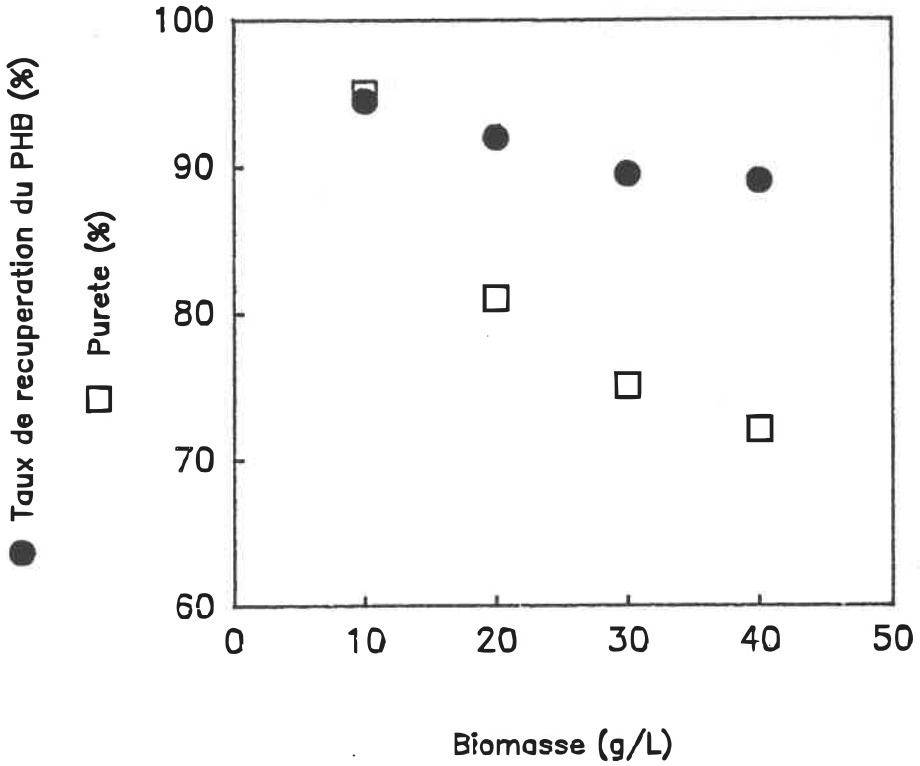
L'hypochlorite n'est plus actif après 60 minutes de mise en contact car il a déjà éliminé du milieu l'essentiel des constituants autres que le PHB. La stabilité du poids moléculaire après 60 minutes de digestion n'est alors imputable qu'à la diminution d'activité de l'hypochlorite.

### IV.3.3. Détermination de la concentration limite en biomasse.

Avec des solutions d'hypochlorite à 5.25 % et pH 10, plusieurs digestions d'une heure ont été réalisées en faisant varier la concentration en biomasse à traiter de 1 à 4 % (10 g/L à 40 g/L) de manière à évaluer le potentiel de séparation de la solution d'hypochlorite. On veut déterminer la diminution de pureté lorsqu'augmente la quantité de biomasse à traiter.

Une augmentation de la concentration en biomasse dans le milieu de digestion induit une diminution de la pureté du biopolymère isolé (figure IV.3.3). Alors que 90 % des

**FIGURE IV.3.3. Pureté du PHB isolé en fonction de la biomasse traitée.**



impuretés sont éliminées après une heure lorsqu'on traite 1 % de biomasse (10 g/L), 44 % seulement des impuretés sont éliminées avec une concentration en biomasse de 4 % . Cette chute de l'efficacité de séparation avec la concentration en biomasse peut s'expliquer par un épuisement du potentiel de dissolution de l'hypochlorite pour des concentrations en biomasse supérieures à 2 % .

Dans le tableau IV.3.3, le pourcentage d'impuretés ayant résisté au traitement à l'hypochlorite a été relié à la concentration de biomasse traitée. En effet, on s'attendait à ce que ce pourcentage des impuretés augmente avec la concentration de biomasse. Le rapport de ces 2 paramètres (Rp) donnent des valeurs variant très peu pour un temps donné, ce qui signifie que le potentiel de l'hypochlorite à dissoudre la biomasse est limité et que, lorsque ses capacités sont dépassées, la biomasse introduite en excès n'est plus soumise à son action. Le pourcentage de PHB récupéré tend à diminuer avec la quantité de biomasse à traiter. Un même protocole expérimental a été suivi pour chaque séparation mais, une plus forte concentration en biomasse augmente la quantité de solides en solution et la viscosité du milieu. Les conditions de centrifugation ayant été identiques, l'augmentation de viscosité n'a pas été compensée, diminuant le pourcentage de PHB récupéré.

**Tableau IV.3.3: Détermination de la concentration limite en biomasse.**

Rp = (Impureté (%) / Conc.biomasse (%))

| Temps dig. (min) | Conc.biomasse (%) | Pureté (%) | PHB (%) | Impureté (%) | Rp |
|---|---|---|---|---|---|
| 20 | 1 | 88 | 98 | 24 | 24 |
| | 2 | 80 | 97 | 40 | 20 |
| | 3 | 75 | 95 | 50 | 19 |
| | 4 | 71 | 86 | 60 | 15 |
| 60 | 1 | 91 | 99 | 16 | 16 |
| | 2 | 82 | 90 | 36 | 18 |
| | 3 | 75 | 90 | 50 | 17 |
| | 4 | 72 | 87 | 56 | 14 |
| 120 | 1 | 95 | 98 | 10 | 10 |
| | 2 | 83 | 90 | 34 | 17 |
| | 3 | 78 | 89 | 44 | 14.5 |
| | 4 | 73 | 84 | 54 | 13.5 |

## IV.3.4. Influence de la température de séparation.

Des digestions avec des solutions d'hypochlorite à 5.25 % et pH 10 sont menées à 0°C avec des flacons agités placés dans des bains de glace fondants. Différents temps de digestion sont testés; on veut vérifier l'effet d'une diminution de la température de digestion sur la dégradation et la perte de poids moléculaire du polymère.

Les résultats des séparations réalisées à 0°C sont

présentés au tableau IV.3.4. En comparant ces valeurs à celles de la figure IV.3.4a, on remarque un taux de digestion plus faible à 0°C avec un poids moléculaire du PHB, qui diminue moins vite. La dissolution et l'élimination des impuretés se font aussi plus lentement.

**Tableau IV.3.4: Caractéristiques du PHB obtenu pour des séparations dans l'hypochlorite réalisées à 0°C**

| Temps dig. (min) | Pureté (%) | PHB (%) | P.M (g/mole) | P.M.R (%) |
|---|---|---|---|---|
| 15 | 72 | 96 | 1 050 000 | 87.5 |
| 20 | 84 | 94 | 980 000 | 82 |
| 40 | 93 | 93 | 880 000 | 74 |
| 60 | 91 | 94 | 820 000 | 68 |

Il existe une ambiguité sur l'avantage à retirer d'une digestion à 0°C.

La figure IV.3.4b compare les efficacités de séparation à température ambiante et à 0°C. La compréhension de la courbe est simplifiée si on exprime les résultats obtenus en fonction du rapport ( % d'impuretés résiduelles/Poids moléculaire résiduel en %). La figure IV.3.4b montre que le comportement est identique aux 2 températures, les 2 courbes étant de forme identique et tendant vers le même minimum.

FIGURE IV.3.4a. Pureté et poids moléculaire en fonction du temps pour des digestions à basse température.

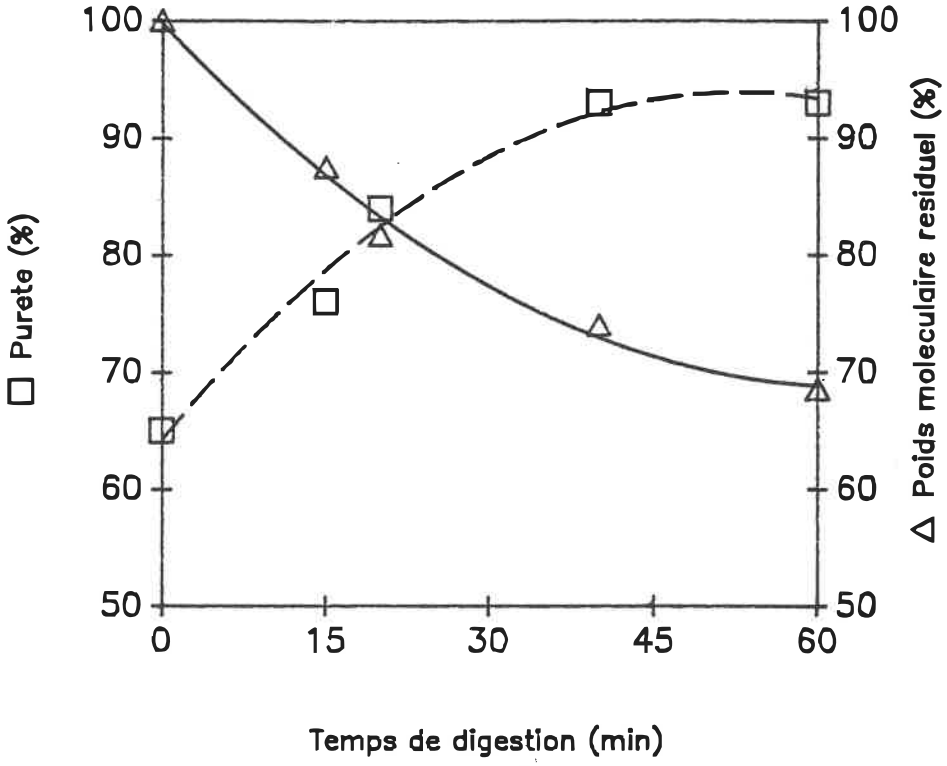
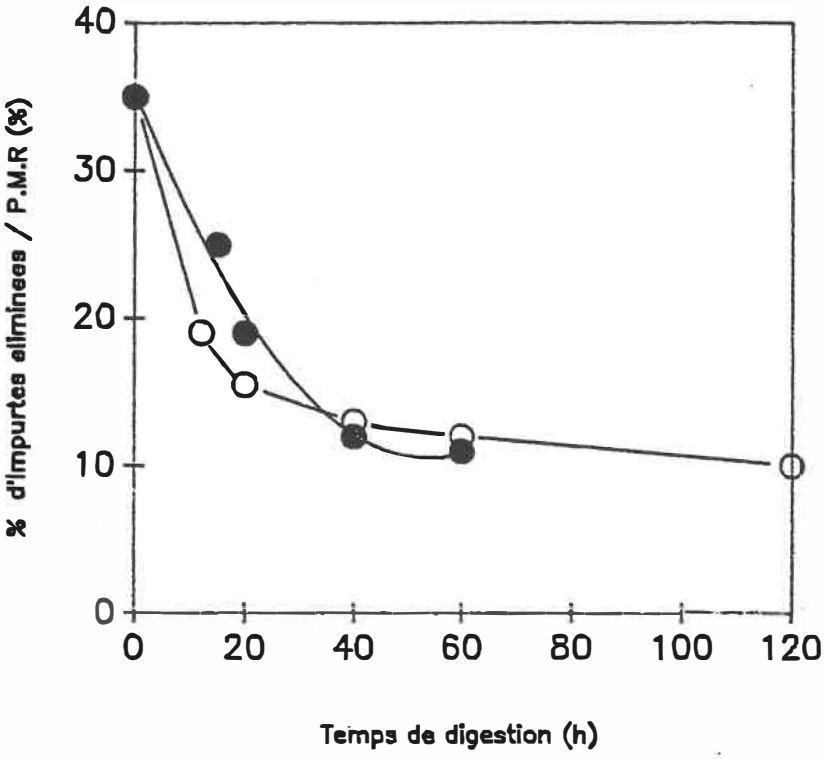


**FIGURE IV.3.4b. Efficacités comparées des séparations par digestion à température ambiante et à 0°C.**




(○) Température de 25°C (●) Température de 0°C

En conclusion, une digestion à 0°C ne présente pas d'avantage, l'obtention de poids moléculaires plus élevés n'est qu'illusoire car elle s'associe à une pureté plus faible et n'est due qu'à un taux de digestion ralenti par une température de digestion plus basse.

### IV.3.5. Etudes complémentaires de l'influence de la concentration en hypochlorite et du temps de digestion sur les caractéristiques du PHB isolé

On veut montrer que l'efficacité de la séparation est directement liée à la quantité d'hypochlorite disponible lors de la séparation.

Dans une première série d'expériences, on travaille avec des concentrations plus élevées pour les solutions d'hypochlorite et avec des temps de digestion variant de 1 à 24 heures. Les durées de digestion étudiées étaient 1, 2, 3, 4 ou 24 heures.

Dans la seconde série d'expériences, le temps de digestion est fixé à une heure, mais les séparations sont effectuées avec des solutions de concentration différente en hypochlorite variant entre 1.05 et 10.5 % .

Pour chaque expérience, la concentration de la biomasse à traiter est fixée à 1 % . Les séparations ont été opérées

à 30°C avec une agitation de 150 rpm.

Les résultats de ces expériences sont présentés à la figure IV.3.5. Au paragraphe IV.3.4, on a vu que, quand la capacité de dissolution de la biomasse par l'hypochlorite s'annule, la pureté n'augmente plus et le poids moléculaire moyen diminue plus lentement puis se stabilise.

A la figure IV.3.5, si on augmente le rapport de la quantité d'hypochlorite sur la masse de biomasse engagée, un taux de diminution plus important du poids moléculaire est obtenu. Celui-ci reste encore fort, même après qu'une pureté de 100 % ait été atteinte.

Par exemple, avec une concentration en hypochlorite de 10.5 % et une concentration de biomasse à traiter de 1 % , moins de 2 heures sont nécessaires pour atteindre une pureté de 100 %, mais le taux de diminution du poids moléculaire reste encore très fort après 5 heures de digestion.

**FIGURE IV.3.5. Influence de la concentration en hypochlorite et du temps de digestion sur le poids moléculaire.**

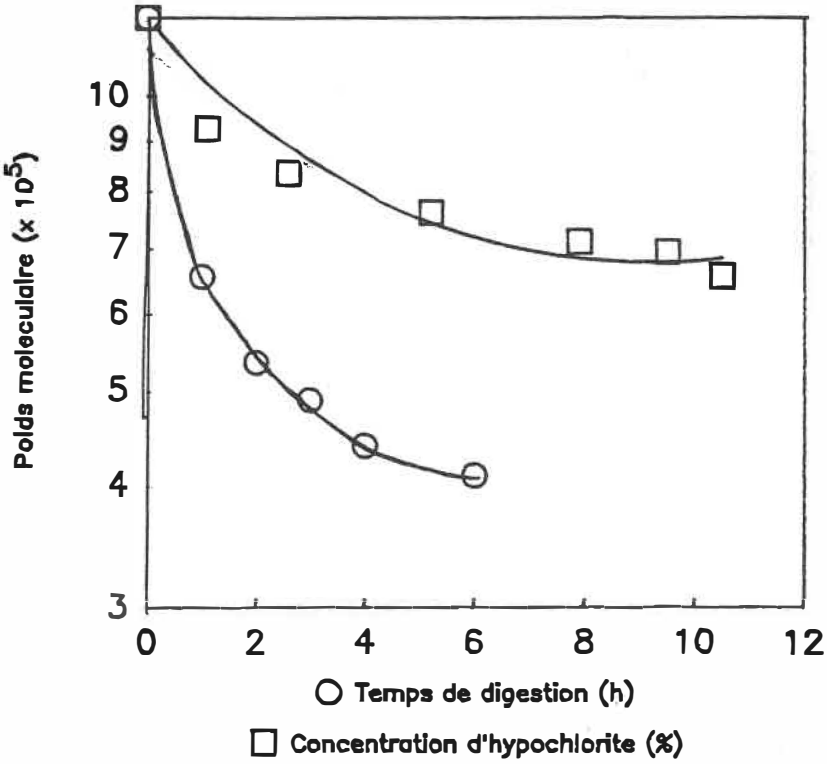


**Tableau IV.3.5a: Variation du poids moléculaire avec le temps de digestion et la concentration en hypochlorite**

Taux = taux de diminution du poids moléculaire résiduel en (%/h)

| | Conc. hypochl. (5.25 %) | | Conc. hypochl.(10.5%) | |
|---|---|---|---|---|
| Temps (h) | Poids molec. (%) | Taux (%/h) | Poids molec. (%) | Taux (%/h) |
| 1 | 54.2 | 45.8 | 54.5 | 45.5 |
| 2 | 51 | 3.2 | 44.6 | 9.9 |
| 3 | 50 | 1.0 | 41.3 | 3.3 |
| 4 | 49.2 | 0.8 | 40.6 | 0.7 |
| 5 | 48.4 | 0.3 | 34.2 | 3.2 |

L'augmentation de concentration en hypochlorite ne résulte pas en une augmentation immédiate du taux de dégradation du PHB, les valeurs aux 2 concentrations étant semblables après 1 heure de digestion. Par contre, à des concentrations en hypochlorite plus élevées, le taux de dégradation reste fort dans la mesure où la quantité de biomasse est insuffisante pour épuiser les capacités de la solution d'hypochlorite.

Au tableau IV.3.5b, au lieu de faire varier le temps de digestion, on augmente la concentration en hypochlorite de 1.1 à 10.5 % tout en maintenant constante la concentration en biomasse. Ces mesures mettent encore en évidence la

relation qui lie la pureté et le poids moléculaire avec la quantité d'hypochlorite mise en jeu. Une concentration plus élevée en hypochlorite induit une plus grande pureté, mais aussi une diminution du poids moléculaire moyen de l'échantillon isolé. En pratique, la dégradation du biopolymère et sa pureté augmentent avec le rapport (hypochlorite/biomasse).

**Tableau IV.3.5b: Taux de diminution du poids moléculaire des échantillons de PHB en fonction des concentrations de biomasse et d'hypochlorite engagées.**

| Rapport 1 (%) | P.M.R (%) | Rapport 2 (%) |
|---|---|---|
| 1.1 | 77 | 30 |
| 2.6 | 69 | 12 |
| 5.2 | 63 | 7 |
| 7.9 | 59 | 5.3 |
| 9.5 | 57.5 | 4.4 |
| 10.5 | 54 | 4.3 |

Rapport 1 = (concentration hypochlorite/ concentration biomasse)

Rapport 2 = (hypochlorite/biomasse)/Taux diminution du poids moléculaire.

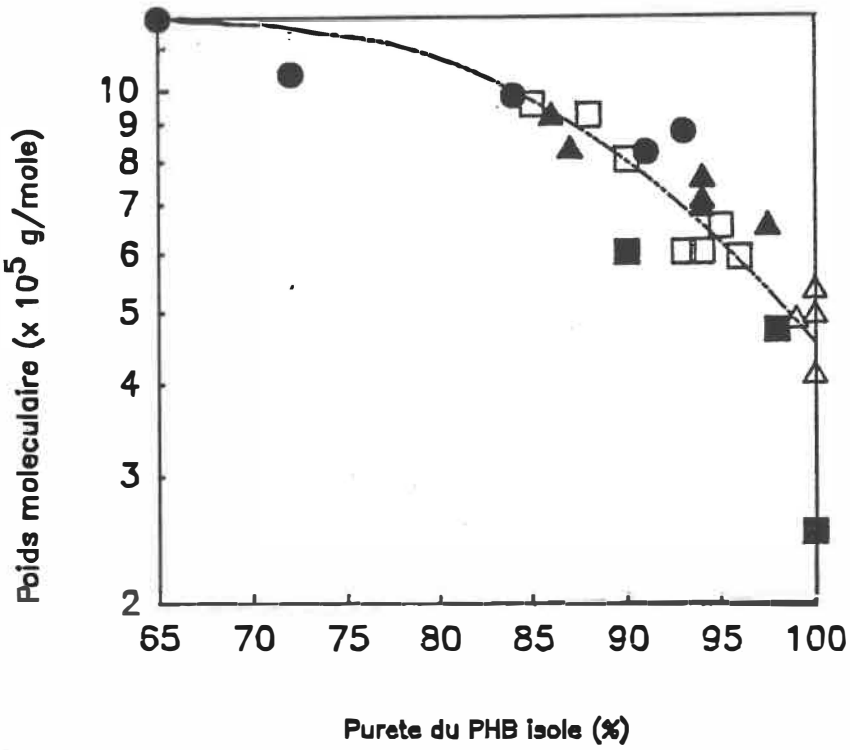
Le rapport 2 n'est pas constant, ce qui montre que le

taux de dégradation du PHB n'est pas proportionnel à la quantité d'hypochlorite engagée. Il existe peut-être un facteur limitant comme la surface ou la forme des granules, qui a été négligé au cours de l'étude.

### IV.3.6. Relation liant pureté et poids moléculaire

A la figure IV.3.6, sont données, sur un graphe donnant la pureté de l'échantillon isolé en fonction de son poids moléculaire, toutes les valeurs expérimentales obtenues par digestion à l'hypochlorite . Une augmentation de concentration en hypochlorite ou une élévation de température augmente le taux de dissolution de la biomasse et la pureté du biopolymère isolé (figure IV.3.6). L'allure de la courbe de régression ainsi que la distribution des points montrent que le poids moléculaire moyen est automatiquement défini quand on connait la pureté. En extrapolant, pour une pureté donnée, un changement des conditions opératoires n'influe pas sur le poids moléculaire moyen. La méthode de séparation proposée est donc adaptable et il est possible de moduler et d'optimiser les conditions opératoires en fonction des propriétés inhérentes au produit désiré. Cette optimisation est nécessaire pour les polymères nécessitant à la fois une pureté élevée et un fort poids

**FIGURE IV.3.6: Poids moléculaire en fonction de la pureté pour toutes les séparations avec hypochlorite.**




(■) C = 10.5 % en fonction du temps.
(△) C = 5.25 % ; T = 20°C
(□) T = 20°C en fonction de la concentration en biomasse
(▲) t = 1 h en fonction de la concentration en hypochlorite
(●) C = 5.25 % ; T = 0°C

moléculaire. Une détermination du rapport (hypochlorite/biomasse) adéquat permet l'obtention d'un polymère aux propriétés spécifiées, si on s'assure d'isoler l'échantillon dès que la pureté désirée est atteinte car la dégradation du PHB se poursuit après obtention de la pureté maximum.

### IV.3.7. Discussions.

Les résultats obtenus sont discutés par rapport à certains travaux et publications disponibles.

En ce qui concerne les poids moléculaires, les faibles valeurs reportées dans la littérature n'ont jamais été atteintes. Ceci peut s'expliquer de plusieurs manières:

Tout d'abord, le poids moléculaire dépend du microorganisme sélectionné et des conditions de fermentation, qui lui ont été imposées. On peut supputer (sans pouvoir le vérifier) que le poids moléculaire initial du PHB utilisé durant nos recherches est supérieur à celui utilisé par d'autres chercheurs. Une telle allégation est d'autant plus invérifiable que peu de travaux établissent des comparaisons entre différentes méthodes de séparation. Lundgren et ses collaborateurs (49) ont comparé, par mesure de viscosité, les poids moléculaires d'échantillons de PHB

obtenus par extraction au chloroforme et par digestion à l'hypochlorite. Les échantillons étaient issus de Bacillus megaterium et Rhodospirillum rubrum. Pour cette dernière espèce, les échantillons isolés par digestion à l'hypochlorite présentent des poids moléculaires inférieurs à ceux obtenus par extraction au chloroforme, alors qu'on obtient le résultat contraire pour le PHB de B. megaterium. En conclusion, les auteurs ont considéré que l'extraction au chloroforme induisait des dégradations moins importantes pour le polymère.

La seconde raison pouvant avoir une influence est liée aux traitements dont la biomasse a fait objet avant l'étape de séparation. Isolant le PHB d'Azotobacter chroococcum, Nuti et ses collaborateurs (50) ont obtenu des poids moléculaires 5 fois plus élevés à partir de biomasse lyophilisée en comparaison à la même biomasse humide directement issue de fermentation. Il est à signaler, qu'au cours d'autres travaux, P. Simon (communication personnelle) a mis en évidence un comportement similaire chez A. eutrophus lors d'extraction par le chloroforme à température ambiante. Après avoir isolé un polymère présentant un poids moléculaire de 1 150 000 g/mole à partir de biomasse lyophilisée. il n'obtint, pour des conditions similaires de séparation qu'un poids moléculaire de 570 000 g/mole à

partir de biomasse humide.

Enfin, dans certains travaux datant de plus de 20 ans, on note certaines erreurs dans l'évaluation du poids moléculaire à partir de la viscosité intrinsèque. Aussi bien pour Nuti et al (49) que pour Lundgren et al (50), l'évaluation des poids moléculaires a été réalisée à partir d'une relation linéaire entre n et le poids moléculaire Mv. Ces calculs sont donc en partie erronés dans la mesure où la relation entre ces paramètres n'est pas linéaire, mais représentée par l'expression suivante connue sous le nom d'équation de Mark-Houwink: $n = K \times Mv^a$ où K et a sont des constantes.

En utilisant les valeurs de K et a disponibles (80), les données fournies par Lundgren et Nuti diffèrent de celles données par l'équation de Mark-Houwink d'un facteur 2 ou plus. Dans les travaux réalisés sur A. chroococcum, on reporte un poids moléculaire de 57,000 pour une viscosité intrinsèque de 2.5 dL/g alors que la valeur déterminée à partir de l'équation de Mark-Houwink est environ 350,000.

En conclusion, la méthode d'isolation à l'hypochlorite n'est pas aussi préjudiciable qu'on pouvait le supposer pour le PHB, à condition d'optimiser les conditions de digestion. L'étude ne visait pas à dégager une méthode absolue de séparation du PHB mais plutôt à définir les variables, qui

influaient sur les trois paramètres de sélection retenus: la pureté, le poids moléculaire et le pourcentage de PHB isolé.

En dégageant ainsi des idées directrices, le lecteur se voit offrir une gamme de paramètres et de relations qu'il peut moduler à loisir en fonction des caractéristiques et des propriétés qu'il veut attribuer au polymère qu'il désire.

## IV.4. Séparation mettant en jeu un détergent.

Des digestions avec le détergent Tide$^{R}$ ont été effectuées. En combinant l'action du détergent à un rinçage à l'hypochlorite, la séparation est beaucoup plus efficace. Trois détergents commerciaux ont été testés avec des réussites diverses. Enfin, l'action d'ADNase a permis de diminuer la viscosité des milieux après digestion avec un détergent.

### IV.4.1. Séparation du PHB par le détergent TIDE.

Le tableau IV.4.1a montre que la pureté du polymère isolé varie avec la concentration en surfactant.

Malgré des rendements de séparation un peu faibles, les

résultats sont encourageants car le biopolymère semble ne subir aucun dommage lors de la séparation; il présente un poids moléculaire très élevé, comparable au poids moléculaire initial.

**Tableau IV.4.1a: Séparations à différentes concentrations de détergent Tide[R].**

Les digestions ont été réalisées à pH 10.

| | Concentration surfactant (% soit g/100mL) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
| Pureté (%) | 81 | 85 | 85 | 91 |
| PHB (%) | 68 | 54 | 60 | 51 |
| P.M(kg/mole) | 1169 | 1210 | 1158 | 1140 |
| P.M.R (%) | 93.5 | 97 | 92.5 | 90 |

Lorsque la concentration en surfactant est maintenue constante et qu'on fait varier le pH, la pureté augmente avec le pH (tableau IV.4.1b). Le rendement de séparation et le poids moléculaire moyen sont peu sensibles au pH, on ne note pas de diminution véritablement sensible du poids moléculaire moyen lors de l'élévation de pH, imputable à une hydrolyse du polymère.

**Tableau IV.4.1b: Variation des caractéristiques du PHB en fonction du pH de séparation**

La concentration en biomasse est de 1 % .

| | pH de digestion | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 7 | 9 | 10 | 11 |
| Pureté (%) | 8 | 82 | 85 | 90 |
| PHB (%) | 63 | 66 | 60 | 60 |
| P.M. (kg/mol) | 1150 | 1170 | 1160 | 1120 |
| P.M.R. (%) | 92 | 93 | 93 | 90 |

En conclusion à ces premières expériences dont on peut trouver toutes les données au tableau IV.4.1, on retient l'aptitude du détergent à dissoudre la biomasse tout en préservant les propriétés du polymère. La perte de polymère est importante, il apparaît indispensable d'optimiser la procédure de séparation de manière à augmenter la pureté et le rendement d'extraction. Le poids moléculaire ne variant pas de façon notable avec les conditions d'opération, l'évaluation des méthodes peut être faite par le rapport:

(% d'impuretés éliminées)/(% de biopolymère perdu)

Sachant que la biomasse contient initialement 50 % de PHB, le pourcentage d'impuretés éliminées est défini comme:

$$2 \times (\text{Pureté} - 50)$$

**Tableau IV.4.1: Séparation de PHB par le détergent "TIDE".**

Digestion à pH 7

| | Concentration en surfactant (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
| Pureté (%) | 77 | 77 | 78 | 80 |
| PHB (%) | 85 | 78 | 70 | 65 |
| P.M (kg/mole) | 1157 | 1050 | 1070 | 1002 |
| P.M.R (%) | 92.5 | 84 | 86 | 80 |

Digestion à pH 9

| | Concentration en surfactant (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
| Pureté (%) | 81 | 82 | 83 | 85 |
| PHB (%) | 83 | 75 | 73 | 65 |
| P.M (kg/mole) | 1150 | 1110 | 1040 | 990 |
| P.M.R (%) | 92 | 89 | 84 | 79 |

Digestions à pH 10.

| | Concentration en surfactant (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
| Pureté (%) | 81 | 85 | 85 | 91 |
| PHB (% ) | 80 | 78 | 75 | 65 |
| P.M (kg/mole) | 1169 | 1210 | 1158 | 1140 |
| P.M.R (%) | 93.5 | 97 | 92.5 | 90 |

Digestion à pH 11.

| | Concentration en surfactant (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 |
| Pureté (%) | 82 | 85 | 88 | 90 |
| PHB (%) | 84 | 73 | 72 | 68 |
| P.M (kg/mole) | 1005 | 960 | 945 | 910 |
| P.M.R (%) | 81 | 77 | 76 | 73 |

Le pourcentage de biopolymère perdu est donné par:

100 - % de PHB récupéré.

Les résultats du tableau IV.4.1b peuvent être illustrés avec ce nouveau paramètre:

| | pH de digestion | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 7 | 9 | 10 | 11 |
| % d'imp. élim. | 56 | 64 | 70 | 76 |
| % polym. perdu | 30 | 27 | 25 | 28 |
| Rapport | 1.9 | 2.4 | 2.8 | 2.7 |

## IV.4.2. Séparation du PHB par action combinée de détergent et d'hypochlorite.

### IV.4.2.1. Séparation par détergent et hypochlorite.

Dans la revue bibliographique, on peut voir que les détergents sont actifs vis-à-vis des lipides et des protéïnes cellulaires, mais pas vis-à-vis des acides nucléïques.

Ayant obtenu des résultats satisfaisants avec respectivement le détergent et l'hypochlorite, l'idée de coupler les actions des 2 composés en traitant la biomasse consécutivement par le détergent et l'hypochlorite semblait prometteuse.

L'utilisation consécutive de ces 2 traitements nécessitait auparavant d'optimiser la durée du traitement avec le détergent. Les expériences ont été réalisées à pH 8 et pH 10 en travaillant avec des concentrations de détergent à 0.5 et 1 % et des temps de digestion de 15, 30 et 45 min. A l'issue de ce traitement, le PHA est isolé comme décrit en III.5.1. En évaluant la pureté de chaque échantillon et la masse de PHA recueillie, on peut évaluer l'efficacité du traitement en fonction du temps.

**Tableau IV.4.2.1a: Effet du temps de traitement pour des séparations avec le détergent "Tide"**

| | Temps de séparation (min) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 10 | 15 | 30 | 60 |
| Pureté (%) | 76 | 83 | 86 | 87 |
| PHB (%) | 64 | 65 | 62 | 63 |

Les données restent constantes après 15 min de mise en contact; la pureté n'évolue alors plus de façon appréciable. Le temps de traitement au détergent a alors été fixé à 15 min pour les expériences subséquentes. La 1ère étape de séparation au détergent Tide$^{R}$ a été réalisée à différentes concentrations (0.125 %, 0.25 %, 0.5 %, 1 % et 2 %) et pour

chacune trois pH (8, 9, 10) ont été testés. L'hypochlorite ne constituant qu'un traitement complémentaire à la purification par le détergent, sa concentration et son pH ont été maintenus constants à 5.25 % et pH 10 (voir IV.3) pour toutes les expériences. Les résultats complets sont présentés au tableau IV.4.2.1.

La combinaison des traitements au détergent et à l'hypochlorite permet la réalisation d'une partie des objectifs fixés. Dans tous les cas, la pureté dépasse 95 % avec un poids moléculaire supérieur à 80 % du poids moléculaire initial soit plus de 1 000 000 g/mole.

Les rendements de séparation ne fluctuent pas en fonction des différents paramètres étudiés (pH, concentration en détergent) et demeurent compris entre 65 et 70 % . Une telle stabilité des valeurs suggère que ces rendements sont dus à un paramètre inhérent à la procédure de séparation elle-même, qui n'a pas été considéré au cours de l'étude. Le paragraphe IV.4.3 visent, par des expériences supplémentaires, à déterminer la cause des faibles rendements obtenus.

IV.4.2.2. Séparation avec hypochlorite puis détergent.

Quand plusieurs réactifs sont utilisés consécutivement, il est nécessaire d'évaluer l'influence de l'ordre des

**Tableau IV.4.2.1: Séparation par détergent TIDE puis hypochlorite**

Rp 1 = (% d'impuretés éliminées) / (% de PHB perdu).

| Conc. det. (%) | pH digestion | Pureté (%) | PHB (%) | P.M.R (%) | Rp 1 |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 9 | 95 | 66 | 90 | 2.7 |
| | 10 | 95 | 64 | 90 | 2.5 |
| 1 | 9 | 94 | 65 | 85 | 2.5 |
| | 10 | 94 | 58 | 86 | 2.5 |
| 0.5 | 8 | 95 | 67 | 85 | 2.7 |
| | 9 | 92 | 65 | 88 | 2.4 |
| | 10 | 96 | 62 | 88 | 2.4 |
| 0.25 | 8 | 97 | 67 | 88 | 2.8 |
| | 9 | 97 | 68 | 92 | 3.0 |
| | 10 | 97 | 60 | 88 | 2.2 |
| 0.125 | 8 | 95 | 67 | 92 | 2.7 |
| | 9 | 96 | 67 | 92 | 2.8 |
| | 10 | 97 | 68 | 92 | 3.0 |

réactifs sur les paramètres mesurés. Ici, l'influence de l'ordre des réactifs a été évaluée en traitant la biomasse par l'hypochlorite avant d'utiliser le détergent. Des séparations ont été réalisées avec des solutions d'hypochlorite de concentration 5.25 % et de pH 10 et avec des solutions de détergent concentrées à 0.25 %, 0.5 %, 1 % , et 2 % et de pH 9 et 10. La procédure consiste à ajouter 1 g de biomasse à 50 mL de solution d'hypochlorite, à agiter la suspension durant 1 min avant d'éliminer l'hypochlorite par centrifugation durant 15 min à 4000 x g. Le résidu est rincé 2 fois avant d'être ajouté à 100 mL de solution de détergent; la mise en contact dure 15 min à 30°C avec une agitation de 150 rpm. Le PHA est alors isolé. Le pourcentage de PHB recueilli (pureté x masse de PHB recueilli) et le poids moléculaire sont évalués à partir des échantillons.

L'inversion des réactifs contribue à diminuer la pureté des échantillons et influe négativement sur le rendement de séparation (tableau IV.4.2.2).

**Tableau IV.4.2.2: Séparation de PHB par traitement à l'hypochlorite suivi d'un traitement par détergent Tide[R]**

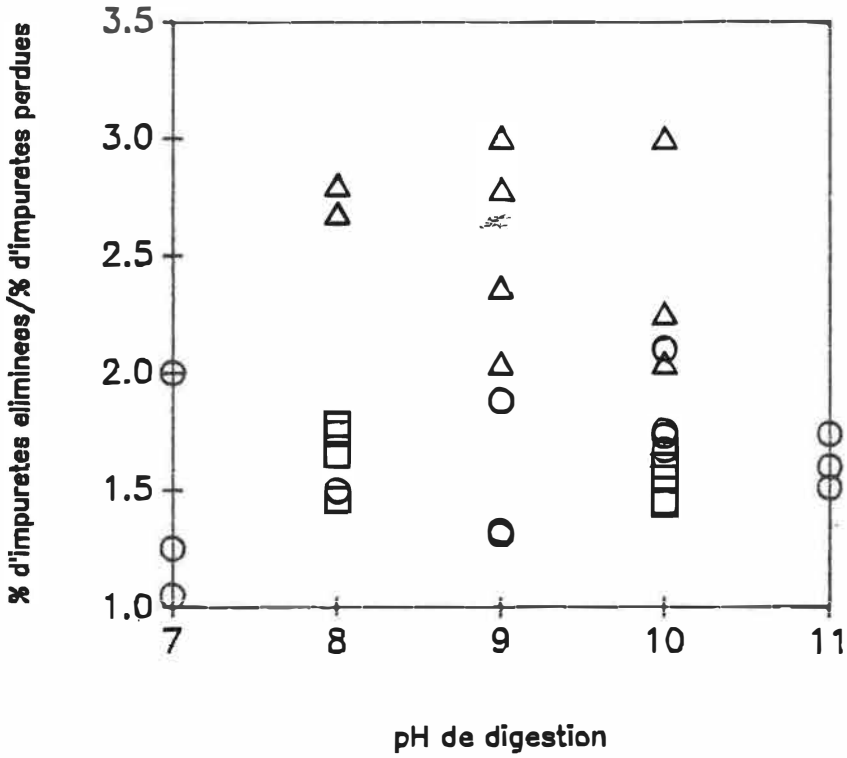
| Conc.detgt (%) | pH dig | Pureté (%) | PHB (%) | P.M.R (%) | Rp1 |
|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 8<br>10 | 89<br>90 | 53<br>45 | 98<br>94 | 1.65<br>1.45 |
| 1 | 8<br>10 | 90<br>89 | 54<br>46 | 99<br>96 | 1.74<br>1.42 |
| 0.5 | 8<br>10 | 91<br>90 | 54<br>51 | 86<br>90 | 1.78<br>1.6 |
| 0.25 | 8<br>10 | 86<br>88 | 52<br>51 | 88<br>92.5 | 1.46<br>1.55 |

Rp1 = (% d'impuretés éliminées) / (% de PHB perdu)

En comparaison aux résultats obtenus au tableau IV.4.2.1, le rapport du pourcentage d'impuretés éliminées sur le PHB perdu est plus faible (figure IV.4.2.2), ce qui est le signe d'une séparation moins efficace. Si on suppose que le détergent peut dissoudre le biopolymère, un rendement de séparation de 50-55 % s'explique par le fait qu'après le traitement à l'hypochlorite, une partie des impuretés ayant été éliminées, les granules de polymère soient plus dégagés et puissent être plus sensibles à l'action du détergent.

Cette hypothèse ne tient pas bien lorsqu'on considère les poids moléculaires obtenus qui montre un maintien de

FIGURE IV.4.2.2. Efficacités de différents types de séparations avec détergent.




(O) Séparation avec détergent
(Δ) Séparation avec détergent puis hypochlorite
(□) Séparation avec hypochlorite puis détergent

l'intégrité du polymère après la séparation. Le plus faible taux de récupération du PHB est plutôt imputable à une moins bonne purification du polymère lors de la séquence hypochlorite puis détergent.

Les détergents et surfactants sont actifs contre la paroi bactérienne dans la mesure où ils solubilisent les lipides et les protéïnes cytoplasmiques (82). Dans la procédure initiale, après que le détergent ait perméabilisé la paroi, l'hypochlorite pouvait éliminer les structures plus résistantes comme les acides nucléïques ou certaines grosses protéïnes.

Du fait de l'inversion de l'ordre des réactifs, l'hypochlorite attaque les structures membranaires, alors que le détergent n'est ensuite plus capable d'éliminer des structures plus résistantes, qui demeurent en solution.

En conclusion, la séquence détergent puis hypochlorite est beaucoup plus intéressante. De plus, dans l'optique d'une mise à l'échelle de la procédure de séparation, l'hypochlorite présentant un risque de pollution important, un procédé de séparation peut consister en une première étape avec un détergent où l'essentiel des constituants cellulaires sont éliminés suivi d'un lavage complémentaire au cours duquel l'hypochlorite élimine les impuretés restantes.

IV.4.2.3. Contribution du traitement par détergent à la purification du biopolymère dans le procédé de séparation combinant détergent et hypochlorite.

Pour déterminer la contribution de chacun des 2 traitements au processus de purification du PHB, des séparations par mise en contact de 15 min ont été réalisées dans des solutions de "Tide" à 1 % (1 g/100 mL) pour différents pH. La quantité de biomasse à traiter était de 1 % . Le seul paramètre évalué au cours de l'étude était la pureté du polymère isolé.

**Tableau IV.4.2.3: Pureté du biopolymère après le seul traitement au détergent Tide$^{R}$.**

Concentration en biomasse: 1 %

| Conc. en détergent (% soit g/100 ml) | pH digestion | Pureté (%) |
|---|---|---|
| 2 | 8<br>9 | 90<br>87 |
| 1 | 8<br>9<br>10 | 87<br>88<br>87 |
| 0.5 | 8<br>9<br>10 | 78<br>76<br>82 |
| 0.25 | 8<br>9 | 75<br>77 |

L'étude (tableau IV.4.2.3) montre que la contribution du détergent dans une procédure de séparation est prépondérante. Avec des concentrations en détergent de 1 et 2 % , l'influence de l'hypochlorite est moindre dans la mesure où il agit pour éliminer les constituants résiduels. Les résultats du tableau IV.4.2.1 mettent en évidence l'invariabilité de la pureté avec les paramètres de séparation. Cette constance des valeurs montre que l'hypochlorite corrige l'action préalable du traitement au détergent et élimine tous les constituants demeurés dans le milieu. Si le potentiel de l'hypochlorite est pleinement utilisé pour les séparations effectuées avec de faibles concentrations en détergent, il n'en est pas de même, lorsque les concentrations en détergent atteignent 1 ou 2 % car, avant traitement à l'hypochlorite, le polymère présente une pureté de 90 % .

L'avantage à tirer de ces travaux, est la possibilité de favoriser l'élimination des impuretés par le détergent et de limiter la quantité d'hypochlorite engagée.

Une étude visant à optimiser la quantité d'hypochlorite requise permettrait d'abaisser le coût de la séparation tout en rendant le procédé moins polluant.

## IV.4.3. Tests sur d'autres surfactants commerciaux.

### IV.4.3.1. Séparation par des surfactants commerciaux

Au cours de la revue bibliographique, trois types de surfactants ont été décrits. Pour ces travaux, un des éléments les plus utilisés de chacune des familles a été sélectionné. Comme détergent cationique, le sel de sodium du sulfate de dodecyl, principe actif du détergent Tide a été utilisé. Parmi les surfactants anioniques, le CETAB (bromure de cétyltriméthylammonium) a été sélectionné et, pour les surfactants non-ioniques, le choix s'est porté sur le Triton X-100, produit sur lequel le plus grand nombre d'informations sont disponibles.

Le potentiel de séparation de chacun de ces détergents a été testé en réalisant des digestions de 15 min à température ambiante (25°C) avec une concentration en biomasse de 1 % (10 g/L). Pour chaque détergent, des essais sont faits à plusieurs concentrations, dont une est inférieure à la concentration micellaire critique (CMC). Différents pH sont également testés de façon à déterminer des conditions d'opération optimales. La procédure est semblable à celle décrite en III.5.1 pour les séparations avec le détergent commercial Tide. La masse de l'échantillon

isolé est pesée, sa pureté évaluée par chromatographie en phase gazeuse et son poids moléculaire mesuré par chromatographie à perméation de gel.

Les résultats de ces expériences sont présentés au tableau IV.4.3 à la page suivante.

Pour les séparations avec le sodium dodecyl sulfate (S.D.S), la pureté du produit isolé varie avec la concentration de S.D.S impliquée, mais ne change pas avec le pH de digestion. Elle passe de 90 à 71 % lorsque le rapport des masses de biomasse et de détergent engagées passent de 1 à 40. Le résultat à 71 % est encourageant dans la mesure où la concentration de détergent engagé pour cette expérience est inférieure à la concentration micellaire minimum, valeur en dessous de laquelle le détergent n'a plus la propriété de former des micelles, force motrice pour l'élimination des impuretés.

Une augmentation de la concentration en détergent abaisse le pourcentage de PHB récupéré. Cette baisse de rendement est imputable soit à une dissolution du PHB par le détergent, soit à une plus forte viscosité du milieu, qui n'a pas été compensée par une centrifugation à haute vitesse. Les poids moléculaires des échantillons isolés sont très voisins du poids moléculaire initial, le détergent

**Tableau IV.4.3: Séparation à l'aide de différents détergents commerciaux.**

1)- Détergent sodium dodecyl sulfate (S.D.S):

| Conc. détergent (% soit g/100mL) | pH dig. | Pureté (%) | PHB (%) | P.M.R (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 7<br>8<br>9 | 90<br>89<br>90 | 50<br>52<br>51 | 98<br>98<br>98 |
| 0.2 | 7<br>8<br>9 | 85<br>83<br>85 | 55<br>56<br>55 | 99<br>98<br>98 |
| 0.1 | 7<br>8 | 83<br>85 | 60<br>61 | 90<br>95 |
| 0.025 | 7<br>8 | 71<br>68 | 68<br>72 | --<br>-- |

2)- Détergent bromure de cétyl méthyl ammonium (CETAB):

| Conc. détergent (% soit g/100ml) | pH dig. | Pureté (%) | PHB (%) | P.M.R (%) |
|---|---|---|---|---|
| 3 | 7<br>8<br>9 | 60<br>54<br>58 | 90<br>93<br>88 | 94<br>----<br>---- |
| 2 | 7<br>8 | 60<br>67 | 89<br>90 | 84<br>87 |
| 0.2 | 7<br>8<br>9 | 63<br>60<br>68 | 90<br>91<br>93 | ----<br>----<br>---- |
| 0.035 | 7<br>8<br>9 | 58<br>60<br>62 | 90<br>90<br>92 | ----<br>----<br>---- |

3)- Détergent TRITON X-100.

| Conc. détergent (% soit g/100ml) | pH dig. | Pureté (%) | PHB (%) | P.M.R (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 7<br>8<br>9<br>12<br>13<br>14 | 50<br>56<br>62<br>74<br>90<br>92 | 69<br>72<br>74<br>70<br>65<br>67 | ----<br>----<br>----<br>91<br>98<br>98 |
| 0.2 | 14 | 92 | 65 | 96 |

conserve donc son intégrité; la baisse du taux de récupération peut difficilement s'expliquer par une dissolution du PHB par le détergent à moins de songer à une improbable dissolution du granule lui-même. Par contre, des concentrations plus élevées de détergent dans le milieu de digestion induisent des viscosités plus élevées, également imputables à la dissolution des constituants cellulaires macromoléculaires dans le milieu.

Les résultats des séparations au bromure de cétyltriméthylammonium (CETAB) sont caractérisées par des poids moléculaires et des pourcentages de PHB récupérés élevés, mais aussi par des puretés médiocres. Les forts rendements de séparation s'expliquent par l'action très limitée du CETAB sur la biomasse, les caractéristiques du milieu de digestion varient peu, facilitant la récupération. Etant un composé toxique et tératogène, le CETAB ne présente pas de propriétés intéressantes.

Pour des pH de 7 à 10, le comportement de TRITON X-100 est comparable à celui du bromure de cétyltriméthylammonium avec des puretés médiocres et une récupération presque totale du PHB engagé. Par contre, en travaillant à des pH voisin de 14, on retrouve le comportement du S.D.S avec une pureté supérieure à 90 % .

Des trois surfactants testés, seulement deux présentent un comportement intéressant: le S.D.S et le Triton X-100.

IV.4.3.2. Action des détergents sur les PHA.

Il est important de déterminer la cause des faibles taux de récupération constatés en caractérisant le comportement des composés Triton X-100, S.D.S et Tide vis à vis d'échantillons de PHA et de PHB. Le PHA utilisé est un échantillon de P(HB-HV) provenant d'I.C.I à 9 % en hydroxyvalérate. Le PHB est semblable à celui utilisé précédemment et il présente une pureté de 90 % avec un poids moléculaire de 1 200 000 g/mole. L'expérimentation consiste à mettre le biopolymère en contact avec des solutions de détergent (125 mg de biopolymère pour 50 mL de solution) durant 15 min avant d'opérer une élimination du détergent par centrifugation à 12 000 rpm durant 10 min. Le culot est remis en suspension dans 50 mL d'eau avant d'être à nouveau centrifugé. L'eau est éliminée et l'échantillon est séché durant 24 h à 75°C. La masse de biopolymère résiduel est mesurée en fin de traitement de manière à déceler une éventuelle action du détergent.

**Tableau IV.4.3a: Proportion de biopolymère dissout lors du traitement au détergent.**

| Solvant | Concent. solvant | % de polymère disparu | |
|---|---|---|---|
| | | PHA (I.C.I) | PHB |
| S.D.S | 0.1 % | 1.9 % | 1 % |
| S.D.S | 0.25 % | 5 % | 1.5 % |
| S.D.S | 0.5 % | 3 % | 1.7 % |
| S.D.S | 0.75 % | 1.2 % | 1.7 % |
| Tide | 1 % | 3.75 % | 2.3 % |
| Tide | 2 % | 3.5 % | 2.2 % |
| Triton | 0.1 % | 1.2 % | 0.8 % |
| Triton | 0.2 % | 4 % | 1 % |

La dissolution décelée de la part du détergent sur le biopolymère est très faible. Les conditions d'expérimentation sont ici différentes des conditions classiques de séparation car les digestions ont été faites, non sur la biomasse mais sur le polymère lui-même. On peut néanmoins conclure que les faibles rendements de séparation déterminés constatés en IV.4.2 ne sont pas attribués au détergent, mais plutôt à un autre facteur comme la viscosité du milieu.

IV.4.3.3. Mesures de viscosité sur les suspensions après séparation.

La viscosité des milieux avant et après séparation est mesurée au moyen d'un viscosimètre de type "Brookfield". Les viscosités sont mesurées pour plusieurs détergents et

à différentes concentrations.

**Tableau IV.4.3b: Viscosités des milieux de digestion avant et après séparation au détergent**

| Détergent et concentration | Biomasse (en %) | Visc. avant digestion (en cPo) | Visc. après digestion (en cPo) |
|---|---|---|---|
| S.D.S (0.75 %) | 2 | < 5 | 110 |
| S.D.S (0.75 %) | 4 | < 5 | 120 |
| S.D.S (0.5 %) | 2 | < 5 | 105 |
| S.D.S (0.5 %) | 4 | < 5 | 105 |
| Triton (0.1 %) | 2 | < 5 | 15 |
| Triton (0.1 %) | 4 | < 5 | 32 |
| Triton (0.2 %) | 2 | < 5 | 12 |
| Triton (0.2 %) | 4 | < 5 | 30 |

Il est à noter que les suspensions issus du traitement par le détergent ont un comportement rhéologique de type non-newtonien, ce qui n'est pas le cas de la solution de détergent avant introduction de biomasse. Une plus grande précision sur les mesures aurait pu être obtenue en munissant le viscosimètre d'un autre adapteur. Les viscosités supérieures à 100 cPo obtenues après traitement dans le S.D.S justifient les difficultés de récupération du biopolymère par centrifugation. Dans cette optique, le comportement du Triton X-100 est plus intéressant puisque les plus fortes viscosités obtenues sont de l'ordre de 30 cPo.

IV.4.3.4. Comparaison des efficacités respectives du S.D.S et du Triton X-100.

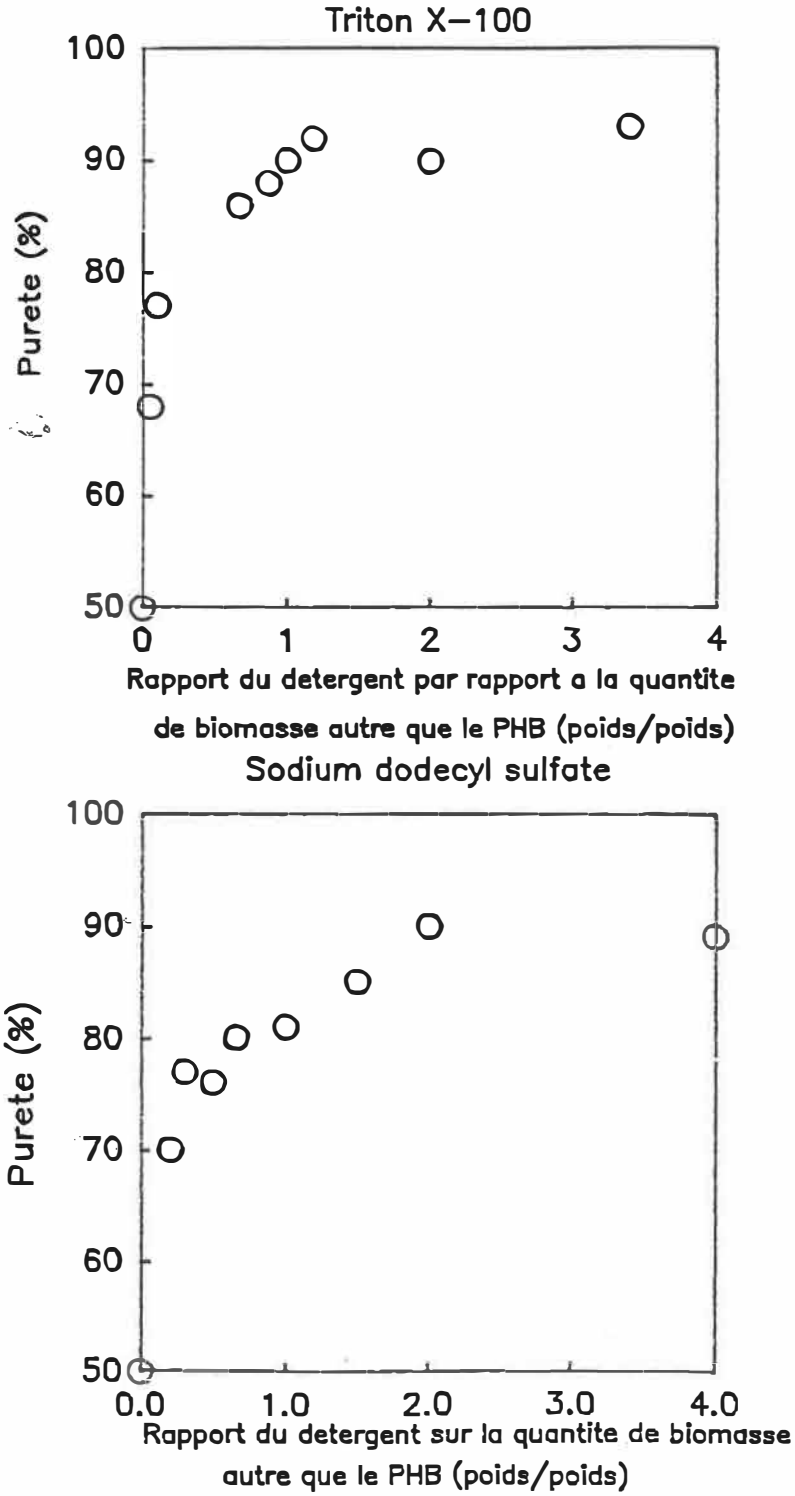
Des digestions au Triton X-100 et au S.D.S ont été réalisées en faisant varier le rapport de la concentration de détergent sur celle de la biomasse fixée à 1 % .

Lorsque le rapport de Triton X-100 sur la biomasse autre que le PHB augmente, la pureté du polymère isolé atteint un maximum puis reste constante (figure IV.4.3.4). Avec un rapport Triton X-100:biomasse de 0.85, une pureté de 88 % est atteinte, alors qu'au même rapport, on obtient un PHB pur à 77 % seulement avec le S.D.S. De meilleurs résultats peuvent être obtenus avec des rapports S.D.S/biomasse plus grands. Néanmoins, un rapport de 2 est nécessaire pour atteindre une pureté de 87 % par digestion avec le S.D.S, soit un rapport 2.4 fois plus élevé que pour le Triton X-100. L'analyse de la figure IV.4.3.4 montre que le Triton X-100 est plus efficace que le S.D.S.

IV.4.4. Séparation mettant en jeu un détergent et l'ADNase.

L'objectif des travaux est de diminuer la viscosité des milieux post-séparation. Considérant que celle-ci est due

**FIGURE IV.4.3.4. Pureté du PHB isolé en fonction du rapport biomasse/détergent.**



à la présence de macromolécules comme des acides nucléiques, des traitements à l'ADNase ont été réalisés en combinaison avec le détergent ou sur la suspension issue de la séparation.

Après 15 min de mise contact, la viscosité du milieu est mesurée.

La dernière expérience consiste à ajouter 25 mg de desoxyribonucléase à l'échantillon-témoin et à mesurer la viscosité du milieu après 15 min de mise en contact.

L'ajout de désoxyribonucléase induit une diminution de la viscosité du milieu de séparation. L'addition d'enzyme se fait indifféremment pendant ou après la séparation par le détergent.

**Tableau IV.4.4: Viscosités des milieux avec ou sans traitement à l'ADNase.**

| Détergent et concentration | Etalon | ADNase puis détergent | ADNase et détergent |
|---|---|---|---|
| S.D.S(0.1%) | 10 | 5 | 6 |
| S.D.S(0.25%) | 25 | 15 | 21 |
| S.D.S(0.5%) | 42 | 24 | 22 |
| S.D.S(0.75%) | 100 | 29 | 32 |

En comparaison, les viscosités obtenues après traitement

au Triton X-100 sans ADNase sont plus faibles; le Triton X-100 permet probablement une hydrolyse plus poussée des macromolécules, ou le pH élevé permet une élimination des acides nucléiques. Pour des usages à plus grande échelle, malgré les résultats encourageants obtenus avec la désoxyribonucléase, le coût élevé de l'enzyme désoxyribonucléase limite l'usage de cette technique. Une autre voie pour limiter la viscosité des milieux pourrait consister à chauffer vers 80°C la biomasse pour dénaturer des macromolécules telles l'ADN ou les protéines.

### IV.4.5. Discussions

Le mode d'action des surfactants au niveau du processus de purification est assez bien compris (68). A basse concentration, le surfactant sous forme monomérique s'insèrent dans la bicouche lipidique de la paroi bactérienne. Lorsque la concentration de surfactant augmente, une plus grande quantité de surfactant est incorporée au niveau de cette bicouche, causant une augmentation de l'enveloppe entourant la cellule. Une fois saturée, une nouvelle addition de surfactant entraîne une dissociation de l'enveloppe cellulaire et il y a formation de micelles de surfactants et de phospholipides. Les

granules de PHB se retrouvent alors emprisonnés dans le peptidoglycane et des débris cellulaires. Les surfactants agissent alors en dénaturant ou en solubilisant les protéines, ce qui permet une élimination de la membrane cellulaire. Les surfactants anioniques comme le S.D.S dénaturent les protéines, alors que les non-ioniques comme le Triton X-100 les solubilisent.

Les données énoncées présentent une grosse déficience dans la mesure où, s'il est possible d'établir la pureté du PHB isolé, il est impossible d'identifier et quantifier les impuretés présentes. En utilisant l'action combinée du détergent et de l'hypochlorite, ce problème a pu être éludé dans la mesure où les puretés obtenues sont proches du maximum.

Une mise à l'échelle d'un procédé de séparation par détergent est à considérer. Des composés comme le Triton X-100 ne sont pas des polluants puissants et, la digestion à pH 14 permet l'obtention de puretés supérieures à 90 %. Dès lors, il est possible d'approcher la pureté maximum en éliminant sélectivement et spécifiquement les impuretés présentes. Au niveau d'un procédé, le Triton X-100 est plus intéressant car il est actif à des concentrations inférieures au S.D.S et induit des viscosités plus basses des milieux post-digestion.

## CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.

Au cours de ces recherches, trois types de séparation ont été élaborés et testés. Le niveau d'innovation varie beaucoup en fonction des méthodes. Pour les extractions par solvants, une bibliographie importante était disponible et l'adaptation de certaines techniques a permis de déterminer des paramètres et des données d'intérêt encore non disponibles dans la bibliographie.

Pour les digestions à l'hypochlorite, utilisant les travaux de Williamson et Wilkinson pour ce qui concerne la préparation des solutions d'hypochlorite, la détermination des paramètres d'intérêt a permis l'optimisation de la méthode de façon à la rendre utilisable sur différentes échelles.

L'usage des détergents est très novatrice et ouvre la voie à un procédé de séparation d'une conception relativement simple. L'optimisation de ce dernier procédé n'est pas réalisée, mais l'objectif fixé a été rempli dans la mesure où une gamme de méthodes de séparation est maintenant disponible. Cette étape n'est plus limitante pour l'élaboration d'un procédé de fabrication à grande échelle.

L'étude n'est pourtant pas complète car on ne retrouve aucune donnée inhérente à des séparations de type

biologique; il aurait, par exemple, été intéressant d'utiliser des techniques "nouvelles" de purification comme les systèmes aqueux à 2 phases.

L'évaluation des différentes techniques s'est faite sur trois critères. Il apparaît que la pureté est le plus important et le plus difficile à obtenir. Une procédure médiocre peut préserver le poids moléculaire et donner un bon rendement de séparation, mais elle ne peut aboutir à l'obtention d'une bonne pureté. Au contraire, avec une technique véritablement "purificatrice", on peut en général optimiser les conditions expérimentales pour conserver ou améliorer les autres caractéristiques importants.

Pour évaluer les différentes techniques, on fournit, dans le tableau V.1, les meilleures valeurs obtenues par chacune des techniques.

**Tableau V.1: Résultats comparatifs des différents types de séparation**

| | Méthode de séparation | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Solvant | Hypochl. | Tide | Détergent + hypochl. |
| Pureté (%) | 93 | 93 | 89 | 98 |
| PHB (%) | 60 | 94 | 70 | 70 |
| P.M. (kg/mole) | 950 | 980 | 1150 | 1200 |

Au vu de ces résultats, le compromis le plus intéressant est offert par la séparation avec l'hypochlorite de sodium, le rendement de séparation étant au moins supérieur de 20 % aux autres. Par contre, les puretés les plus élevées sont obtenues par la combinaison du détergent et de l'hypochlorite, qui ne donne qu'un rendement de 70 %. Les travaux présentés dans la partie IV.4, montrent que ce faible rendement n'était imputable qu'aux moyens insuffisants de centrifugation utilisés. Le choix optimal va donc à cette dernière méthode car elle permet d'abord d'obtenir une pureté voisine du maximum tout en préservant le poids moléculaire initial. L'amélioration du rendement d'extraction réside dans l'élaboration d'une technique de centrifugation, limitant les pertes en biopolymère. Dans l'optique d'une mise à l'échelle de la technique, on peut développer une technologie plus propre en éliminant l'essentiel des constituants cellulaires autres que le PHB par un détergent pour atteindre des puretés supérieures à 90 % , puis en éliminant les composés résiduels par l'hypochlorite.

Tous les problèmes inhérents à la séparation des biopolymères n'ont néanmoins pas été éliminés au cours de cette étude. Les recherches ont été effectuées à partir d'un seul type de biomasse issu d'une fermentation d'A.

eutrophus. De fait, bien que les séparations réalisées sur plusieurs types de PHB-HV issus d'A. latus aient égalemement donné des résultats satisfaisants dans des travaux postérieurs, les conclusions présentées dans ce rapport ne peuvent être généralisées à tous les copolymères de PHA et tous les types de biomasse. Il serait donc intéressant de tester la méthode avec d'autres espèces, et d'autres types de PHA.

Un autre problème concerne l'impossibilité dans laquelle nous étions d'identifier et d'évaluer les impuretés des échantillons de PHB isolés. Il est indispensable pour une amélioration permanente du procédé de séparation et dans l'optique d'une industrialisation du procédé que les impuretés présentes puissent être quantifiées, même si ceci alourdit considérablement le travail d'analyses sur les échantillons.

Les dernières recommandations concernent le procédé à proprement parler. On doit d'abord se concentrer sur une optimisation de la séparation par le Triton X-100. Il peut constituer à lui seul un moyen de séparer les PHA du fait de son grand potentiel de solubilisation des constituants cellulaires à pH 14 et de son inertie vis-à-vis des biopolymères. Dans un premier temps, l'objectif est de limiter l'utilisation de l'hypochlorite. Ce désir d'éliminer

l'hypochlorite du procédé peut étonner dans la mesure où l'optimisation de cette technique a été longue, mais il est anachronique de produire des plastiques biodégradables pour régler des problèmes de pollution et d'ensuite générer un autre type de pollution lors de la fabrication de ces produits.

A ce niveau, il serait aussi intéressant de remplacer le Triton X-100 par un biosurfactant, complètement biodégradable. cNéanmoins, cette substitution ne paraît guère possible dans un futur proche, étant donné le prix de ces produits.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


(1) LEMOIGNE, M., 1925. Ann. Inst. Pasteur, 39: 144.

(2) HOLMES, P.A., 1985. Phys. Technol., 16: 32-36.

(3) LEAVERSUCH, R., 1972. Modern Plastics, Aug. pp 52-55.

(4) CORNIBERT, J., et R.H. MARCHESSAULT, 1972. J. Mol. Biol., 71: 735-756.

(5) AGOSTINI, D.E., J.B. LANDO, et J.R. SHELTON, 1971. J. Polym. Sci., A-1 9: 2775-2787.

(6) SCHLEGEL, H.G., et G. GOTTSCHALK, 1962. Angew. Chemie. 74:342-347.

(7) WARD, A.C., B.I. ROWLEY et E.A. DAWES, 1977. J. Gen. Microbiol., 102: 61-68.

(8) HIPPE, H., 1967. Arch. Microbiol., 56: 247-277.

(9) SONNLEITER, B., E. HEINZLE, G. BRAUNEGG, et R.M. LAFFERTY, 1979. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7: 1-10.

(10) BRAUNEGG. G., et B. BOGENSBERGER, 1985. Acta Biotechnol., 5: 339-345.

(11) PFISTER, R.M., et D.G. LUNDGREN, 1964. J. Bacteriol., 88: 1119-1129.

(12) WILDENHOFF, K.E., 1976. Acta Med. Scand., 200: 79-86.

(13) SEEBACH, D., et M. ZUGER, 1982. Helv. Chim. Acta, 65: 495-503.

(14) HAUTTECOEUR, B., M. JOLIVET, et R. GAVARD, 1972. C. R. Acad. Sc. Paris, 265 (série D): 2729-2732.

(15) GAVARD. R., C. REYNAUD, et B. HAUTTECOEUR, 1967. C. R. Acad. Sc. Paris, 265 (série D): 1557-1560.

(16) HOWELLS, E.R., 1982. Chem. Ind., 15: 508-511.

(17) FUKADA, E., et Y. ANDO, 1986. Int. J. Biol. Macromol., 8: 361-366.

(18) KORSATKO, W., B. WABNEGG, G. BRAUNEGG, R.M. LAFFERTY, et F. STREMPFL, 1983. Pharm. Ind., 45: 525-527.

(19) KORSATKO, W., B. WABNEGG, H.M. TILLIAN, G. BRAUNEGG, et R.M. LAFFERTY, 1983. Pharm. Ind., 45: 1004-1007.

(20) OEDING, V., et H.G. SCHLEGEL, 1973. Biochem. J., 134: 239-248.

(21) DAWES, E.A., et P.J. SENIOR, 1973. Adv. Microbiol. Physiol., 10: 235-266.

(22) SENIOR, P.J., 1984. "Continuous culture", A.C.R, D.C. Ellwood et C.G.T. Evans (Editeurs). pp 266-271.

(23) DOI, Y., M. KUNIOKA, Y. NAKAMURA, et K. SOGA, 1987. Macromolecules, 20: 2988-2991.

(24) MERRICK, J.M., 1988. Polym. Preprints (A.C.S), 29: 586-587.

(25) RITCHIE, G.A.F., P.J. SENIOR, et E.A. DAWES, 1971. Biochem. J., 121: 309-316.

(26) DOI, Y., A. TAMAKI, M. KUNIOKA et K. SOGA, 1987. J. Chem. Soc., Chem. Comm.: 1635-1636.

(27) DOI, Y., A. TAMAKI, M. KUNIOKA et K. SOGA, 1987. Makromol. Chem., Rapid. Comm., 8: 631-635.

(28) DOI, Y., M. KUNIOKA, Y. NAKAMURA, et K. SOGA, 1988. Macromolecules, 21: 450-455

(29) DOI, Y., 1988. Pap. 3rd Chem. Congr. of N. America, Toronto, June 5-10.

(30) HOLMES, P.A., 1981. Eur. Pat. Appl. 52,459.

(31) HOLMES, P.A., 1985. Phys. Technol., 16: 32-36.

(32) DOI, Y., M. KUNIOKA, Y. NAKAMURA, et K. SOGA, 1986. J.Chem. Soc., Chem. Comm: 1696-1697.

(33) FINDLAY, R.H., et P.C. WHITE, 1983. Appl. Environ. Microbiol., 45: 71-78.

(34) WALLEN, L.L., et W.K. ROHWEDDER, 1974. Environ. Sci. Technol., 8: 576-579.

(35) CAPON, R.J., R.W. DUNLOP, E.L. GHISALBERTI et P.J. JEFFRIES, 1983. Phytochem., 22: 1181.

(36) RAMSAY, B.A., J.A. RAMSAY, et D.G. COOPER, 1989. Appl. Environ. Microbiol., 55: 584-589.

(37) PEOPLES, O.P., et A.J. SINSKLEY, 1988. Pap. 3rd Chem. Cong. of N. America, Toronto, June 5-10.

(38) WALKER, J., J.R. WHITTON, B. ALDERSON, 1982. I.C.I, Eur. Pat. Appl., EP 46,017.

(39) BARHAM, P.J., A. SELWOOD, 1982. I.C.I, Eur. Pat. Appl. EP 58,480.

(40) SOLVAY et Cie, 1980. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 8099,195, Fr. Pat. Appl. 79/1,862.

(41) STAGEMAN, J.F., 1985. I.C.I, GB Appl 85/600,384.

(42) SCHMIDT, J., W. BIEDERMANN, H. SCHMIECHEN, 1985. Ger (East) DDR 229,428, Appl. 269,972.

(43) LAFFERTY, R.M., et E. HEINZLE, 1977. Chem. Rundschau, 30: 14-16.

(44) DE MOLA A.H., M. MARX-FIGINI, R.V. FIGINI, 1975. Makromol. Chem., 176: 2655-2667.

(45) WILLIAMSON D.H., et J.F. WILKINSON, 1958. J. gen. Microbiol., 19: 198-209.

(46) GRIEBEL, R.J., et J.M. MERRICK, 1971. J. Bacteriol., 108: 782-789.

(47) SYKES, J., 1971. "Methods in Microbiology", Norris Ribbons (Editeurs), pp.55-207.

(48) SUTHERLAND, J., et J.F. WILKINSON, 1971."Methods in Microbiology", Norris and Ribbons (Editeurs), pp.345-383.

(49) LUNDGREN, D.G., R. ALPER, C. SCHNAITMANN, et R.H. MARCHESSAULT, 1965. J. Bacteriol., 89: 245-251.

(50) NUTI, M.P., M. DE BERTOLDI, et A.A. LEPIDI, 1972. Can. J. Microbiol., 18: 1257-1261.

(51) ALPER, R., D.G. LUNDGREN, R.H. MARCHESSAULT, et W.A. COTE, 1963. Biopolymers, 1: 545-556.

(52) DAWES, E.A., et P.J. SENIOR, 1973. Adv. Microbiol. Physiol., 10: 135-266.

(53) DELAFIELD, P., M. DOUDOROFF, N.J. PALLERONI, C.J. LUSTY, et R. CONTOPOULOS, 1965. J. Bacteriol., 90: 1455-1471.

(54) STOCKDALE, H., D.W. RIBBONS, E.A. DAWES, 1968. 24: 1798-1803.

(55) HOLMES, P.A., et G.B. LIM, 1985, I.C.I, Eur. Pat. Appl. 145,233, GB Appl. 85/11,670.

(56) ALBERTSSON, P.A., 1965. Biochim. Biophys. Acta, 103: 1-12.

(57) GRIEBEL, R., Z. SMITH, et J.M. MERRICK, 1968. Biochemistry, 7: 3676-3681.

(58) TJERNELD, F., G. JOHANSSON, et M. JOELLSON, 1987. Biotech. Bioeng., 30: 809-816.

(59) TJERNELD, F., S. BERNER, A. CAJARVILLE, et G. JOHANSSON, 1986. Enzyme Microb. Technol., 8: 417-423.

(60) MERRICK, J.M., M. DOUDOROFF, 1964. J. Bacteriol., 88: 60-71

(61) HOLMES, P.A., et E. JONES, 1980. I.C.I, Eur. Pat. Appl. EP 46,335, GB Appl. 80/26,882.

(62) TANFORD, C., 1973. "The hydrophobic effect", John Wiley (New-York).

(63) FRANK, H.S., et M.W., EVANS., 1945. J. Chem. Phys., 13: 507-532.

(64) GRIFFIN, W.C., 1949. J. Soc. Cosmet. Chem., 1: 311-326.

(65) GRIFFIN, W.C., 1954. J. Soc. Cosmet. Chem., 5: 249-256.

(66) Mc BAIN, E.L., et E. HUTCHINSON, 1955. "Solubilization and Related Phenomena", Academic Press, (New-York).

(67) SHINITZKY, M., A.C. DIANOUX, C. GITLER, et G. WEBER, 1971. Biochemistry, 10: 2106-2113.

(68) HELENIUS, A., et K. SIMONS, 1975. Biochim. Biophys. Acta, 415: 29-79.

(69) BANGHAM, A.D., 1972. Annu. Rev. Biochem., 41:753-776.

(70) EKWALL, P., et P. STENIUS, 1975. Phys. Chem. Ser. 2, Vol.7, "Surf. Chem. Colloïds", Butterworths (London).

(71) NOZAKI, Y., J.A. REYNOLDS, et C. TANFORD, 1974. J. Biol. Chem., 249: 4452-4459.

(72) SEEMAN, P., 1966. Biochem. Pharmacol., 15: 1767-1774.

(73) REMAN, F.C., R.A. DEMEL, J. De GIER, L.L.M. Van DEENEN, H. EIBL, et O. WESTPHAL, 1969. Chem. Phys. Lipids, 3: 221-233.

(74) TANFORD, C., 1972. J. Mol. Biol., 67: 59-74.

(75) STICKLAND, L.H., 1951, J. gen. Microbiol., 5: 689-703.

(76) BRAUNEGG, G., B. SONNLEITER, et R.M. LAFFERTY, 1978. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 6: 29-37.

(77) GRUBISIC, Z., P. REMPP, et H. BENOIT, 1967. J. Polymer. Sci., B5: 753-759.

(78) MAJID, M.I.A., C.W. PONTON, et L.J. NOTARIANNI, 1987. J. Pharm. Pharmacol., 34: 34P.

(79) DAWKINS, J.V., 1976. J. Macromol. Sci., B2: 623.

(80) AKITA, S., Y. EINAGA, Y. MIYAKI, et H. FUJITA, 1976. Macromolecules, 9: 774-780.

(81) MARCHESSAULT, R.H., K. OKAMURA, et C.J. SU, 1970. Macromolecules, 3: 735-739.

(82) SCHNAITMANN, C.A., 1971. J. Bacteriol., 108: 545-552

(83) BALLARD, D.G.M., P.A. HOLMES, P.J. SENIOR, Math. and Phys. Sci., Serie C: 293-314.

(84) SENIOR, P.J., and L.F. WRIGHT, 1979. I.C.I. U.K. Pat. Appl. 15,858

**ANNEXE 1: Matériels et méthodes utilisées lors de la fermentation d'Alcaligenes eutrophus en discontinu alimenté.**

### III.1.1. Microorganisme utilisé.

Cette culture a été faite avec la souche DSM545 d'A. eutrophus, fournie par le Prof. G. Braunegg de l'institut de biotechnologie et de microbiologie. Université technique de Graz. A-8010.Graz, Schlogelgasse 9.

### III.1.2. Réacteur et description du montage.

La fermentation a été réalisée dans un fermenteur "Bioengineering" de 19 L présentant un volume utile de 15 L muni d'un contrôle et d'une régulation de pH et de température. L'oxygène dissout était contrôlé manuellement et maintenu entre 50 et 60 % de saturation.

### III.1.3. Procédure de stérilisation et préparation de l'inoculum.

La composition du milieu de culture est donné à la page suivante. Les phosphates ont été stérilisés "in situ" dans le fermenteur (120°C durant 20 min) alors que les solutions

de sucrose, de composés azotés, de sulfates et de chlorures, ainsi que les solutions de base et d'acide, sont autoclavées séparément en flacons doseurs (120°C durant 20 min). Les solutions sont alors ajoutées aseptiquement au milieu au moyen de pompes péristaltiques "Masterflex".

Un inoculum de 1.5 L a été préparé selon la procédure suivante. Un erlenmeyer contenant 500 mL d'un milieu liquide stérile composé de 3.75 g de $Na_2HPO_4*7H_2O$, 0.83 g de $KH_2PO_4$, 1.1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0.11 g de $MgSO_4*7H_2O$, 0.5 mL d'une solution d'éléments-trace, 0.05 g de $NH_4$-Fe-Citrate et 5 g de glucose, a d'abord été inoculé à partir d'une boîte de Pétri. Après 24 h d'incubation à 30°C sous agitation, la suspension est transférée dans 2 erlenmeyers de 1 L contenant 750 mL d'un milieu stérile de même composition que le milieu de culture donné en annexe.

Après 24 à 36 h sous agitation dans un incubateur régulé à 30°C, l'inoculum a été transféré aseptiquement au fermenteur contenant 8 L de milieu de culture stérile.

### III.1.4. Stratégie de fermentation.

La production de PHB par A. eutrophus nécessite une fermentation en 2 étapes avec une première phase de

**Composition du milieu pour la production de PHB par <u>Alcaligenes eutrophus</u> en fermenteur Bioengineering:**

1. Milieu initial:

- 48 g/L de glucose
- 12.32 g/L de sulfate d'ammonium $(NH_4)SO_4$
- 2.5 g/L de phosphate de sodium $Na_2HPO_4.2H_2O$
- 832 mg/L de phosphate de potassium $KH_2PO_4$
- 100 mg/L de chlorure de calcium $CaCl_2.H_2O$
- 200 mg/L de sulfate de magnésium $MgSO_4$
- 60 mg/L de citrate ferrique d'ammonium
- 10 mg/L de sulfate de zinc $ZnSO_4.7H_2O$
- 3 mg/L de chlorure de manganèse $MnCl_2.4H_2O$
- 30 mg/L d'acide borique $H_3BO_3$
- 20 mg/L de chlorure de cobalt $CoCl_2.6H_2O$
- 1 mg/L de sulfate de cuivre $CuSO_4.5H_2O$
- 2 mg/L de chlorure de nickel $NiCl_2.6H_2O$
- 3 mg/L de molybdate de sodium $NaMo_4.2H_2O$

croissance des microorganismes et de production de biomasse puis une seconde phase d'accumulation de PHB. L'inoculation est réalisée sur un milieu à 30 g/L en sucrose et 9 g/L d'une source d'azote constituée de $(NH_4)_2SO_4$. Après avoir laissé la culture se développer jusqu'à épuisement du milieu, une solution concentrée en sucrose (300 g/L) et en sulfate d'ammonium (100 g/L) est ajoutée rapidement dans le réacteur.

Lorsque ces nutriments sont épuisés, on entre dans une dernière phase d'alimentation avec l'ajout d'une solution concentrée en glucose (2.5 L d'une solution à 400 g/L)

### III.1.5. Conditions d'opération du fermenteur.

Durant la fermentation, la température du milieu a été maintenue à 30°C et le pH à 7.

Le débit d'air fut augmenté au cours de la fermentation de manière à obtenir une aération du milieu de 1 volume d'air par volume de liquide et par minute.
L'agitation fut également ajustée de façon à maintenir la pression d'oxygène dissout entre 50 et 60 % de la saturation.

## III.1.6. Suivi de la fermentation.

### III.1.6.1. Mesure de la biomasse.

Des volumes donnés (5 à 10 mL) de bouillon de culture étaient prélevés stérilement du fermenteur puis centrifugés durant 5 min à 12 000 x g dans une centrifugeuse Beckmann modèle JS 221. Les culots étaient ensuite resuspendus dans 5 mL d'eau distillée et à nouveau centrifugés. Les culots étaient enfin transférés dans des tares d'aluminium prépesées, puis étaient séchées en étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

Connaissant le volume de l'échantillon prélevé et la masse de matières sèches recueillie, la biomasse est évaluée en g/L dans le bouillon de culture.

### III.1.6.2. Concentration en sucre du milieu de culture.

Elle est évaluée par chromatographie liquide à haute performance sur colonne Aminex 87P (Biorad Laboratories Ltd) à partir d'un échantillon de 100 µL de milieu de culture préalablement filtrés sur Millipore 0.45 µm. De l'eau déminéralisée préalablement filtrée sur Millipore 0.45 µm était utilisée comme éluant à un débit de 0.7 mL/min. L'intégrateur Hewlett-Packard donnait la teneur en sucres par évaluation de la surface des pics en comparaison à des

courbes de calibration élaborées à partir de solutions standards de sucrose, glucose et fructose.

III.1.6.3. Séparation et stockage de la biomasse après fermentation.

Après fermentation, le fermenteur a été vidangé et la biomasse stockée à basse température.

Elle a ensuite été centrifugée à 12 000 x g dans une centrifugeuse Beckman JS 221. Après élimination du surnageant, on a ajouté un volume d'acétone équivalent au volume de biomasse. L'ensemble a alors été congelé vers (-20°C) avant d'être lyophilisé dans un appareil Labconco de type Lyph-Lock 4.5 opérant à (-50°C) sous un vide de 5 $\mu$m de Hg.

Une fois lyophilisée, la biomasse a été stockée en vase clos à (-18°C).

## III.1.7. Méthodes d'analyses utilisées lors de la fermentation.

### III.1.7.1. Analyses des protéïnes cellulaires.

Les échantillons étaient prélevés et centrifugés comme décrit dans la partie inhérente à la détermination de la biomasse; le contenu protéique des culots était analysé par la réaction du biuret (75) avec un standard d'albumine de sérum bovin (Sigma Chemical Company).

L'analyse était réalisée à partir des culots issus du milieu de culture, selon la procédure suivante:

2 volumes (vol/vol) sont ajoutés à l'échantillon et la suspension est portée à 100°C durant 5 min. Après avoir ramené l'ensemble à température ambiante, on ajoute 0.5 mL d'une solution à 0.5 mL de $CuSO_4$, 5 $H_2O$ et on agite vigoureusement. La suspension est centrifugée à 12 000 x g durant 10 min et l'analyse se fait par mesure de la densité optique des surnageants. Un essai à blanc réalisé en substituant de l'eau à la biomasse a permis d'étalonner le spectrophotomètre à la valeur 0 % .

La solution standard est une solution à 0.1 % en albumine de sérum bovin (1 mg/L) sur laquelle on pratique une série de dilutions de manière à avoir une gamme complète d'échantillons.

III.1.7.2. Détermination de l'azote dans le milieu.

L'analyse était faite sur le surnageant issu de la centrifugation de la biomasse et la concentration en $NH_3$ déterminée par une variante à la réaction de Berthelot (9), basée sur la formation d'une couleur bleue lorsque le phénol est oxydé en présence d'ammonium. La couleur est proportionnelle à la concentration en ammonium dans le milieu, mesurée par spectrophotométrie pour des longueurs d'onde de 620-630 nm. La procédure nécessite la préparation de 2 solutions de réactifs, et une gamme de 3 solutions standards de $NH_3$, préparées à partir de sulfate de sodium: $(NH_4)_2SO_4$.

- solution 1: 10 g de phénol + 50 mg de nitroprusside de sodium pour 1000 mL d'eau distillée.

- solution 2: 20 mL de solution de NaOCl (6.5 % en chlore libre), 90 g de $NaH_2PO_4$, 2 $H_2O$, 6 g de NaOH pour 1000 mL d'eau distillée.

0.1 mL de solution à analyser est ajouté à 2 mL de solution 1. Ensuite, 2 mL de solution 2 sont ajoutés au mélange et maintenus, après agitation, à 37°C durant 30 min. Après avoir ramené l'échantillon à température ambiante, la densité optique est évaluée à une longueur d'onde de 630 nm par rapport à un échantillon témoin obtenu en remplaçant le

surnageant de culture par de l'eau.

Cette méthode permet d'évaluer des concentrations en $NH_4^+$ comprises entre 0.3 et 15 mg/L. Pour des valeurs plus élevées, il est nécessaire de pratiquer des dilutions sur la solution.

III.1.7.3. Concentration en phosphates dans le milieu.

Elle est mesurée via la réduction du phosphomolybdate en bleu de molybdène. Celui-ci est formé proportionnellement à la quantité de phosphate présent et est mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 650 $\mu$m.

La méthode était élaborée selon la procédure suivante:

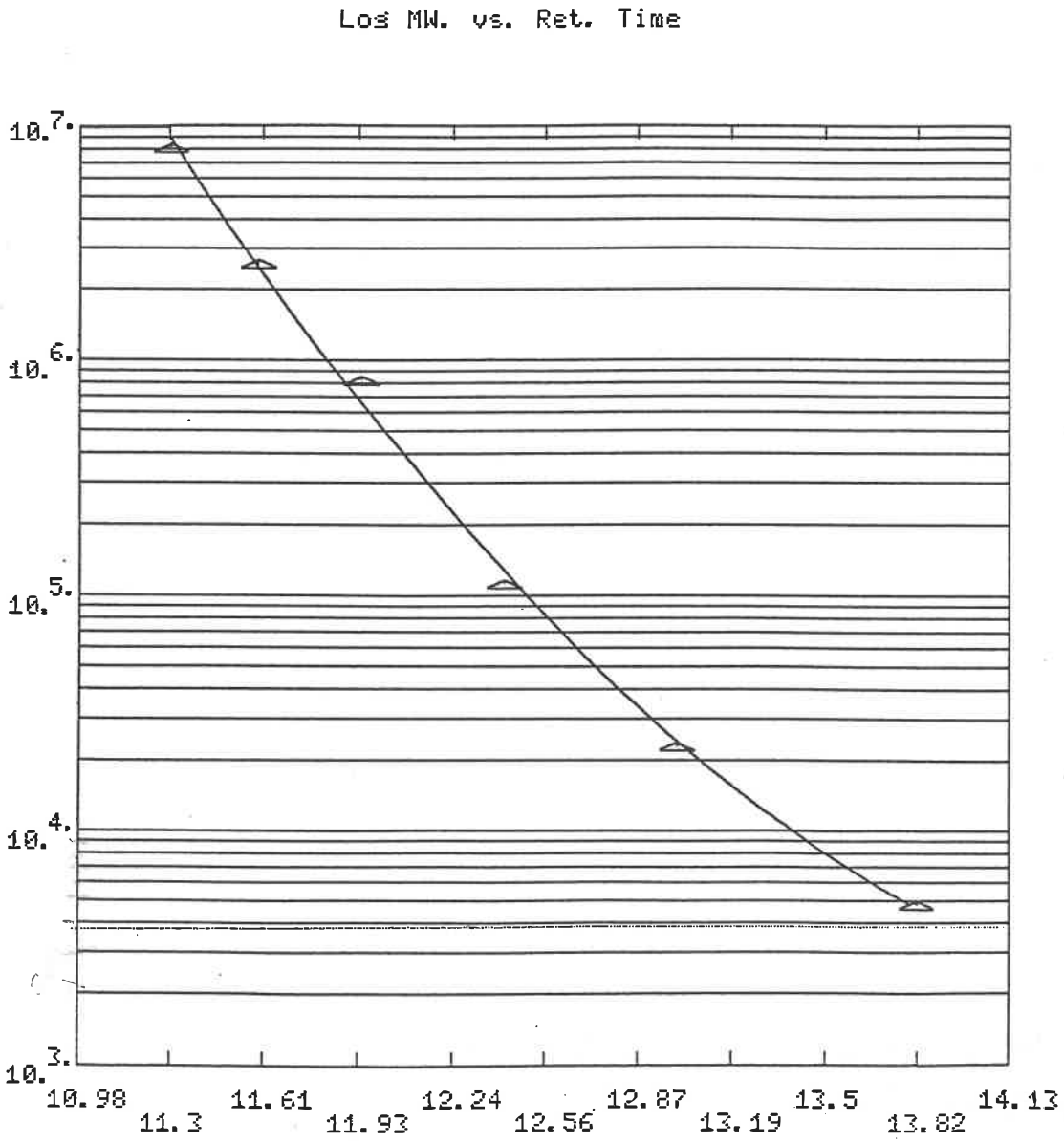
- solution 1: 19.8 g de $Na_2B_4O_7*10\ H_2O$
  18.1 g de $Na_2S_2O_5$
  1000 mL d'eau distillée
- solution 2: 24.2 g de $Na_2MoO_4*2H_2O$
  70 mL de $H_2SO_4$ concentré
  930 mL d'eau distillée.
- solution 3: 9.99 g de P-méthylaminophénosulfate
  30.4 g de $Na_2S_2O_5$
  1000 mL d'eau distillée
- solution 4: 114.5 g de $Na_2CO_3*10\ H_2O$
  6.9 g de $Na_2SO_3$
  1000 mL d'eau distillée

La méthode ne permettait d'évaluer que des concentrations comprises entre 6 et 600 mg/L.

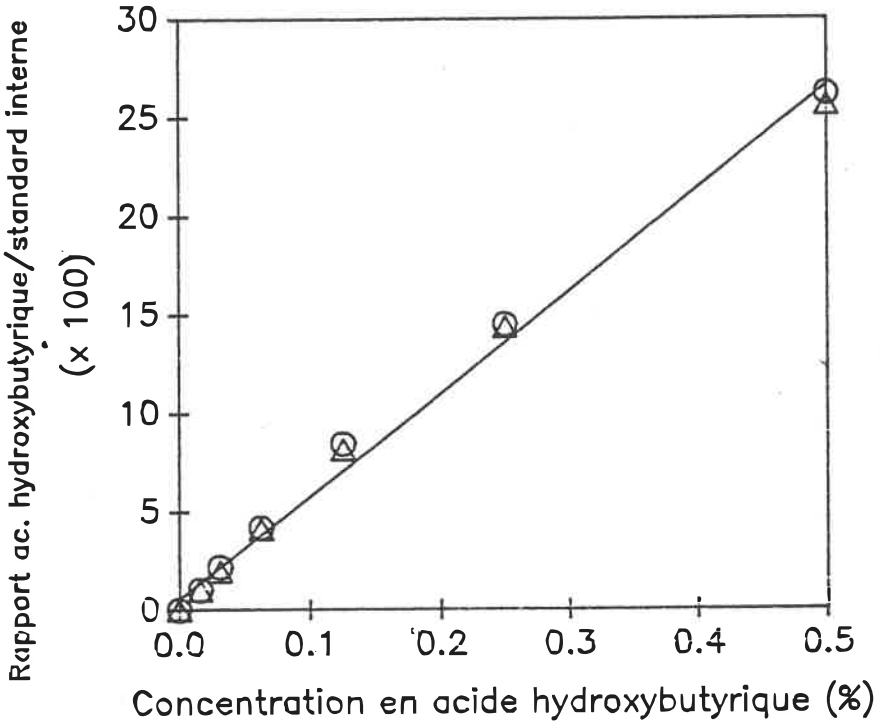
On mélange 0.1 mL d'échantillon à analyser à 1 mL de solution 1 et 0.2 mL des solutions 2 et 3. On laisse réagir à la température de la pièce pour 15 min puis, on ajoute 2 mL de la solution 4. Après incubation de 15 minutes à la température ambiante, on mesure le pourcentage de transmittance au spectrophotomètre en utilisant 0.1 mL d'eau distillée traitée identiquement, comme référence.

L'évaluation était complétée par rapport à des courbes standard préalablement établies.

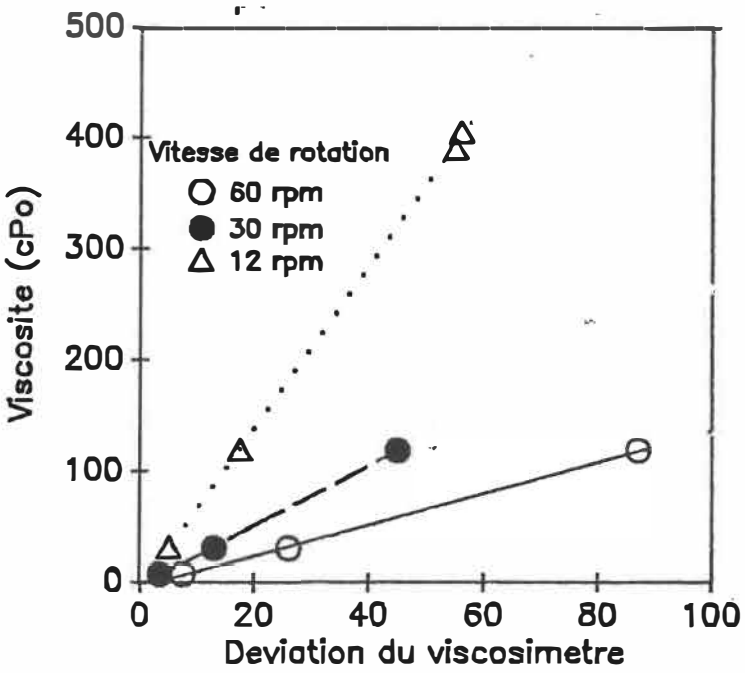
**ANNEXE 2: Courbe de calibration poids moléculaire en fonction du temps de rétention pour les mesures par chromatographie à perméation de gel.**

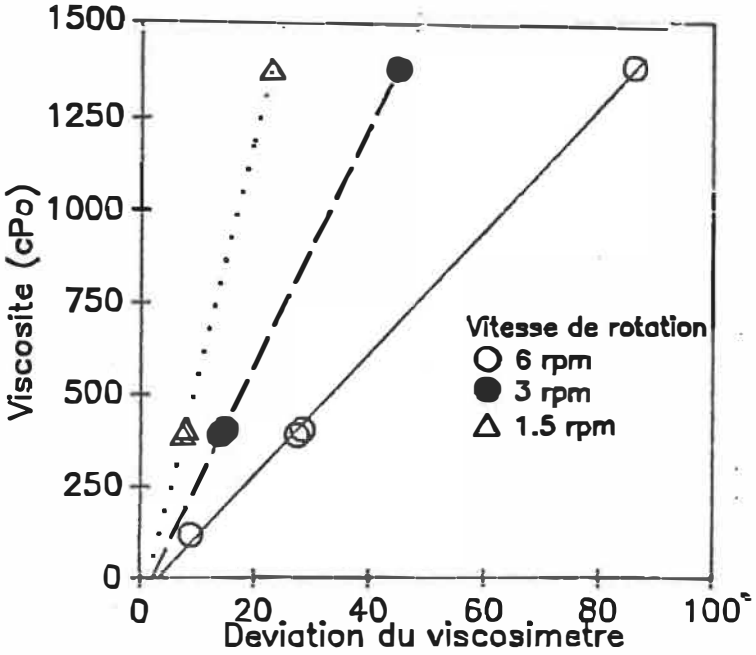


**ANNEXE 3: Figure IV.4.2: Concentration en acide hydroxybutyrique en fonction du rapport acide hydroxybutyrique/standard interne.**



**ANNEXE 4: Figure III.5.4: Calibration du viscosimètre "Brookfield" par des huiles standards.**



ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL
3 9334 00226426 3