

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE, EXTRACTION ET RÉCUPÉRATION DE
POLY-3-HYDROXYBUTYRATE PRÉSENT DANS LA BIOMASSE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

AIMESTHER OJITO BETANCOURT

JANVIER 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes remerciements à mon directeur de recherche, Dr Huu van Tra, pour la confiance qu'il m'a apportée tout au long de ce travail, pour son soutien et son aide dans les difficultés de cette thèse, mais aussi et surtout pour ses qualités humaines. Je voudrais également remercier mon co-directeur, Dr Jalal Hawari, chercheur principal et chef du Groupe Chimie Analytique et Environnementale de l'IRB-CNRC, de m'avoir acceptée dans son laboratoire et m'avoir donné cette chance de passer une année dans un milieu aussi enrichissant.

Il ne faut certainement pas oublier tous les membres de cette merveilleuse équipe à l'IRB : Annamaria, sa générosité, ses importantes recommandations et pour tout ce qu'elle m'a montré, Alain qui m'a bien souvent dépannée « informatiquement », Chantale qui s'occupe de tant de choses pour nous tous et pour son irremplaçable expérience, Fanny qui est une source de motivation, son savoir et sa détermination sont des qualités inestimables, Louise, toujours à l'écoute, toujours de bon conseil, sans oublier tout ce qu'elle et Stéphane ont fait pour m'aider dans le labo. Je m'en voudrais d'oublier une personne qui ne travaille plus dans le laboratoire mais qui a eu une contribution remarquable, Islem. Je le remercie d'avoir pris le temps de m'enseigner plusieurs expériences essentielles pour ma maîtrise et de m'avoir soutenue dès mes débuts.

Finalement, je dois aussi remercier le programme de Bourses d'excellence de l'UQAM pour les cycles supérieurs (FARE) pour son aide financière au début de ma maîtrise.

Un dernier mot (et non le moindre!) pour remercier toute ma famille et mes amis pour le soutien et l'encouragement tout au long de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	xii
LISTE DES SYMBOLES.....	xvi
RÉSUMÉ.....	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I	
POLYMÈRES. GÉNÉRALITÉS ET PROBLÉMATIQUE.....	3
1.1 Généralités.....	3
1.2 Polymères pétrochimiques conventionnels.....	3
1.3 Polymères biodégradables.....	5
1.3.1 Polymères biodégradables issus de ressources fossiles (pétrochimiques).....	5
1.3.2 Polymères biodégradables issus de ressources renouvelables.....	7
1.4 Polyhydroxyalcanoates.....	8
1.4.1 Les PHA en tant que plastiques.....	11
1.4.2 Production des PHA par fermentation bactérienne.....	14
1.4.3 Biosynthèse des PHA.....	16
1.4.4 Les domaines d'applications et production industrielle des PHA.....	19
1.5 Biodégradabilité des biopolymères.....	22
CHAPITRE II	
MÉTHODES D'ANALYSE DES PHA.....	25
2.1 Historique.....	25
2.2 Analyse des PHA par chromatographie gazeuse.....	27
2.2.1 Techniques de dérivation.....	27
2.2.1.1 Méthanolyse des PHA.....	27
2.2.2 Méthodes de préparation de l'échantillon.....	28
2.3 Analyse des PHA par HPLC.....	35
2.4 Analyse des PHA par RMN et par FTIR.....	36
2.5 Analyse des PHA par spectrométrie de masse (MALDI/MS).....	37
2.6 Dérivation assistée par micro-ondes.....	37
2.6.1 Principe du chauffage par rayonnement micro-onde.....	38
2.6.2 Réacteurs micro-ondes.....	41
CHAPITRE III	
MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE RÉCUPÉRATION DES PHA.....	43

3.1 Extraction par solvants.....	44
3.1.1 Extraction par solvant sans chauffage	44
3.1.2 Extraction par solvant avec chauffage	45
3.1.3 Extraction par solvant à hautes pressions	45
3.1.4 Extraction assistée par micro-ondes	46
3.2 Méthodes de rupture de la membrane plasmique.....	51
3.2.1 Rupture mécanique (méthodes physiques pour la lyse de cellules).....	52
3.2.2 Digestion chimique.....	54
3.2.3 Lyse enzymatique.....	56
3.3 Méthodes combinées.....	60
3.4 Méthodes de purification	62
CHAPITRE IV	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	63
4.1 Produits chimiques et instrumentation.....	63
4.2 Réactions de dérivatisation du PHB et méthodes de préparation des échantillons	64
4.2.1 Dérivatisation par méthanolyse acide et préparation des échantillons pour l'analyse GC	64
4.2.2 Dérivatisation par hydrolyse et préparation des échantillons pour l'analyse HPLC	66
4.3 Techniques analytiques utilisées.....	67
4.4 Techniques d'extraction et de récupération du PHB.....	67
4.4.1 Extraction au chloroforme, méthode classique.....	67
4.4.2 Extraction au chloroforme assistée par sonication	68
4.4.3 Extraction au chloroforme assistée par micro-ondes.....	68
4.4.4 Extraction du PHB par lyse enzymatique.....	69
CHAPITRE V	
RÉSULTATS	70
PREMIÈRE PARTIE	
DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES ANALYTIQUES POUR LE DOSAGE DU PBH INTRACELULLAIRE	71
5.1 Article 1. « <i>Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells</i> ».....	72
5.2 Article 2. « <i>Rapid microwave assisted esterification method for the analysis of poly-3-hydroxybutyrate in Alcaligenes latus by gas chromatography</i> »	81
5.3 Résultats non publiés	86
5.3.1 Méthanolyse acide du poly(3-hydroxybutyrate) microbien (PHB). Couplage micro-ondes-HS/SPME-GC/FID.....	86
5.3.1.1 Micro-ondes - GC/FID	86
5.3.1.2 HS/SPME - GC/FID.....	87

5.3.1.3 Micro-ondes - HS/SPME - GC/FID. Développement de la méthode.....	88
5.3.2 Hydrolyse alcaline et acide du PHB microbien.....	91
5.3.2.1 Hydrolyse alcaline – HPLC/UV.....	91
5.3.2.2 Hydrolyse alcaline – HS/SPME – GC/FID.....	93
5.3.2.3 Hydrolyse acide - HPLC/UV.....	93
DEUXIÈME PARTIE	
EXTRACTION ET RÉCUPÉRATION DU PHB INTRACELULAIRE.....	95
5.4 Extraction du PHB accumulé dans l’ <i>Alcaligenes latus</i>	96
5.4.1 Extraction solide-liquide, méthode classique.....	96
5.4.2 Extraction assistée par micro-ondes.....	97
5.4.3 Extraction assistée par sonication.....	97
5.4.4 Extraction du PHB par lyse enzymatique.....	99
CHAPITRE VI	
DISCUSSION.....	102
6.1 Couplage micro-ondes-HS/SPME-GC/FID.....	103
6.1.1 Dérivatisation par méthanolyse.....	103
6.1.2 Dérivatisation par hydrolyse.....	105
6.1.2.1 Hydrolyse en milieu acide.....	105
6.1.2.2 Hydrolyse en milieu alcalin.....	106
6.2 Extraction par solvants.....	107
6.2.1 Extraction assistée par micro-ondes.....	108
6.2.2 Extraction assistée par sonication.....	109
6.2.3 La lyse enzymatique.....	111
CONCLUSIONS.....	113
APPENDICE A	
ANALYSE DES POLYHYDROXYALCANOATES MICROBIENS PAR DIFFÉRENTES TECHNIQUES INSTRUMENTALES.....	115
APPENDICE B	
RÉSUMÉ DES ENZYMES LYTIQUES D’ORIGINE MICROBIEN ET LEURS CONDITIONS OPTIMALES DE LYSE.....	117
APPENDICE C	
CHROMATOGRAMMES DES PRODUITS DÉRIVÉS DES PHA, OBTENUS PAR LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES UTILISÉES.....	119
RÉFÉRENCES.....	125

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Unité monomérique (HA) des polyhydroxyalcanoates (PHA)	8
1.2 Les homopolymères, PHB et PHV et leur copolymère, le PHBV ..	11
1.3 Biosynthèse du PHB et du PHBV dans <i>Alcaligenes eutrophus</i>	16
1.4 Applications des biopolymères : libération contrôlée des principes actifs	20
2.1 Méthanolyse acide du PHB, en présence du chloroforme	28
2.2 Différents modes d'extraction en SPME	29
2.3 Les différentes étapes de la SPME : a) pré-incubation, b) adsorption (extraction) c) repliement de la fibre et désorption dans l'injecteur du chromatographe	31
2.4 Réactions d'hydrolyse du PHB, hydrolyse acide avec de l'acide sulfurique concentré et hydrolyse alcaline dans une solution d'hydroxyde de sodium 4 M ..	36
2.5 Principe d'un réacteur micro-ondes, a) multi-mode (<i>diffused microwaves</i>), b) monomode (<i>focused microwaves</i>)	42
3.1 L'extraction par solvant. a) Extraction par solvant selon la méthode classique, ce procédé est contrôlé par la diffusion donc la force motrice de la séparation est la différence de concentrations (réelle et à l'équilibre), b) Extraction par solvant assistée par MO où l'inversion du gradient de température mène au « transfert de la masse sous l'effet de la pression »	47
3.2 a) Les principales structures bactériennes, b) comparaison des enveloppes de bactéries gram négatives et gram positives. Les différences plus importantes sont l'épaisseur de la couche rigide de peptidoglycane et la présence d'une membrane externe chez les G ⁻ . Les G ⁻ ont une couche de peptidoglycane très mince, de quelques molécules de large, alors qu'elle est très épaisse chez les G ⁺	57
3.3 Micrographie électronique de l'expulsion des granules de PHB dès cellules d' <i>E.</i> <i>coli</i> recombinant par autolyse bactérienne. Le chauffage du milieu de culture favorise la formation d'un petit tunnel à travers l'enveloppe cellulaire et ainsi le relargage concomitant des granules de PHB intracellulaire	59

4.1	Schéma du protocole d'analyse des PHA dans la biomasse par MO-HS/SPME-GC/FID	65
5.1	Méthanolyse acide (H_2SO_4 10 % v/v et AB 8 g L ⁻¹) d'une biomasse contenant environ 60 % de PHB ; a) chauffage classique (3 h à 100 °C), b) chauffage par MO (4 min à 110 W). Analyse par GC, colonne capillaire SPB-1, détecteur FID. Injecteur split (3 : 1), volume d'injection 1 µL	86
5.2	Méthanolyse acide (H_2SO_4 10 % v/v et AB 1 g L ⁻¹) d'une biomasse contenant environ 60 % de PHB ; a) chauffage classique (3 h à 100 °C), b) chauffage par MO (4 min à 110 W). HS/SPME sur une fibre DVB/CAR/PDMS. Analyse par GC, colonne capillaire DB-WAXetr avec détecteur FID	88
5.3	Séparation et analyse par HPLC/UV des produits dérivés de l'hydrolyse alcaline et acide du PHB. L'hydrolyse a été complétée après 4 h dans un bloc chauffant à 70 °C	91
5.4	Courbes d'étalonnage pour le dosage du PHB à partir de l'AC et du 3HB issus de l'hydrolyde alcaline, analyse par HPLC/UV	92
5.5	a) Chromatogramme type de l'analyse HS/SPME – GC/FID après l'hydrolyse alcaline; b) étalonnage du PHB exprimé par l'acide crotonique qui en découle ..	93
5.6	Récupération de l'AC et du 3HB obtenus par l'hydrolyde acide du PHB à 70 °C; a) en fonction de la concentration d'acide sulfurique (t = 4 h) et b) en fonction du temps de digestion (98 % v/v H_2SO_4)	94
5.7	Représentation graphique des % de récupération d'aide crotonique; a) hydrolyse acide (H_2SO_4 98 % v/v), 4 h à différentes températures, b) effet du temps de réaction sur l'hydrolyse du PHB à 100 °C. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences (n = 3)	94
5.8	Efficacité de l'extraction de PHB par EC. Pour les échantillos traités durant 5 et 30 min, T = 50 °C, pour ceux traités pendant 24 et 48 h, T ≈ 25 °C. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences (n = 3)	96
5.9	Efficacité de l'extraction de PHB par EAM, T = 50 ± 1 °C. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences (n = 3)	97
5.10	Efficacité de l'extraction de PHB par EAS, T = 50 °C. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences (n = 3)	98
5.11	Test de reproductibilité dans le bain ultra-sons « Aquasonic » 150D. PHB (%), pourcentage récupération de PHB ± l'écart type de trois expériences (n = 3)	98

5.12	Comparaison de l'efficacité d'extraction de PHB selon l'approche utilisée. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences (n = 3)	101
6.1	Formation parallèle d'acide 3-hydroxybutyrique (3HB) et d'acide crotonique (AC) à partir de l'hydrolyse alcaline du PHB, proposée par Yu et <i>al.</i> , (2005) ..	107
C.1	Méthanolyse acide de 20 mg PHB avec 2 mL MeOH acidifié (10%(v/v) H ₂ SO ₄), contenant 8 g L ⁻¹ d'acide benzoïque (AB) comme étalon interne et 2 mL CHCl ₃ , a) chauffage classique (3 h, 100 °C), b) chauffage par micro-ondes (MO) 4 min, P _{MO} =110 W. Injecteur split, volume d'injection 1 µL. Colonne capillaire SPB-1 connectée à un détecteur FID	120
C.2	Méthanolyse acide de 20 mg de biomasse renfermant 60% en PHB (mg PHB/mg biomasse sèche), a) méthode classique, b) chauffage par MO. Injecteur split, volume d'injection 1 µL. Colonne capillaire SPB-1 connectée à un détecteur FID	120
C.3	Méthanolyse acide de 10 mg PHB avec du MeOH acidifié (10 % (v/v) H ₂ SO ₄), contenant 8 g L ⁻¹ d'AB et 2 mL CHCl ₃ (méthode classique). Injection directe de la phase organique (1µL). Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID	121
C.4	Méthanolyse acide de 10 mg PHB avec du MeOH acidifié (10 % (v/v) H ₂ SO ₄) et : a) 8 g L ⁻¹ ; b) 1 g L ⁻¹ d'AB. SPME sur une fibre 50-30µm <i>Stable Flex</i> (23- <i>Gauge</i>) Divinylbenzene/Carboxen/Poly dimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID	121
C.5	Méthanolyse acide-HS/SPME-GC/FID de 20 mg d'une biomasse renfermant 60% en PHB avec MeOH/H ₂ SO ₄ (10 % (v/v)/AB (1 g L ⁻¹). Fibre : 50-30 µm DVB/ CAR/PDMS <i>Stable Flex</i> (23- <i>Gauge</i>). Colonne DB-WAXetr/détecteur FID.	122
C.6	Méthanolyse acide-MO-HS/SPME-GC/FID. PHB= 2 mg, P _{MO} =110W, t _R = 4min. Séparation et analyse par GC sur une colonne DB-WAXetr/détecteur FID	122
C.7	Méthanolyse acide de 10 mg du copolymère P(3HB-co-3HV) (70 : 30% mol). Chauffage par MO (P _{MO} =110 W, t _R =5 min) et SPME sur une fibre 50-30 µm DVB/CAR/PDMS <i>Stable Flex</i> (23- <i>Gauge</i>). Séparation et analyse par GC sur une colonne DB-WAXetr/détecteur FID	122
C.8	Méthanolyse acide-MO-HS/SPME-GC/FID. Biomasse (20 mg) renfermant 60% en PHB. Chauffage par MO (P _{MO} = 110 W et t _R = 4 min). Séparation et analyse par GC sur une colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID	123

- C.9 Hydrolyse alcaline (10 mg de PHB + 1 mL NaOH 4M, 4 h à 70 °C). Séparation et analyse par HPLC-UV à 210 nm. PHB exprimé par l'acide crotonique (AC) à 43min le *cis*-AC et à 47min le *trans*-AC. Et à 23min par l'acide hydroxybutyrique (3HB) 123
- C.10 Hydrolyse alcaline-HS/SPME-GC/FID. Fibre : 50-30µm DVB/CAR/PDMS *Stable Flex (23-Gauge)*. Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID 124
- C.11 Hydrolyse alcaline-MO-HS/SPME-GC/FID. Fibre :50-30µm DVB/CAR/PDMS *Stable Flex (23-Gauge)*. Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID 124
- C.12 Hydrolyse acide (10 mg de PHB + 1mL H₂SO₄ (95-98 % v/v), 4 h à 70 °C). Séparation et analyse par HPLC-UV à 210 nm. PHB exprimé par les isomères *cis* et *trans* de l'acide crotonique à 43 min et 47 min respectivement 124

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Aperçu de la famille des biopolymères d'origine naturel. (Source : USCOTA, 1993.)	9
1.2 Structure générale des PHA (homopolymères)	10
1.3 Propriétés physiques et mécaniques des différents polymères	12
1.4 Composition et propriétés des films de PHA	13
1.5 Composition des poly(3- hydroxyalcanoate) accumulés dans des bactéries. Le nombre de carbone (C) change selon le substrat utilisé	18
1.6 Production de poly(3- hydroxyalcanoate) dans deux souches d'Alcaligenes eutrophus (ATCC 17699 et NCIB 11599) en fonction du substrat	18
1.7 Composition et poids moléculaire des PHA produits par différentes bactéries	19
2.1 Sélection du mode d'extraction en fonction de l'élément analysé, de la matrice dans laquelle il se trouve et des conditions d'analyse	30
2.2 Spécificité des fibres SPME	34
5.1 Performance de la méthode Méthanolyse/SPME (mode <i>headspace</i>)-GC/FID pour l'analyse du PHB dans les cellules d' <i>A. latus</i> . SPME à 40°C (fibre : DVB/CAR/PDMS)	87
5.2 Statistiques de régression supplémentaires de la méthode MO-HS/SPME-GC/FID	89
5.3 Méthanolyse acide de la biomasse et analyse du PHB par les différentes approches	90
5.4 Valeur critiques de $F(Fc)$, en fonction de la certitude (α) et du nombre de degrés de liberté (ν)	90
5.5 Rapport AC/3HB en fonction du poids et de la concentration molaire de PHB. Hydrolyse alcaline, 4 h à T = 70 °C	92
5.6 Taux de récupération de PHB, obtenu à partir des étalons témoins	99

5.7	Quantité de PHB retrouvée dans les échantillons de biomasse lors des analyses par GC et qui ne provient pas de la lyse enzymatique.	100
5.8	Efficacité de la lyse enzymatique avec de la kytalase comme méthode d'extraction du PHB accumulé dans les cellules d' <i>A. latus</i>	100
A.1	Méthodes d'analyse des PHA revues par De Rijk et <i>al.</i> (2002).	116
B.1	Des enzymes lytiques d'origine microbienne et conditions optimales de digestion. (Tiré de : Andrews et Asenjo, 1987.).....	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAC	Agriculture et Agroalimentaire Canada
AB	Acide benzoïque
AC	Acide crotonique
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie
APE	Agir pour l'environnement
ASE	Extraction accélérée aux solvants (<i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BPC	Biphényles polychlorés
C	Nombre de carbones
C/N	Rapport de la masse de carbone sur la masse d'azote
C/P	Rapport de la masse de carbone sur la masse de phosphate
CAVIN	<i>CAVitation INtensity</i>
CE	Électrophorèse capillaire (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CHCl ₃	Chloroforme
CIP	Carbonyle de fer (<i>Carbonyl Iron Powder</i>)
CPG	Chromatographie par perméation de gel (<i>Gel Permeation Chromatography</i>)
d.i	Diamètre interne
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylesulfoxyde
DSC	Calorimétrie à balayage différentiel (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane
EAM	Extraction assistée par micro-ondes
EAS	Extraction assistée par sonication
EC	Extraction par solvant (méthode classique)
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ESE	Extraction renforcée aux solvants (<i>Enhanced Solvent Extraction</i>)

ESI	<i>Ionisation par électrospray</i> (Electrospray Ionisation)
F	Statistique <i>F</i> , fonction de la certitude (α) et du nombre de degrés de liberté (ν)
FID	Détecteur par ionisation à flamme (<i>Flame Ionization Detector</i>)
FTIR	Spectrométrie infra rouge à transformée de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
G ⁻	Bactéries gram-négatives
G ⁺	Bactéries gram-positives
GC	Chromatographie en phase gazeuse (<i>Gas Chromatography</i>)
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
3HB	Acide 3-hydroxybutyrique ou 3-hydroxybutyrate
HPAS	Hétéropolycycles aromatiques soufrés
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS	Espace de tête (<i>Headspace</i>)
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
IC	Chromatographie ionique (<i>Ion Chromatography</i>)
ICI	<i>Imperial Chemical Industries</i>
ISO	<i>International Standards Organisation</i>
LE	Lyse enzymatique
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
LRL	Limite du domaine de réponse linéaire
MAE	<i>Microwave-assisted extraction</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MAP	Procédés assistés par micro-ondes
mCWLE	<i>Microbial Cell Wall Lytic Enzyme</i>
ME	Membrane externe
Me3HB	Ester méthylique de l'acide 3-hydroxybutyrique
Me3HV	Ester méthylique de l'acide 3- hydroxypentanoïque
MeAB	Ester méthylique de l'acide benzoïque

MeOH	Méthanol
Mn	Masse molaire moyenne en nombre
MO	Micro-ondes
MP	Membrane plasmique
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)
Mw	Masse molaire moyenne en masse
NaOCl	Hypochlorite de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NPCM	Matière cellulaire qui n'est pas du PHA, (<i>non-PHA cell material</i>)
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PBSA	Poly (butylène succinate-co-butylène adipate)
PCL	Poly (ϵ -caprolactone)
PDA	Réseau de photodiodes (<i>Photo Diode Array</i>)
PE	Polyéthylène (ou polyéthène)
PEC	Carbonate de polyester
PET	Polyéthylène téréphtalate
PG	Peptidoglycane
PHA	Poly (hydroxyalcanoates)
PHB	Poly (3-hydroxybutyrate)
PHBV	Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)
P(3HB-co-3HV)	Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)
PHV	Poly (3-hydroxyvalérate)
PLA	Poly (acide lactique)
P _{MO}	Puissances de micro-ondes
PP	Polypropylène
PPC	Polymères ou plastiques pétrochimiques conventionnels
PVC	Poly (chlorure de vinyle) ou poly (chloroéthène) (<i>Poly Vinyl Chloride</i>)
R ²	Coefficient de détermination
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)

SFC	Société française de chimie
SFE	Extraction par fluide supercritique (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SFME	Extraction par micro-ondes sans solvant (<i>Solvent-free microwave extraction</i>)
SPME	Micro-extraction en phase solide (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques (<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>)
T _f	Température de fusion
T _g	Température de transition vitreuse
TMS	<i>trimethylsilyl</i>
USCOTA	<i>United States Congress Office of Technology Assessment</i>
UV	Détecteur ultraviolet

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré Celsius
ϵ'	Constance diélectrique
ϵ''	Perte diélectrique
%	Pourcentage
μL	Microlitre
μm	Micromètre
cm	Centimètre
cm^2	Centimètre carré
cm^3	Centimètre cube
g	Gramme
<i>g</i>	Gramme-force
GHz	Gigahertz
h	Heure
kg	Kilogramme
kHz	Kilohertz
kPa	Kilopascal
L	Litre
M	Molarité
m	Mètre
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mm	Millimètre
Mt	Mégatonne
N	Normalité

nm	Nanomètre
rpm	Rotations par minute
s	Seconde
$\tan \delta$	Facteur de perte diélectrique
v/v	Volume par volume
w/v	Poids par volume
w/w	Poids par poids
W	Watts

RÉSUMÉ

Les polyhydroxyalcanoates forment une famille de polymères naturels, biodégradables et biocompatibles, à laquelle appartient le poly(3-hydroxybutyrate) ou PHB. Les chercheurs s'efforcent constamment de raffiner les procédés actuels pour produire des bioplastiques qui soient des solutions de remplacement viables des plastiques pétrochimiques. Les études nécessitent des techniques d'analyse rapides, fiables et économiques. La présente étude vise différentes méthodes d'analyse et d'extraction du PHB intracellulaire.

Dans ce travail, la bactérie *Alcaligenes latus* a été utilisée pour transformer le saccharose en PHB. Pour l'analyse du PHB à l'intérieur des cellules, différentes approches impliquant sa dépolymérisation par hydrolyse et par méthanolyse ont été développées. L'utilisation de la micro-extraction en phase solide (SPME) a permis d'éliminer l'utilisation du chloroforme et de minimiser les étapes de préparation de l'échantillon avant l'analyse par GC. La SPME a été mise au point en utilisant une fibre de DVB/CAR/PDMS pour l'extraction de l'acide crotonique produit par l'hydrolyse et de l'ester méthylique issu de la méthanolyse. Les limites de détection, de quantification et de linéarité ont été très satisfaisantes et toutes les approches développées ont été validées. La méthanolyse du PHB sous irradiation micro-ondes (MO) a permis de réduire le temps de réaction de 3 h à 4 min. Pour la récupération du PHB, plusieurs techniques d'extraction ont été utilisées dont l'extraction au chloroforme assistée par sonication et par MO et la lyse enzymatique avec la kitalase. Après 5 min d'irradiation à 440W, il a été récupéré $86 \% \pm 10 \%$ du PHB avec 3 mL de chloroforme. Sans l'application des MO, il a fallu 48 h et 10 mL de solvant pour en récupérer $96 \pm 3\%$.

L'estérification par méthanolyse assistée par MO, suivie d'une analyse par SPME-GC, s'est avérée une méthode simple, fiable et économique, permettant le dosage du PHB intracellulaire en moins d'une heure. Pour la récupération du PHB, la technique plus efficace a été l'extraction assistée par MO avec une réduction importante du temps et de la quantité de solvant d'extraction.

Mots-clés : poly(3-hydroxybutyrate), micro-ondes ; micro-extraction en phase solide

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au cours de ces dernières décennies, les polymères dérivés du pétrole ont pris une place prépondérante dans la vie de tous les jours, représentant plus du 90 % des plastiques commercialisés. Face à la hausse du prix du pétrole et la diminution progressive des stocks, ce secteur dépendant essentiellement des ressources fossiles devra rapidement trouver une alternative aux matières premières conventionnelles qu'il utilise. C'est pourquoi les recherches sur les plastiques biodégradables produits à partir de ressources renouvelables constituent aujourd'hui un enjeu majeur.

Dans ce domaine, les polyhydroxyalcanoates (PHA), dotés de nombreuses propriétés thermoplastiques et biodégradables, apparaissent comme des candidats prometteurs pour offrir une alternative aux polymères issus de la pétrochimie. Les PHA sont des biopolymères issus de ressources renouvelables, produits par une grande variété de bactéries qui le stockent comme réserve énergétique intracellulaire. Les PHA peuvent être totalement dégradés par des microbes. Malgré son caractère biodégradable et biocompatible qui permet d'envisager des applications dans de nombreux domaines, leur utilisation reste très limitée en raison de leur coût de revient élevé.

Le présent projet a comme objectif premier, la mise au point d'une méthode pour la quantification rapide des PHA renfermés dans la biomasse, dans le but de pouvoir diriger la fermentation vers la production accrue de biopolymères. La méthode classique de dosage des PHA est une méthode lourde faisant appel à la dérivatisation et l'extraction liquide-liquide avant l'analyse par chromatographie gazeuse (GC). L'utilisation de la micro-extraction en phase solide (SPME) comme méthode de préparation de l'échantillon à analyser, permettra d'extraire spécifiquement et quantitativement les composés dérivés avant de les analyser par chromatographie gazeuse. Aussi il sera envisagé l'utilisation des micro-ondes (MO) pour réduire de façon importante le temps de la réaction de dérivatisation précédant l'analyse par GC.

Le second objectif de ce travail sera de proposer une paramétrisation (et donc une possible optimisation) de l'étape d'extraction des PHA. Pour ce faire, diverses techniques d'extraction seront testées en vue de diminuer ou de remplacer les solvants organiques utilisés actuellement, qui sont polluants et qui peuvent entraîner une dégradation partielle du produit final.

L'extraction de molécules issues des biomatériaux, par les techniques conventionnelles, se révèle être une étape souvent délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant. Le développement de techniques modernes, l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, a pour but de palier ces difficultés en augmentant l'efficacité, la sélectivité et la cinétique d'extraction par une chimie plus respectueuse de l'environnement.

La lyse, ou digestion enzymatique, est une technique de récupération des biopolymères sans solvant organique. Elle permet l'isolement efficace et précis du PHA accumulé dans *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli*, et tout autre microorganisme dont les parois cellulaires sont susceptibles d'être lysées par des enzymes lytiques. La digestion enzymatique sera effectuée sur la biomasse d'*Alcaligenes latus* en utilisant la kitalase, une préparation enzymatique d'origine microbienne.

Les objectifs secondaires du travail consistent à : se familiariser avec des polymères biodégradables, appliquer des techniques de préparation d'échantillons (dérivatisation-SPME), utiliser la technique des micro-ondes pour la préparation des échantillons (MO-dérivatisation-SPME) et étudier et comparer différentes méthodes pour l'extraction des PHA.

Ce projet a été fait en collaboration avec des chercheurs du Groupe Chimie Analytique et Environnementale à l'IRB-CNRC. La révision bibliographique a été subdivisée en trois chapitres, le premier présente un survol des polymères, des biopolymères et notamment des biopolymères d'origine bactérienne. Dans le chapitre II seront abordées les principales méthodes d'analyse des PHA. Le chapitre III visera les techniques d'extraction et de récupération des PHA d'origine bactérienne. Les chapitres IV (Matériels et Méthodes), V (Résultats) et VI (Discussion) décrivent les techniques utilisées et les principaux résultats obtenus au cours de la présente étude.

CHAPITRE I

POLYMÈRES. GÉNÉRALITÉS ET PROBLEMATIQUE

1.1 Généralités

Les plastiques ou polymères peuvent être d'origine naturelle, obtenus par modification chimique d'un polymère naturel, ou entièrement synthétisés par voie chimique ou enzymatique par une réaction de polymérisation. Les polymères sont souvent classés d'après leurs propriétés thermomécaniques. Citons notamment : les thermoplastiques, qui deviennent malléables quand ils sont chauffés permettant ainsi leur mise en forme, les thermodurcissables, qui durcissent sous l'action de la chaleur ou par addition d'un additif et les élastomères, qui sont déformables de manière réversible. Les polymères industriels peuvent être fabriqués à partir d'un seul type de monomère, ce sont des homopolymères, comme par exemple le polystyrène, ou à partir de plusieurs types de monomères pour donner des copolymères, comme par exemple l'acrylonitrile butadiène styrène (Wikipédia, 2007).

Selon leur provenance, les polymères sont classés en deux catégories : polymères pétrochimiques conventionnels et polymères issus de ressources renouvelables.

1.2 Polymères pétrochimiques conventionnels

Les plastiques pétrochimiques constituent une industrie importante, en pleine croissance. Près de 73 Mt de plastiques ont été fabriqués en Amérique du Nord et en Europe occidentale. Il est prévu que les taux de croissance seront de 3 à 4 % en Amérique du Nord et de 4 à 5 % en Europe. L'emballage est le principal segment de marché aux États-Unis (25 %) et en Europe (36 %) (AAC, 2003). Les polymères ou plastiques pétrochimiques conventionnels (PPC)

comme le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP) et le polychloroéthylène ou polychlorure de vinyle (PVC) requièrent généralement beaucoup de temps (entre 200 et 1000 ans) pour leur totale biodégradation. Alors qu'à peine 20 % des plastiques utilisés sont recyclés, ces derniers produisent des pollutions multiples aussi bien en amont de leur fabrication qu'en aval de leur utilisation.

Le polyéthylène est le premier polymère produit au monde. Il se retrouve dans la vie de tous les jours aussi bien dans les couches culottes que dans les sacs de poubelle, les emballages ou les plastiques de protection destinés à l'agriculture. Le PE représente à lui seul 50 % des emballages plastiques. Il s'est consommé en 2003, environ 40 millions de tonnes de PE et 32 millions de tonnes de PP dans le monde (SFC, 2007). Le PVC, avec un bilan de 27 millions de tonnes, est la 3^{ème} matière plastique la plus utilisée dans le monde après le polyéthylène et le polypropylène. Le PVC est extrêmement persistant en présence de conditions environnementales normales. Au niveau de l'élimination, une prudence particulière s'impose car une combustion incomplète entraîne la formation de matières très toxiques, par exemple de l'acide chlorhydrique, de la dioxine, du monoxyde du carbone, du chlorure formique et du formaldéhyde. Compte tenu de la cancérogénicité et de la persistance du chlorure de vinyle, il a récemment été recommandé de renoncer dans la mesure du possible à l'utilisation de ce produit (SFC, 2007).

En général, les PPC sont intéressants pour une utilisation à long terme, mais pas pour une utilisation à court terme. Leur utilisation massive induit des déchets abondants à l'origine d'un problème écologique planétaire. La présence des matières plastiques dans l'environnement doit enfin être considérée comme une réelle pollution au même titre qu'une pollution chimique et pas seulement comme une nuisance; ceci témoignerait de la reconnaissance de la gravité des dommages liés aux plastiques. Plus du 90 % des plastiques commercialisés sont des PPC. Le recours au plastique entraîne donc une dépendance aux matières premières non renouvelables, telles que le pétrole et le gaz naturel.

1.3 Polymères biodégradables

Parmi les polymères biodégradables, on distingue deux grandes familles : les polymères biodégradables d'origine fossile, tels que les polyoléfines et les polyesters aliphatiques biodégradables, et les biopolymères biodégradables issus de ressources renouvelables.

1.3.1 Polymères biodégradables issus de ressources fossiles (pétrochimiques)

De nombreux polymères biodégradables peuvent être obtenus à partir de ressources fossiles, notamment le poly(ϵ -caprolactone) (PCL), le polyéthylène téréphtalate (PET) modifié, le carbonate de polyester (PEC) et d'autres polyesters aliphatiques (ex. Bionelle®, BAK) et des copolyesters aliphatiques et aromatiques (ex. Eastar BIO, Ecoflex) (AAC, 2003).

Les premiers développements de ces matériaux datent du début des années 70. Il s'agissait de développer des polymères combinant les bonnes propriétés d'usage des polymères conventionnels et la propriété d'être dégradés par les micro-organismes.

Dans cette catégorie, sont placés les matériaux « dégradables » obtenus à partir de l'association de polymères traditionnels d'origine pétrochimique, tel que le polyéthylène, avec un composé naturel biodégradable qui peut être de l'amidon ou de la cellulose.

Le polyéthylène constitue alors la matrice de l'ensemble et l'amidon (environ 10 %) est dispersé au sein de la structure. Les micro-organismes consomment l'amidon et laissent le polymère bio-fragmenté (ADEME, 2006).

Les polyoléfines, le polyéthylène et particulièrement le polypropylène, peuvent être oxydativement instables dans l'environnement. Cette instabilité est issue de la présence d'impuretés au sein du polymère, les plus courantes sont des molécules porteuses de groupements hydroperoxydes, impuretés qui induisent une instabilité vis-à-vis de l'oxydation (Rutot et Dubois, 2004).

Les matériaux oxo-dégradables, parfois appelé oxo-biodégradables, sont des thermoplastiques additivés. Il s'agit d'un polyéthylène contenant un agent oxydant qui serait

selon certains spécialistes, du dithio carbamate de fer, du nickel, du manganèse ou du stéarate de nickel pour favoriser la « biodégradation ». Ils ne sont donc pas biodégradables, mais plutôt « dégradables ». Ces métaux, n'étant pas assimilables par les microorganismes, pourraient poser un problème d'écotoxicité (Feuilloley et *al.*, 2005).

Le Neosac est une innovation française, proposée en 2002, Neosac est un sac en plastique additivé. Dans ce cas ci, la dégradation du polyéthylène a lieu en deux temps. À l'extérieur, le plastique est soumis à la chaleur, la lumière et l'oxygène, explique le Professeur Jacques Lemaire, directeur du CNEP. La fragmentation par oxydation prend trois mois, le double si le sac est enterré ou immergé. Il n'y a pas besoin de micro-organismes. Deux ans après la fin de cette « oxo-dégradation », la vraie biodégradation commence.

Selon ses concepteurs, l'assimilation du Neosac par le sol ne laisserait derrière lui que de l'eau et du CO₂. Sa destruction est due au rajout de trois additifs, photo-inducteur, thermo-oxydant et stabilisant, et non à la seule action des micro-organismes, comme dans le cas du papier ou de l'amidon (Maxence, 2005).

L'un des polyesters aliphatiques pétrochimiques les plus connus est assurément la poly(ϵ -caprolactone) ou PCL. Sa dégradation s'opère par clivage de la fonction ester par hydrolyse ou scission enzymatique. La PCL peut être obtenue par polymérisation d'ouverture de cycle de la lactone correspondante, l' ϵ -caprolactone, catalysée par un catalyseur à base d'étain, plus précisément, l'octoate d'étain (Rutot et Dubois, 2004). Des réactions de polycondensation, permettant l'obtention de la PCL, nécessitent des températures élevées (supérieures à 180 °C), des temps de polymérisation très longs et l'élimination des sous-produits pour finalement ne conduire qu'à des polyesters de masses molaires peu élevées qui ne garantissent pas au matériau des performances thermo-mécaniques acceptables. La catalyse de coordination est la méthode la plus utilisée tant au niveau des études scientifiques qu'en production industrielle (Bruzard, 2004).

D'autres polyesters biodégradables sont également produits industriellement par réaction de condensation à haute température entre des diols et des diacides carboxyliques. Dans ce groupe sont répertoriés les polyesters entièrement aliphatiques comme le

poly(butylène/éthylène-adipate/succinate) obtenu par réaction de condensation de l'éthylène glycol et du butane-1,4-diol avec les acides adipique et succinique et commercialisés par « *Showa High Polymers* » sous le nom de Bionolle® et les polyesters aromatiques comme le poly(butylène adipate/téréphtalate), produit par réaction de condensation entre le butane-1,4-diol et un mélange d'acide adipique et téréphtalique (avec moins de 25 % en diacide aromatique), commercialisé à la fois par Eastman Chem (Eastar Bio®) et par BASF (Ecoflex®) (Rutot et Dubois, 2004).

L'utilisation des polymères biodégradables issus de la pétrochimie présente des inconvénients non négligeables. Tout d'abord, étant d'origine fossile, leur dégradation produit du CO₂ qui est renvoyé dans l'atmosphère, contribuant de ce fait à l'augmentation de l'effet de serre. Ensuite, il convient de se soucier de la disponibilité de ces matières premières, qui sont loin d'être inépuisables et dont le prix ne cesse d'augmenter.

Le contexte écologique et économique actuel met l'accent sur la nécessité de substituer les matériaux plastiques d'origine pétrochimique par des matériaux plastiques biodégradables issus d'une biomasse renouvelable.

1.3.2 Polymères biodégradables issus de ressources renouvelables

Les biopolymères biodégradables issus de ressources renouvelables peuvent être classés en trois catégories :

- les polymères d'origine bactérienne comme les lipides de type acide gras tels les polyhydroxyalcanoates (PHA);
- les polymères issus directement des ressources végétales : polysaccharides, protéines et lipides (PHA);
- les polymères dont seuls les monomères sont issus de la biomasse tels que les polymères dérivés des acides lactiques : le poly(acide lactique) noté PLA.

Ces biopolymères, aussi dénommés biomatériaux, sont synthétisés dans les plantes ou les microorganismes par voie enzymatique et sont de ce fait dégradés rapidement dans un milieu biologique. Ils présentent en outre l'avantage non négligeable, de ne pas contribuer à l'augmentation de l'effet de serre. En effet, le CO₂ issu de leur dégradation réintègre le cycle biologique où il permet de synthétiser de nouvelles biomolécules via le processus de la photosynthèse. Le bilan global en CO₂ peut ainsi être nul et sans effet négatif sur notre environnement.

Le tableau 1.1 donne un aperçu de la large gamme des biopolymères naturels. En général, ces molécules peuvent être fournies par le bétail, les cultures, les végétaux forestiers, les formes de vie marine (ex. algues, mollusques et crustacés), les bactéries et les champignons microscopiques.

1.4 Polyhydroxyalcanoates

Les polyhydroxyalcanoates ou PHA sont des polyesters linéaires d'hydroxyalcanoates (HA) (figure 1.1). Les PHA sont synthétisés par les êtres vivants : végétaux, animaux et microorganismes (bactéries, champignons, algues). Le polymère s'accumule dans le cytoplasme de certaines bactéries placées en condition de fermentation et en excès d'une source de carbone. Les PHA peuvent également être synthétisé dans certaines plantes. Dans ce cas, la production de PHA est effectuée par transformation génétique des plantes à l'aide de gènes modifiés de micro-organismes. Les dits gènes codent les enzymes nécessaires pour synthétiser le PHA à partir d'acétyl-CoA ou de métabolites apparentés.

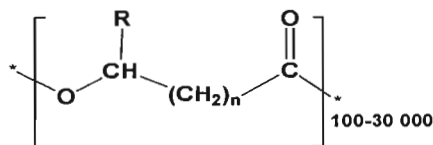


Figure 1.1 Unité monomérique (HA) des polyhydroxyalcanoates (PHA).
(Tiré de : Ojumu et al., 2004.)

Tableau 1.1 Aperçu de la famille des biopolymères d'origine naturel. (Source : USCOTA, 1993.)

Polyesters PLA (polymères d'acides lactiques) PHA (polyhydroxyalcanoates)	Polysaccharides (plantes/algues) Amidon, Cellulose, Pectine, Agar, Alginate Carraghénane, Konjac, Gommés
Protéines Zéine, Gluten, Polyacides aminés Silks, Collagène/gélatine, Élastine Résiline, Adhésives, Sérum d'albumine Soya, caséine	Polysaccharides (animal) Acide hyaluronique, Chitine / chitosane
Polysaccharides bactériens Gellane, Dextrane, Xanthane Curdlane, Lévané, Polygalactosamine Celluloses bactériennes	Lipides / surfactants Acétoglycérides, cires, Emulsan
Polysaccharides fongiques Glucane de levure Pullulane, Elsinane	Polyphénols Lignines, Tannins, Acides humiques
	Autres polymères Shellac PGA (poly-gamma-glutamique) Polymères synthétisés à partir de graisses et d'huiles (ex :. nylon à partir de l'huile de ricin)

Le premier PHA isolé et caractérisé a été le poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) (Lemoigne, 1926). Plus tard, Wallen et Rohwedder (1974) rapportent l'identification d'autres PHA, le poly-3-hydroxyvalérate et le poly-3-hydroxyhéxanoate. À date, plus de 40 PHA différents ont déjà été caractérisés, avec des polymères contenant des liaisons insaturées ou divers groupes fonctionnels (Steinbüchel, 1991). Les PHA, les plus communs sont répertoriés dans le tableau 1.2. Selon leur structure, ils peuvent être des matériaux thermoplastiques ou élastomères, avec des points de fusion s'étendant de 40 à 180 °C.

Tableau 1.2 Structure générale des PHA (homopolymères).

n	R	Homopolymère	Acronyme
1	hydrogène	poly -3-hydroxypropionate (3HP)	PHP
	méthyle	poly -3-hydroxybutyrate (3HB)	PHB
	éthyle	poly -3-hydroxyvalérate (3HV)	PHV
	propyle	poly -3-hydroxycaproate (3HC)	PHC
	butyle	poly -3-hydroxyhéxanoate (3HH)	PHH
	pentyle	poly -3-hydroxyoctanoate (3HO)	PHO
	hexyle	poly -3-hydroxynonanoate (3HN)	PHN
	heptyle	poly -3-hydroxydécanoate (3HD)	PHD
	octyle	poly -3-hydroxyundécanoate (3HUD)	PHUD
	nonyle	poly -3-hydroxydodécanoate (3HDD)	PHDD
2	hydrogène	poly -4-hydroxybutyrate (4HB)	P4HB
3	hydrogène	poly -5-hydroxyvalérate (5HV)	P5HV

n et R, de la figure 1.1

Tiré de : Doi, Y., *Microbial Polyesters*, chapitre 3, VCH, New York, 1990, p. 33-62.

En général, les PHA à chaînes latérales courtes se comportent comme des thermoplastiques, de même que le polypropylène. Ceux dont les chaînes latérales sont longues ont des propriétés qui les rapprochent davantage des élastomères.

Les PHA peuvent être homopolymères (tous les motifs de répétition (monomères) sont de même nature chimique) ou copolymères (formés de plusieurs types de monomères). En général, les copolymères contiennent une unité de répétition majoritaire, mais ils contiennent aussi d'autres unités en proportion variable, selon le substrat, la bactérie utilisée et/ou les conditions de culture. Ils ont vu le jour dans le but d'améliorer les propriétés physiques et mécaniques des homopolymères et de permettre leur utilisation en remplacement des plastiques conventionnels. Parmi eux se retrouve le poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalérate) noté (P(3HB-*co*-3HV) ou PHBV. La figure 1.2 illustre les homopolymères, PHB et PHV et leur copolymère, PHBV.

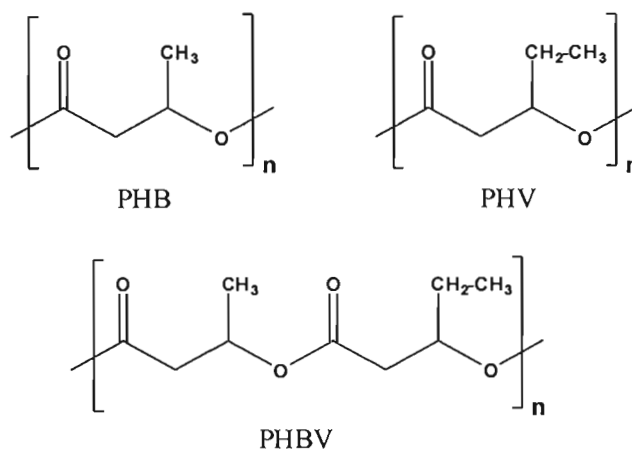


Figure 1.2 Les homopolymères, PHB et PHV et leur copolymère, le PHBV.

1.4.1 Les PHA en tant que plastiques

Le poly-3-hydroxybutyrate ou PHB est probablement le plus commun des polyhydroxyalcanoates. Ce matériau est imperméable et résistant à la chaleur et ses propriétés biodégradables en font un thermoplastique idéal. En plus, il se métabolise complètement et rapidement. Le PHB a toutefois d'autres qualités inhabituelles, de sorte qu'il serait dommage de concevoir ce polyester uniquement dans sa fonction biodégradable. Les objets courants en PHB ont une couleur plaisante et une surface brillante.

Malgré les caractères biodégradable et biocompatible du PHB, qui permettent d'envisager des applications dans de nombreux domaines, son utilisation reste très limitée en raison de son caractère trop cristallin. Par contre, le poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate), moins cristallin et donc moins fragile que le poly(3-hydroxybutyrate), a rapidement montré un réel intérêt commercial. Tous les deux ont attiré l'attention comme matière plastique parce que leurs propriétés physiques sont remarquablement semblables à celles du polypropylène (PP), quoique les deux polymères aient les structures chimiques tout à fait différentes. Le tableau 1.3 résume quelques-unes des propriétés de thermoplastiques d'origine bactérienne et des thermoplastiques conventionnels tels que le polyéthylène téréphtalate (PET) et le polypropylène (PP).

Tableau 1.3 Propriétés physiques et mécaniques des différents polymères.

Propriété	PET	PP	PHB	P(3HB-4HB) 16% 4HB ^a	P(3HO-3HH) 11% 3HH ^b	P(3HB-3HV)	
						3 % ^c	25 % ^c
T _f (°C)	267	176	177-180	150	61	170	137
T _g (°C)	69	-10	4	-7	-36	8	-6
Cristallinité (%)	30-50	50-70	60-80	45	30	-	40 ^d
Densité (g cm ⁻³)	1,385	0,905	1,250	-	-	-	-
A (%)	100	400	6	444	300	-	-
RRT (MPa)	70	38	40	-	-	38	30
A-éq (%)	0,40	0,01	0,20	-	-	-	-
MY (GPa)	2,9	1,7	3,5	-	-	2,9	0,7

T_f : Température de fusion; T_g : Température de transition vitreuse; A : Allongement à la rupture en traction; RRT : Résistance à la rupture en traction; A-éq : Absorption d'eau – équilibre; MY Module de Young; (c): pourcentage en mol de 3HV; - : non disponible; (a) et (b) : tiré de Madison et Huisman, 1999; (d): tiré de Ojumu *et al.*, 2004, P(3HB-3HV) : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), P(3HB-4HB) : poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), P(3HO-3HH) : poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyhexanoate). Tiré de : Doi, Y., *Microbial Polyesters*, chapitres 6 et 7, VCH, New York, 1990, p. 99-133.

Les échantillons du copolymère P(3HB-co-3HV), ayant entre 0 et 25 % mol de 3HV, sont plus flexibles que ceux de PHB, l'augmentation du nombre d'unités de 3HV a entraîné une diminution du module de Young. La température de transition vitreuse (T_g) des copolymères diminue linéairement avec l'augmentation de la concentration molaire de 0 à 95 % mol de 3HV et de 0 à 82 % mol de 4HB (Doi, 1990). La température de fusion (T_f) diminue également avec l'augmentation de la concentration molaire de 3HV dans cette gamme de concentrations.

La cristallinité des polymères n'est pas toujours désirée, car elle peut limiter les applications en tant que plastiques. Dans le cas des PHA, la cristallinité ainsi que le poids moléculaire dépendent de façon importante du nombre d'unités de chaque homopolymère qui forme le copolymère tel que montré dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4 Composition et propriétés des films de PHA.

3HB	3HV (% mol)	4HB	Cristallinité(%)	Poids moléculaire
100	0	0	60 ± 5	782 000
91	9	0	58 ± 5	-
47	53	0	63 ± 5	-
5	95	0	70 ± 5	-
90	0	10	45 ± 5	-
56	0	44	15 ± 5	-
76	24	0	-	291 000
55	45	0	-	400 000
29	71	0	-	254 000
89	0	11	-	223 000
83	0	17	-	332 000
18	0	82	-	129 000

- : non disponible. Tiré de : Doi, Y., *Microbial Polyesters*, chapitre 7, VCH, New York, 1990, p. 106-133.

Finalemment du PHB 100 % accumulé dans deux souches bactériennes différentes, l'*A. eutrophus* et l'*E. coli* recombinant ont été comparées dans les travaux de Hahn et al. (1995 et 1998). La caractérisation morphologique des deux polymères a été effectuée in vivo et après l'extraction avec du chloroforme et de l'hypochlorite de sodium par calorimétrie à balayage différentiel (DSC). Le PHB provenant de l'*E. coli* montrait, dans les deux essais, une structure quasiment cristalline avec un degré de cristallinité d'environ 60 %. Par contre le PHB intracellulaire de l'*A. eutrophus* était beaucoup plus amorphe (degré de cristallinité de 16 %). L'analyse par calorimétrie à balayage différentiel (DSC) après extraction et purification était entre 60 et 65 %. Ceci a fait suggérer aux auteurs que la formation d'une structure cristalline dans le PHB provenant de l'*A. eutrophus* se produit durant les étapes d'extraction et de récupération.

1.4.2 Production des PHA par fermentation bactérienne

La fermentation, que les hommes utilisent depuis des centaines d'années, devient encore plus évoluée lorsqu'elle est jumelée aux nouvelles techniques biotechnologiques. Ce procédé consiste à faire appel à des microorganismes pour transformer des substances organiques en l'absence d'oxygène. La fermentation productrice de polyesters bactériens peut conduire, en moins de 40 h, à une solution contenant de l'eau, des sels et des cellules renfermant jusqu'à 90 % de leur poids sec en polymère (Doi, 1990).

Plus de 250 souches bactériennes, des espèces gram-négatives et gram-positives, sous leur forme sauvage ou recombinante, sont capables de stocker des lipides sous forme d'acides polyhydroxyalcanoates (Ojumu *et al.*, 2004; Doi, 1990; Steinbüchel *et al.*, 1992).

Les gènes de la biosynthèse du PHB d'*Alcaligenes eutrophus* ont été clonés dans des bactéries communes telles que l'*Escherichia coli*, l'*Aérogènes* et la *Klebsiella* (Dennis *et al.*, 1998). Les gènes d'*Alcaligenes eutrophus* ont aussi été exprimés dans *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas syringae* (Steinbüchel et Schubert, 1989). L'*Escherichia coli* recombinant a été utilisé par Wong et Lee (1998) et par Fidler et Dennis (1992) pour la production de PHB. Ils ont rapporté des accumulations de PHB dans la biomasse de 80 % et 95 % respectivement.

Les micro-organismes utilisent une source de carbone (alcane, alcool, saccharose, amidon, etc...) comme substrat. Il a été montré qu'il est possible de produire du PHA à partir de 137 substrats différents (Gillis *et al.*, 1995). Plusieurs de ces polymères sont en effet produits à partir de matières premières agricoles, comme la canne à sucre, le maïs, le soya, la betterave à sucre, le riz, des huiles végétales ou le tourteau de tournesol. Les déchets alimentaires et les eaux usées, peuvent également servir comme source de carbone. Plusieurs entreprises de transformation des aliments envisagent ainsi de traiter des sous-produits, comme les pelures de pommes de terre et le son de riz blanc, afin de les réacheminer vers la production de divers polymères biodégradables.

Plus récemment, les chercheurs du laboratoire de chimie environnementale et analytique à l'IRB-CNRC ont découvert que la sève d'érable pouvait servir à alimenter, comme source unique de carbone, l'*Alcaligenes latus* pour la production de polymères. L'intérêt de cette réaction provient de la possibilité d'utiliser la sève directement presque sans conditionnement (Yeza et Hawari, 2006).

L'accumulation de PHA dans les cellules est maximale lorsque les bactéries sont cultivées sur des substrats contenant simultanément un excès de carbone et une limitation de l'apport d'autres substances nutritives telles que, l'ammonium, le sulfate, le phosphate, le fer, le magnésium, le potassium ou l'oxygène (Doi, 1990; Steinbüchel et *al.*, 1992). En créant ce déséquilibre, les microorganismes cessent de se multiplier pour commencer à produire du PHA.

Les conditions physico-chimiques de la culture (substrat, pH, température, force ionique, oxygénation, rapport C/N ou C/P, agitation) modulent le rendement de la production ainsi que certaines caractéristiques du polymère final tel que le degré de polymérisation ou encore le pourcentage molaire des unités monomères. Ainsi, en fournissant à la culture une source de carbone spécifique (ou un mélange de substrats carbonés) dans des conditions optimales, on peut influencer la structure moléculaire des PHA et donc leurs propriétés mécaniques.

Pour éviter que les bactéries consomment leurs réserves de PHA, il faut optimiser le temps de fermentation, après lequel, la biomasse est centrifugée, rincée, congelée et lyophilisée. La lyophilisation consiste à congeler la biomasse humide et à sublimer l'eau congelée sous vide. La biomasse déshydratée et refermant le polymère, est analysée afin de déterminer le bilan en PHA.

1.4.3 Biosynthèse des PHA

La biosynthèse des PHA est un ensemble complexe de réactions impliquant différentes enzymes. Des bactéries comme *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas oleovorans*, etc., possèdent des gènes codant les enzymes responsables de la synthèse: la bêta-cétothiolase, l'acétoacétyl CoA réductase et la polyhydroxyalcanoate synthase (PHA-synthase).

La biosynthèse du poly3-hydroxybutyrate (PHB) et du poly3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalérate (PHBV), proposée par Doi, 1990 et Steinbüchel, 1991; Lee, 1996, et illustrée dans la figure 1.3, débute avec la condensation de deux molécules de l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) avec l'acétoacétyl-CoA en présence de l'enzyme 3-cétothiolase (*3-ketothiolase*). Ceci est suivi de l'action de la réductase de l'acétoacétyl-CoA qui réduit l'acétoacétyl-CoA à R (-)-3-hydroxybutyryl-CoA. La PHA-synthase polymérise alors le R (-) - 3-hydroxybutyryl-CoA pour former le PHB et/ou le R (-) - 3-hydroxyvaleryl-CoA pour obtenir le copolymère, noté PHBV ou P(3HB-co-3HV) (Doi, 1990 et Lee, 1996).

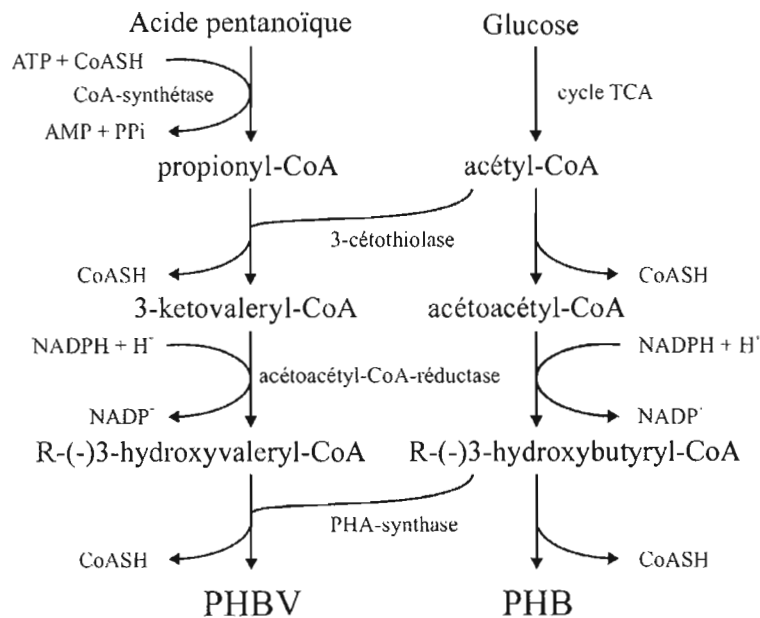


Figure 1.3 Biosynthèse du PHB et du PHBV dans l'*Alcaligenes eutrophus*.

La majorité des PHA se compose de R(-)-3-hydroxyalcanoate (Doi, 1990; Ojumu *et al.*, 2004). Dans le cas des énantiomères, la réactivité chimique ou biochimique de l'un des isomères par rapport à certains agents, notamment les enzymes, peut différer radicalement. Les synthétases de PHA de l'*Alcaligenes eutrophus* et des *Pseudomonas oleovorans* peuvent seulement polymériser des 3-hydroxyalcanoates et ceci, dans une gamme de nombres de carbone de 3 à 14 (Anderson et Dawes, 1990). Divers substrats, D(-)- et L(+)-3-hydroxyacyl-CoA, avec des chaînes entre 4 et 10 carbones ont été étudiés (Doi, 1990). La PHB-synthase extraite d'*Alcaligenes eutrophus* n'est active qu'avec le D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA et le D(-)-3-hydroxyvaleryl-CoA, mais présente une activité nulle avec le L(+)-3-hydroxyacyl-CoA.

L'*Alcaligenes* et l'*Escherichia coli* recombinant possèdent un très haut potentiel pour accumuler le PHB. Ces microorganismes, durant la réalisation de leurs processus cellulaires, transforment les glucides (ex. : le glucose, le fructose et le saccharose) ou les acides gras en homopolymère PHB. Et, comme déjà vu à la figure 1.3, si l'acide pentanoïque est aussi présent, le sous-produit qui en découle est le copolymère. En employant de l'acide pentanoïque en tant que source unique de carbone, la proportion du 3HV dans le PHA produit par l'*A. eutrophus* est de 90 %. La substitution de l'*A. eutrophus* par le *Chromobacterium violaceum*, sur le même substrat, donne un PHA avec 100 % d'unités de 3HV (Steinbüchel *et al.*, 1993; Poirier *et al.*, 1995). Dans des milieux riches en saccharose, seule quelques bactéries sont connues pour synthétiser les PHA constitués des monomères autres que le 3HB (Haywood *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1994).

La nature des PHA synthétisés dépend donc de la souche qui la synthétise et des substrats carbonés disponibles dans le milieu de culture (tableau 1.5 et 1.6). Le taux de synthèse, le niveau d'accumulation et le rendement de PHA variaient considérablement d'une souche à l'autre, ainsi que selon le substrat sous les mêmes conditions de fermentation et pour une même souche. Mais en étudiant la biosynthèse du PHB dans l'*A. eutrophus*, il a été montré que la teneur de PHB est indépendante du niveau de PHB-synthase (Haywood *et al.*, 1989).

Tableau 1.5 Composition des poly(3- hydroxyalcanoate) accumulés dans des bactéries. Le nombre de carbone (C) change selon le substrat utilisé.

Souche	Nombre de carbones dans les unités monomériques de 3- hydroxyalcanoate										
	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	x	x	x								
<i>Alcaligenes faecalis</i>		x	x								
<i>Bacillus megaterium</i>		x	x		x	x					
<i>Pseudomonas cepacia</i>		x	x								
<i>Pseudomonas oleovorans</i>		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tiré de : Doi, Y., Microbial Polyesters, chapitre 3, VCH, New York, 1990, p. 33-62.

En général, les valeurs des masses moléculaires moyennes (Mn) des PHA sont comprises entre 2×10^5 et 3×10^6 daltons, (John et Keller, 1996). Le tableau 1.7 montre que ce poids moléculaire dépend également de l'hôte bactérien et du substrat carbonique. Les dimensions des granules varient selon le micro-organisme (Doi, 1990; Hahn et al., 1998).

Tableau 1.6 Production de poly(3- hydroxyalcanoate) dans deux souches d'*Alcaligenes eutrophus* (ATCC 17699 et NCIB 11599) en fonction du substrat.

Souche	Source de carbone	PHA dans la biomasse (%w/w)	Composition (% mol)	
			3HB	3HV
ATCC	glucose	21	100	0
	fructose	45	100	0
	CH ₃ COOH	35	100	0
	CH ₃ CH ₂ COOH	31	69	31
	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	51	25	75
NCIB	glucose	92	100	0
	fructose	48	100	0
	CH ₃ COOH	42	100	0
	CH ₃ CH ₂ COOH	37	64	36
	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	45	10	90

Les concentrations données (% w/w et % mol), ont été obtenues en plaçant deux souches distinctes de la bactérie *Alcaligenes eutrophus* dans les mêmes conditions de fermentation : 48 heures à 30 °C et pH=7, en absence d'azote (N₂), avec 20 g L⁻¹ de source de carbone. Tiré de : Doi, Y., Microbial Polyesters, chapitre 3, VCH, New York, 1990, p. 33-62.

Tableau 1.7 Composition et poids moléculaire des PHA produits par différentes bactéries.

Souche	Source de carbone	Composition du polyester (mol %)			Mn
		3HB	3HV	4HB	
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	fructose	100	0	0	737 000
	acide butyrique	100	0	0	432 000
	acide pentanoïque	21	79	0	254 000
	γ -butyrolactone	83	0	17	369 000
<i>Escherichia coli</i> *	glucose	100 [§]	0	0	1 210 000 [§]
<i>Bacillus megaterium</i>	glucose	100	0	0	166 000
<i>Zoogloea ramigera</i>	glucose	100	0	0	542 000

Mn : Poids moléculaire déterminé par CPG. **Escherichia coli* recombinante, §: selon (Hahn et *al.*, 1998). Tiré de : Doi, Y., *Microbial Polyesters*, chapitre 2, VCH, New York, 1990, p. 11-32.

1.4.4 Les domaines d'applications et production industrielle des PHA

En plus de résoudre les problèmes de déchets, les plastiques biodégradables ont d'autres avantages. En général, les propriétés des PHA comme plastiques trouvent des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs de l'emballage, du textile, de l'agriculture, de la pharmacie, de l'électronique, de la médecine, de l'automobile, etc.

Les PHA sont des polymères biocompatibles et biorésorbables, deux propriétés recherchées pour des applications médicales et pharmaceutiques. En tant que matériau biocompatible, les PHA sont capables d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner. Pour des applications médicales spécifiques, en plus de la biocompatibilité, on recherche également des matériaux biorésorbables pouvant se décomposer tout naturellement dans l'organisme.

Les matériaux biorésorbables sont dégradés naturellement dans l'organisme humain par hydrolyse enzymatique et libèrent des molécules assimilables et non toxiques. En pharmaceutique, les médicaments à libération contrôlée (figure 1.4) sont des exemples d'application où la biorésorbabilité des polymères joue un rôle important (Rabetafika et *al.*, 2006).

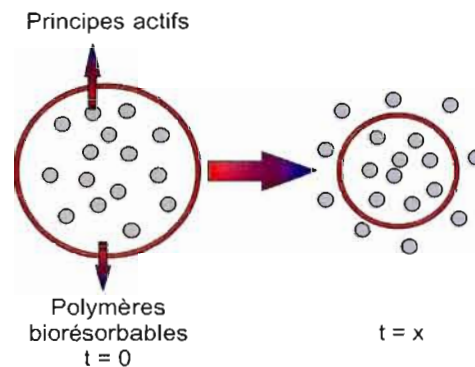


Figure 1.4 Applications des biopolymères : libération contrôlée des principes actifs.

Les PHA présentent encore des propriétés chimiques qui permettent de les utiliser comme support pour d'autres substances. C'est ainsi que dans un avenir proche, il sera probablement possible d'inclure dans des implants des médicaments qui seront libérés peu à peu avec précision à mesure que l'implant se résorbera. Pour les implants médicaux, les matériaux inertes tels que comme les céramiques sont de plus en plus remplacés par des polymères d'origine naturelle (Liu *et al.*, 2001).

Le PHB est utilisé dans la fabrication de bandages chirurgicaux, de fils de suture, de poudre médicale dans des sacs d'ostomie, dans le remplacement d'os, etc. De plus, puisque le PHB est biocompatible et non-toxique, l'organisme hôte l'accepte sans difficulté.

L'utilisation de plastiques biodégradables pourrait s'avérer particulièrement utile dans le domaine agricole, où la propriété de biodégradabilité des biopolymères est essentielle. Dans ce domaine, les films de paillage à base de biopolymères s'imposent progressivement en remplacement des paillis en polymères conventionnels (Rabetafika *et al.*, 2006).

Durant les années 70 suite à une crise mondiale du pétrole le prix du combustible fossile a beaucoup augmenté. Dans ce contexte, les recherches autour des PHA ont fleuri. À la fin des années 1980, ICI Zeneca a commercialisé des PHA. Cette société a développé un processus pour la production à l'échelle industrielle du P(3HB-co-3HV) obtenu par fermentation microbienne, qui a été commercialisé sous le nom de « Biopol ».

En 1994, *Monsanto Chemical* achète le droit de brevet de « Biopol ». Cependant le procédé ne serait pas commercialement viable tant que la teneur n'atteindrait pas 20 % w/w. En 1998, le projet de perfectionnement du « Biopol » a été abandonné et plus tard, en 2001, la propriété intellectuelle a été vendue à *Metabolix, Inc.* (AAC, 2003).

Metabolix a mis au point une voie de polymérisation qui donne des PHA très purs, ayant des applications biomédicales. Les gènes codant les enzymes responsables de la biosynthèse des PHA dans *A. eutrophus* ont été exprimés dans *E. coli* pour comprimer les coûts de production et simplifier la purification. Selon Metabolix, les PHA obtenus par fermentation microbienne finiront par coûter moins de 2,82 \$/kg. Les PHA produits directement dans les végétaux pourraient coûter « bien moins que 1,41 \$/kg (AAC, 2003).

En 2006, Metabolix a formé Telles™, un *joint-venture* 50-50 en participation avec *Archer Daniels Midland Company* (ADM), pour commercialiser la production des biopolymère sous le nom de Mirel™, fait par fermentation microbienne à partir de sucre de maïs, sucre de canne ou d'huiles végétales. Telles™ a mis au point une technologie fiable, compétitive et écologiquement durable pour produire du plastique entièrement biodégradable, en utilisant 90% moins de pétrole que les plastiques traditionnels (MBLX-G, 2007).

Procter & Gamble ont créé une famille de PHA fabriqués par des *Pseudomonas sp* : 1) copolymère de 3-hydroxybutyrate (C4) avec une faible teneur de 3-hydroxyhexanoate (C6), et 2) copolymère de 3-hydroxybutyrate (C4) avec une faible teneur de 3-hydroxyalkanoate dont C > 6.

La résine de Procter & Gamble, appelée Nodax (*P&G's Nodax*), se façonne en films et en feuilles, en articles moulés, en fibres, en élastiques, en laminés et en couchés, en étoffes non tissées, en produits de synthèse du papier et en mousses. Elle possède des propriétés semblables à celles d'une polyoléfine et des propriétés de surface très semblables à celles du PET, notamment la fixation des encres d'impression et des colorants. Le Nodax possède de nombreuses propriétés qui le rendent attrayants pour l'emballage flexible et il devrait se prêter à l'emballage des fromages, des arachides et d'autres aliments riches en huiles, des aliments congelés, des aliments naturels et des viandes (AAC, 2003).

Au Québec, BioMatera Inc. se spécialise dans la mise au point de biopolymères de type PHA, en employant des bactéries pour la fermentation de sirop de glucose. Les matières actuellement envisagées englobent les gels et les crèmes pour les systèmes de médicaments injectables et des matrices pour la fabrication de produits cosméceutiques et la génération des tissus (AAC, 2003; Radio-Canada, 2007).

Les perspectives de développement des matériaux biodégradables sont encourageantes et les spécialistes prévoient une production de plusieurs millions de tonnes par an. Mais, pour atteindre de telles productions, il faut, tout d'abord, réduire le coût des matériaux biodégradables qui à l'heure actuelle reste de 2 à 10 fois supérieur à celui des plastiques d'origine pétrochimiques. Ces coûts peuvent être améliorés grâce à de nouvelles technologies ou à de nouveaux concepts beaucoup plus simples et intégrés de transformation directe d'une matière végétale (ADEME, 2006).

1.5 Biodégradabilité des biopolymères

Le terme « biodégradabilité » suscite beaucoup de discussions. La définition émergente proposée par de nombreux auteurs de la biodégradabilité se traduit par une dégradation du matériau par les microorganismes (De Wilde, 2003; Rutot et Dubois, 2004). Autrement dit, c'est une dégradation biotique qui met en jeu l'action de microorganismes par exemple par voie enzymatique conduisant à une décomposition au niveau moléculaire. Il en résulte alors la formation de CO₂ et H₂O en présence d'oxygène (ou la formation de CH₄, CO₂, H₂O en milieu anaérobie) et d'une nouvelle biomasse appelée humus (Gu, 2003; Auras *et al.*, 2004).

Les bactéries, les champignons et les algues sont les principaux microorganismes impliqués dans la dégradation des polymères. Grâce aux enzymes qu'ils excrètent, ces microorganismes peuvent utiliser les polymères et leurs produits de dégradation comme source de carbone et d'énergie (Doi, 1990).

La biodégradabilité de la plupart des biopolymères est due à la présence de liaisons facilement clivables comme les liaisons esters ou amides conduisant à la formation de

molécules simples et de fragments de plus petite taille. Ces derniers sont assimilables par les microorganismes pour leur biosynthèse (Gu, 2003). À l'opposé, les polymères pétrochimiques conventionnels dont le squelette carboné est constitué de liaisons covalentes C-C, requièrent beaucoup plus de temps et/ou la présence d'un catalyseur (thermique, radiation électromagnétique ou chimique) pour leur dégradation (Rabetafika *et al.*, 2006).

La dégradation des matériaux par les enzymes peut être le résultat d'un mécanisme radicalaire (oxydation biologique) ou d'un changement chimique (hydrolyse biologique). Dans le cas de l'oxydation biologique, les enzymes réagissent directement avec l'oxygène comme les cytochromoxidases qui sont des enzymes actives dans la chaîne respiratoire. La plupart du temps, l'oxygène est incorporé directement dans le substrat (cas des oxygénases). Parfois, il joue le rôle d'un accepteur d'hydrogène (cas des oxydases). Quant à l'hydrolyse biologique, les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines en acides aminés. Les polysaccharides, par exemple les amidons, sont dégradés par des enzymes pour libérer des sucres et les cellulases, les endo- et exo- glucanases dégradent les celluloses (Rabetafika *et al.*, 2006).

Les polymères d'acides lactiques (ou PLA) sont attaqués par la protéinase K, la pronase ou la bromélaïne (Shimao, 2001). Les polyhydroxyalcanoates, étant des polyesters, sont des polymères avec des liaisons facilement clivables par les estérases, largement présentes chez les organismes vivants.

Une série de microorganismes (aussi bien procaryotes qu'eucaryotes) a été caractérisée comme étant capable de dégrader les PHA. Jusqu'à présent, plus de 10 PHA-dépolymérase différentes ont été purifiées et caractérisées (Brandl *et al.*, 1995). Ces dépolymérase sont excrétées par les mêmes microorganismes qui produisent les PHA et qui sont communs dans les sols, par exemple l'*Alcaligenes faecalis* et la *Pseudomonas lemoignei*. Elles attaquent préférentiellement les PHA et les convertissent en unités monomériques. Le mécanisme de biodégradation est le même que celui de la biosynthèse (figure 1.3) mais dans le sens opposé, il s'agit du métabolisme cyclique des PHA. Donc, la PHA-dépolymérase, troisième enzyme lors de la biosynthèse, sera la première enzyme durant la dégradation (Doi, 1990).

Pour tirer profit de la biodégradabilité des matériaux, ils doivent aussi être compostables. Le PHB et d'autres PHA ne sont toutefois décomposés que lorsque des phosphates, de l'azote, des sels, de la chaleur et de l'humidité permettent la croissance des micro-organismes. Ces conditions sont réunies dans le compost et dans la terre, mais pas dans des conditions normales d'utilisation (CHANVRE-INFO, 2004).

Les taux de dégradation enzymatique des PHA sont fortement influencés par la composition des copolymères (Kang et *al.*, 1995). Les propriétés de biodégradation pourront être ajustées en jouant sur la nature, la composition et la structure (masse molaire, taille, cristallinité,...) du PHA produit (Doi, 1990).

Des études réalisées ont montré que des films (8 cm de diamètre et 0,07 mm d'épaisseur) de P(3HB-*co*-9% 4HB), P(3HB-*co*-50% 3HV), P(3HB-*co*-21% 3HV) et PHB, à des températures entre 16 et 30 °C requièrent de 2 à 8 semaines pour leur total dégradation. La vitesse de dégradation des copolymères dépend de leur structure. Le P(3HB-*co*-9% 4HB) a été complètement dégradé après deux semaines, tandis que le P(3HB-*co*-21% 3HV) et le PHB ont nécessité huit semaines (Doi, 1990). Il a aussi été constaté que le P(3HB-*co*-8% 3HV) se dégradait presque totalement dans les 20 jours en milieu anaérobie, alors que les polyesters aliphatiques synthétiques tels que le PLA, le PBSA ne se dégradent qu'après 100 jours (Shin et *al.*, 1997).

CHAPITRE II

MÉTHODES D'ANALYSE DES PHA

Deux approches sont possibles afin de déterminer la quantité de biopolymère accumulé dans un microorganisme: 1) l'analyse directe de la biomasse contenant le polymère, 2) l'analyse du PHA préalablement extrait de la biomasse.

En raison de leur taille moléculaire, les biopolymères ne peuvent pas être directement quantifiés par des techniques simples comme la chromatographie en phase liquide (LC) ou la chromatographie en phase gazeuse (GC). Ils doivent être dépolymérisés (hydrolysés), pour être analysés par HPLC. Pour utiliser la GC, chaque groupement chimique polaire doit être dérivatisé pour rendre la molécule volatile.

D'autres techniques telles que la spectrométrie infra rouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et les nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem (MALDI/MS) n'ont pas besoin d'une étape de dépolymérisation mais le polymère doit être extrait de la biomasse avant l'analyse.

2.1 Historique

La gravimétrie, utilisée par Lemoigne en 1926, fut la première méthode de quantification du PHB dans les bactéries. Cette technique, nécessitait de grandes quantités d'échantillons, une extraction au chloroforme et était imprécise. Le PHB a été aussi déterminé par la méthode de densité optique résiduelle (Williamson et Wilkinson, 1958). Celle-ci, plus sensible et plus rapide que la précédente, consistait à mesurer la turbidité d'une solution d'hypochlorite après disruption complète des cellules. L'hypochlorite de sodium a été substitué par l'acide sulfurique concentré et chaud conduisant ainsi à la formation de l'acide crotonique,

délectable par absorption UV à 235 nm (Slepecky et Law, 1960). Ces méthodes ne comportant aucune spécificité, sont devenues invalides lorsque de nouveaux PHA sont apparus. Ces approches ont été améliorées par l'introduction de la chromatographie d'exclusion ionique couplée à la HPLC (Karr et *al.*, 1983), mais présente un inconvénient, elle ne peut pas détecter des unités répétées de polymère plus longues que 3HB (Brandl et *al.*, 1989).

Plus tard, le PHB a été identifié par chromatographie en phase gazeuse (GC) après l'hydrolyse alcaline et différentes méthodes de dérivatisation dont la silylation et la méthylation (Wallen et Rohwedder, 1974). Puis, en 1978, il a été proposé un protocole permettant l'analyse du PHB intracellulaire, consistant en la dérivatisation par méthanolyse du PHB et l'analyse par GC de l'ester méthylique de l'acide 3-hydroxybutyrique dérivé (Braunegg et *al.*, 1978). Cette méthode a par la suite été élargie à l'analyse d'autres PHA, le P3HB-*co*-3HV (Comeau et *al.*, 1988).

L'analyse du poly- β -hydroxybutyrate dans les bactéries a aussi été effectuée sous microscope à épifluorescence. Les granules ont été colorés au bleu de Nil A, la fluorescence émise à 450 nm permet leur visualisation et comptage (Ostle et Holt, 1982; Page et Tenove, 1996).

La méthode proposée par Karr et *al.* (1983) a été couplée avec un détecteur conductimétrique pour l'analyse des copolymères (Hesselmann et *al.*, 1999). Cette méthode était basée sur la dépolymérisation de PHB/PHV en 3-hydroxybutyrate (3HB) et 3-hydroxyvalérate (3HV). La dépolymérisation a été réalisée par digestion hydrolytique ou par propanolyse (propanol/acide sulfurique). L'hydrolyse a servi pour l'analyse du 3HB tandis que l'estérification avec le propanol a permis l'analyse du 3HB et du 3HV.

La spectrométrie de masse de MALDI-TOF-MS est l'une des dernières et des plus puissantes techniques pour la caractérisation des polymères. Celle-ci a été récemment utilisée pour l'étude des polyesters hyperbranchés (Chikh et *al.*, 2007).

Le tableau A.1 (appendice 1) récapitule l'évolution des principales techniques d'analyse des PHA, revues par De Rijk et *al.* (2002).

2.2 Analyse des PHA par chromatographie gazeuse

2.2.1 Techniques de dérivation

Des techniques de dérivation sont employées avant l'analyse par GC, afin de modifier les propriétés des composés possédant des groupes fonctionnels polaires (des groupes hydroxyles, cétones, carboxyliques, amines). Différentes méthodes de dérivation ont été développées : l'estérification, la silylation et l'alkylation, la méthylation, la transestérification et l'acétylation (Bertrand *et al.*, 1987; Kolb et Ettre, 2006).

La silylation est l'une des méthodes de dérivation la plus couramment utilisée. Il est très facile d'obtenir des sous-produits stables via cette technique. Ceci consiste à substituer les hydrogènes actifs de groupes hydroxyles, thiols, amines par des groupes alkylsilyl donnant naissance à des silyl ethers et silyl esters. Cette technique de dérivation a été utilisée pour l'analyse de l'acrylamide et de l'acide γ -hydroxybutyrique (GHB) par SPME/GC/MS (Lagalante et Felter, 2004; Meyers et Almirall, 2005).

La dérivation par estérification peut avoir lieu lorsqu'un acide carboxylique et un alcool sont présents dans un milieu acide (l'acide sulfurique sert de catalyseur). Le fait d'augmenter la température accélère la réaction d'estérification. L'estérification est une réaction équilibrée (non-totale) et réversible. L'équilibre peut être déplacé afin d'accroître son rendement, soit en ajoutant l'un des réactifs en excès (généralement l'alcool) pour ainsi déplacer l'équilibre vers la formation de l'ester, soit en extrayant l'ester du milieu réactionnel pour empêcher la réaction inverse d'hydrolyse.

2.2.1.1 Méthanolyse des PHA

La dépolymérisation et l'estérification des PHA, avec du méthanol acidifié (méthanolyse acide), a été utilisée comme méthode de dérivation précédant l'analyse par chromatographie gazeuse (Braunegg *et al.*, 1978; Comeau *et al.*, 1988). Cette approche consiste à convertir quantitativement le polyester en ester méthylique, sous l'action du méthanol chaud, et en présence d'acide sulfurique (figure 2.1).

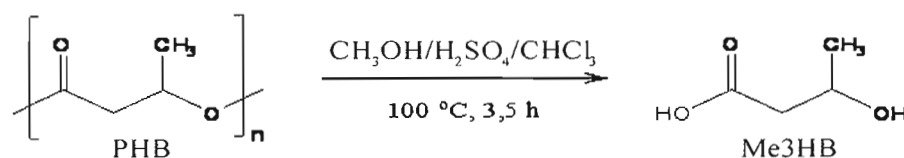


Figure 2.1 Méthanolise acide du PHB, en présence du chloroforme.

Les sous-produits dérivés, des esters méthyliques, sont volatils et facilement analysables par chromatographie gazeuse (GC). Ainsi, les deux homopolymères, le PHB et le PHV sont respectivement convertis en ester méthylique de l'acide butyrique (Me3HB) et en ester méthylique de l'acide 3-hydroxypentanoïque ou valérique (Me3HV).

La méthanolise suivie de l'analyse par GC a été l'une, sinon la plus utilisée, des méthodes analytiques pour l'analyse des PHA dans la biomasse. Toutefois, comme déjà vu plus haut, la solution issue de cette réaction et renfermant le Me3HB, ne peut pas être directement injectée dans la colonne chromatographique puisqu'elle contient aussi du méthanol, de l'acide sulfurique et de l'eau. Après la dérivation il est nécessaire une étape de préparation de l'échantillon avant d'être analysé par GC.

2.2.2 Méthodes de préparation de l'échantillon

Une variété de méthodes de préparation de l'échantillon sont utilisées dépendant de la matrice : l'extraction liquide - liquide, la distillation - condensation, l'extraction sur phase solide (SPE) ou encore l'extraction par fluide supercritique (SFE). Ces méthodes présentent divers inconvénients comme des coûts élevés et des durées de préparation excessives.

L'extraction liquide-liquide : le principe est fondé sur la distribution du soluté entre les deux phases, en fonction de son affinité pour chacune d'elles. Après leur contact, une séparation ultérieure des deux liquides (extrait et raffinat) permet la récupération des composés de l'extrait (solvant et soluté purs).

Dans le cas de l'analyse des PHA par GC, une fois complétée la réaction et refroidies les solutions, il est nécessaire d'ajouter de l'eau pour séparer le méthanol acidifié du chloroforme. La phase organique, renfermant environ 60 % du Me3HB dérivé du PHB (Jan *et al.*, 1995), est récupérée et séchée sur Na_2SO_4 avant d'être analysée GC.

Micro-extraction en phase solide (SPME): la micro-extraction en phase solide (SPME), introduite au début des années 1990 par le Professeur Janusz Pawliszyn, permet le traitement d'échantillons de toutes natures (solide, liquide, gazeux). Par ses nombreux avantages dont quantité d'échantillon minimale, simplicité de mise en œuvre, pas d'utilisation de solvants, gain de temps, automatisation possible, etc., elle s'est rapidement imposée comme alternative à l'extraction liquide-liquide et à l'extraction en phase solide conventionnelle pour la préparation d'échantillon avant l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC), en phase liquide (HPLC) et l'électrophorèse capillaire. Contrairement aux techniques classiques, la SPME n'extrait pas la totalité des analytes étudiés mais la quantité extraite est proportionnelle à la quantité présente dans l'échantillon (Pawliszyn, 1997).

Le principe repose sur la distribution de l'analyte entre la phase « solide » de la fibre et la phase de la matrice. La fibre revêtue d'une phase stationnaire extrait les composés selon le processus d'adsorption. L'extraction peut être effectuée selon différents modes (figure 2.2) : 1) par immersion directe, 2) dans l'espace de tête (*headspace*) et 3) protégée par une membrane.

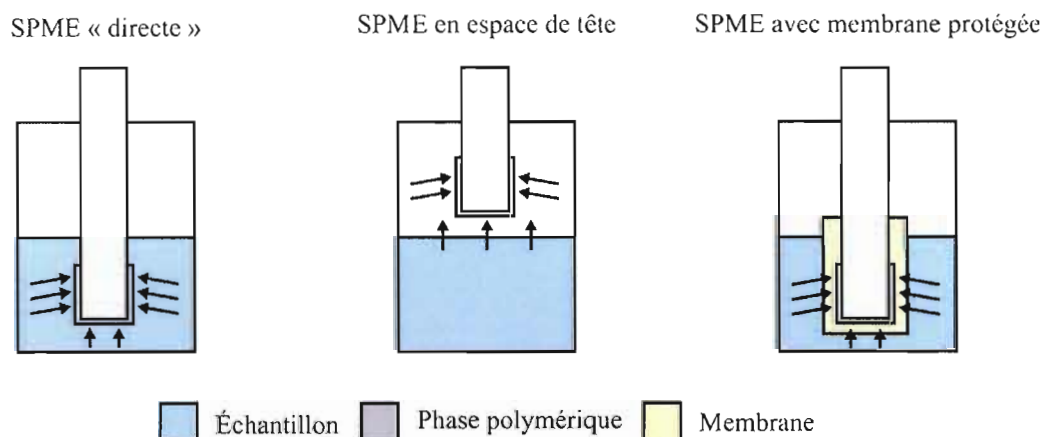


Figure 2.2 Différents modes d'extraction en SPME. Tirée et adaptée de : www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2004/westengland_smith/ExempWeb/spmem.htm

En mode *headspace*, la fibre adsorbe les analytes d'intérêts dans la phase gazeuse située au dessus de la matrice liquide ou solide. Tandis qu'en mode immersion directe, la fibre est immergée dans la matrice liquide à analyser. Le tableau 2.1 résume quelques unes des applications de la SPME selon les caractéristiques des solutés et de la matrice.

L'adsorption des composés volatils sur la fibre SPME, en mode espace de tête (HS/SPME) est gouvernée par l'équilibre qui se produit entre la phase gazeuse de l'espace de tête de l'échantillon et la phase solide de la fibre adsorbante. Cet équilibre nécessite un temps suffisant qui dépend principalement de la température d'adsorption. Dans ce contexte, l'efficacité du transfert de masse entre la phase liquide (ou une phase solide) et la phase gazeuse constitue un enjeu de première importance. Deux méthodes d'espace de tête sont possibles :

- la méthode statique (*headspace statique*). Cette technique n'est pas adaptée pour l'extraction des composés peu volatils comme les hydrocarbures non fonctionnalisés ou pour ceux qui présentent une trop grande affinité pour l'eau comme les diols.
- la méthode dynamique. Les méthodes d'agitation plus utilisées sont : l'agitation avec barre magnétique, l'agitation au Vortex, la sonication ou l'agitation par bullage d'un gaz vecteur à travers l'échantillon (*purge and trap*).

Tableau 2.1 Sélection du mode d'extraction en fonction de l'élément analysé, de la matrice dans laquelle il se trouve et des conditions d'analyse.

Approche		Type de composé	Type de matrice
Extraction directe	routine dérivatisation <i>in situ</i> redox <i>in situ</i>	plupart des composés composés polaires ions inorganiques	gazeuse et liquide
Extraction par espace de tête	routine <i>heating/cooling</i> dérivatisation <i>in situ</i>	volatiles et semi-volatiles composés non polaires volatiles et semi-volatiles avec un coefficient de partage faible composés polaires	toute sorte de matrices
Avec membrane de protégée		faible volatilité	matrices complexes

L'analyse des composés volatils ou semi volatils par espace de tête statique ou dynamique comporte trois étapes (figure 2.3) :

1) Pré-incubation : chauffage modéré de l'échantillon placé dans un récipient scellé jusqu'à ce que les composés volatils diffusent dans la phase gazeuse et qu'un état d'équilibre entre les deux phases (équilibre liquide-vapeur) soit atteint.

2) Extraction : exposition de la fibre dans l'espace de tête de l'échantillon afin de fixer sur la fibre les différents composés volatils libérés au cours du chauffage. Une fois les composés en équilibre répartis entre le milieu à extraire et la phase stationnaire, le piston est rétracté et l'aiguille de la seringue est introduite dans l'injecteur du chromatographe.

3) Désorption : les composés fixés sur la fibre sont ensuite désorbés à haute température dans l'injecteur et séparés par chromatographie en phase gazeuse ou par rinçage par un solvant spécifique dans le cas d'un couplage avec un chromatographe en phase liquide.

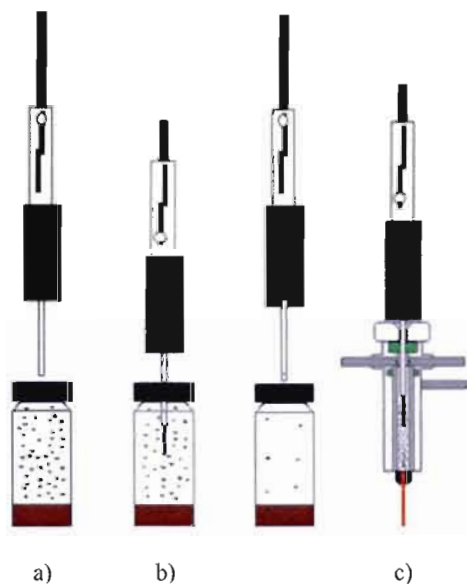


Figure 2.3 Les différentes étapes de la SPME : a) pré-incubation, b) adsorption ou extraction, c) repliement de la fibre et désorption dans l'injecteur du chromatographe.

L'efficacité de la technique SPME dépend principalement de la quantité de solutés qu'il est possible de concentrer sur la fibre. La répartition des composés à analyser, entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre, est fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques, dont les plus importants sont le type de fibre, le temps d'équilibre, le temps d'extraction, la température d'équilibre, le volume d'espace libre et le temps de désorption, l'agitation, la force ionique et le pH sont aussi des facteurs influençant l'extraction.

- Sélection de la fibre : la fibre (la phase stationnaire) est choisie en fonction du poids moléculaire et de la polarité des composés. Différentes fibres sont proposées par la société SUPELCO. Le tableau 2.2 en montre quelques unes, ainsi que le champ d'application.
- Temps de contact : le temps de contact entre la fibre et l'échantillon peut varier de quelques minutes à plusieurs heures selon la nature et la quantité des composés ainsi que de la sensibilité souhaitée. Le temps d'équilibre est limité par la vitesse de transfert de l'analyte à travers la couche statique à l'interface entre la solution et la fibre (Lord et Pawliszyn, 2000).
- La température d'extraction : la température a une influence sur la pression de vapeur des composés donc sur la distribution entre la phase liquide et la phase gazeuse et la phase gazeuse et la phase solide (fibre). Le fait de chauffer l'échantillon au cours de l'extraction permet d'atteindre l'équilibre plus rapidement grâce à la mobilité accrue des composés par agitation thermique, mais dans une certaine limite de température. Si la température est trop élevée, l'extraction est défavorisée. Il se peut alors qu'une fraction de produits se volatilise et occupe alors l'espace de tête (phénomène de désorption) mais il se peut aussi qu'ils s'hydrolysent à des températures élevées.
- La concentration en sels : la présence de sels dissous dans l'échantillon augmente la force ionique et diminue la solubilité des composés organiques, ils migrent plus facilement vers la fibre. Ce phénomène est connu sous le nom de « relargage », en anglais « *salting-out* ». L'addition de NaCl ou Na₂SO₄ entre 25 et 30 % (poids de sels/vol. de solution) est une technique très répandue pour diminuer la solubilité des analytes dans la phase aqueuse en augmentant ainsi leur concentration dans la phase gazeuse. L'addition du sel est particulièrement utile lors de l'analyse des composés polaires dans l'eau. Ceci augmente les rendements d'extraction, notamment pour les composés les plus polaires (SUPELCO, 2001).

- Le pH de l'échantillon : en présence d'eau dans différentes conditions de pH et de force ionique, les composés peuvent varier leur solubilité et diminuer ou augmenter le pouvoir de confinement. Pour des solutés acides et basiques, le pH doit être ajusté et contrôlé, les composés doivent rester sous une forme non-dissociée pour être extraits facilement. Il est donc parfois nécessaire de modifier le pH pour obtenir la forme non-dissociée du composé. Pour des composés organiques hydrosolubles, l'augmentation de pH induit une augmentation de relâchement.
- Le volume d'espace libre : en général la sensibilité de prélèvement d'espace libre est la meilleure quand le volume d'espace libre est petit. Il est recommandé de garder le volume d'espace libre dans le flacon entre 30 % et 50 %, notamment pour les faibles concentrations. Quand le volume d'espace libre est petit la fibre extrait plus d'échantillon, plus rapidement, et avec une plus grande efficacité. Pour des échantillons dont la concentration est plus élevée, il est possible d'employer un plus grand volume d'espace libre (*headspace*). Pour garantir la reproductibilité des analyses, il est extrêmement important de garder le volume d'espace libre et les dimensions des flacons employées constants, ainsi que de placer la fibre à la même profondeur dans l'espace libre chaque fois (SUPELCO, 2001).
- La température et le temps de désorption des composés : en chromatographie gazeuse, la température de désorption d'un analyte de la fibre dépend de son point d'ébullition. Si la température est trop élevée, une baisse de la réponse peut se produire pour certains composés (Aguilar et *al.*, 1998). Il a également été remarqué que les effets de la température de désorption varient selon les fibres (Su et Huang, 1999). Enfin, la température fixée pour la désorption (entre 220 et 290 °C), doit aussi tenir compte de la température d'opération recommandée par le fabricant en fonction de la phase polymérique qui constitue la fibre. Le temps nécessaire pour la désorption complète, soit la désorption thermique en GC, soit la désorption par dilution dans une phase mobile à la température de la pièce en chromatographie liquide, est de l'ordre de quelques minutes.

L'extraction par SPME peut être sélective, en fonction de la nature de la fibre (nature de la phase polymérique) et de son diamètre. Chaque phase présente une spécificité pour une classe de composés donnés (tableau 2.2). D'une façon générale, la nature de la fibre va sélectionner la nature des analytes et son diamètre va sélectionner sa masse molaire (plus le

Tableau 2.2 Spécificité des fibres SPME.

Type de fibre	Acronyme	Classe de composé
Polydimethylsiloxane (100 μm)	PDMS	Composés non polaires volatils et semi volatils
Carbowax/divinylbenzene (65 μm)	CW/DVB	Composés polaires, acides volatils
Polydimethylsiloxane/divinylbenzene (65 μm)	PDMS/DVB	Volatils et semi volatils
Polydimethylsiloxane/carboxen (75 μm)	PDMS/CAR	Composés volatils
Polydimethylsiloxane/divinylbenzene/carboxen (50-30 μm)	PDMS/DVB/CAR	Composés volatils et semi volatils

diamètre est faible, plus les composés extraits auront majoritairement une grande masse molaire). Une fibre polaire peut extraire des produits polaires tels que les phénols et les acides carboxyliques.

Les fibres mixtes (PDMS-DVB, PDMS-Carboxen-DVB) s'avèrent souvent plus adaptées que les fibres simples (PDMS, polyacrylate). Le tableau 2.2 regroupe les fibres SPME les plus utilisées. La valeur entre parenthèses représente l'épaisseur du film polymère entourant la fibre de silice. L'épaisseur de la fibre influence l'adsorption par des effets cinétiques. Ainsi, l'équilibre est plus rapidement attendu avec une fibre plus fine mais la quantité d'analyte adsorbée sera moindre.

Différents méthodes de dérivation appliquées à la SPME ont été étudiées par Lord et Pawliszyn (2000). La dérivation des analytes, en plus de faciliter la séparation chromatographique, permet de réduire la polarité des analytes et d'augmenter le coefficient de partage entre l'échantillon et la fibre. Ainsi les solutés deviennent plus facilement extractibles, plus volatiles ou plus stables thermiquement (Pan et Pawliszyn, 1997).

La dérivation peut se faire dans l'échantillon (dérivation *in situ*) ou au niveau de la fibre, dopée avec l'agent dérivatisant ou encore dans le port d'injection du chromatographe après désorption des analytes de la fibre (Pan et Pawliszyn, 1997; Stashenko et Martínez, 2004).

- La technique « directe » ou dérivation *in situ* : l'agent de dérivation est ajouté dans l'échantillon. Les produits dérivés sont ensuite extraits par SPME, puis analysés. En opérant de cette façon, avec des solutions aqueuses, la dérivation peut être lente. D'autres

expériences (Buchholz and Pawliszyn, 1994) ont montré que les acides ne peuvent pas être dérivatisés dans l'eau. La majorité des agents dérivatisants qui remplacent l'hydrogène actif du composé sont dégradés par réaction avec l'eau (Henriksen et *al.*, 2001).

- Dérivatisation sur la fibre : l'extraction a lieu en même temps que la dérivatisation. Au préalable, la fibre est dopée avec l'agent dérivatisant, puis, dans un second temps, la fibre «greffée» est plongée dans l'échantillon. Les analytes sont alors extraits et simultanément convertis en analogues ayant plus d'affinité avec la fibre et stabilisés thermiquement. Le greffage se fait en espace de tête, la fibre est placée quelques minutes au dessus de l'agent de dérivatisation, par l'action de la chaleur, l'analyte se vaporise et se greffe sur la fibre (Lord et Pawliszyn, 2000).
- Dérivatisation après l'extraction : il est également possible d'extraire les composés dans un premier temps, puis d'effectuer la dérivatisation (Lee et *al.*, 1998). Un exemple de cette approche est décrit par Meyers et Almirall (2005) lors de l'analyse du γ -hydroxybutyrate (GHB). Dans un premier temps, la fibre est plongée dans la solution pendant 15 minutes, puis elle est placée en *headspace* dans un vial contenant un agent de silylation.

2.3 Analyse des PHA par HPLC

L'analyse des PHA par HPLC après hydrolyse du polyester a été utilisée comme technique de dosage du PHB ou du PHV en milieu aqueux (Slepecky et Law, 1960; Karr et *al.* 1983; Sulo et *al.*, 1996; Yu et *al.*, 2005).

La cinétique et les mécanismes de formation de ces composés ont été discutés récemment (Yu et *al.*, 2005). Les unités monomériques constitutives des PHA sont obtenues par exposition à l'acide sulfurique concentré ou à une solution alcaline concentrée. Les paramètres optimisés pour les deux réactions sont résumés dans la figure 2.4.

Les réactions illustrées dans la figure 2.4, sont accélérées par la chaleur. Dans le premier cas (hydrolyse acide), le polymère est en même temps hydrolysé et déshydraté donnant de l'acide crotonique (AC) comme produit de réaction.

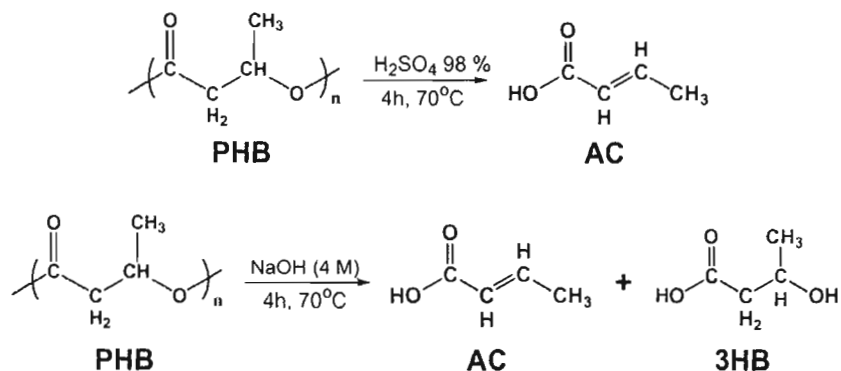


Figure 2.4 Réactions d'hydrolyse du PHB, hydrolyse acide avec de l'acide sulfurique concentré et hydrolyse alcaline dans une solution d'hydroxyde de sodium 4 M. (Selon : Yu *et al.*, 2005.)

L'hydrolyse alcaline conduit majoritairement à la formation de l'acide butyrique substitué en position 3 ou beta, aussi appelé acide 3-hydroxybutyrique (3HB) et minoritairement à de l'acide crotonique.

2.4 Analyse des PHA par RMN et par FTIR

La résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sont des techniques plus utilisées pour l'analyse structurale et sont particulièrement utiles pour l'identification et la caractérisation de nouveaux PHA. Des applications de la RMN, pour l'analyse des PHA, ont été publiées par Wallen et Rohwedder (1974); Doi (1990) et Gracida *et al.* (2002). La spectrométrie FTIR a été utilisée par Doi (1990), par Yu *et al.* (2001) et par Gracida *et al.* (2002) comme méthode d'analyse de PHA. La quantification du PHB a aussi été faite par RMN, en utilisant le benzène comme standard interne (Jan *et al.* 1995). Ces techniques requièrent une étape d'extraction du PHB intracellulaire pour récupérer le polymère pur dans une phase organique compatible avec ces techniques, ce qui peut nuire à l'analyse quantitative.

2.5 Analyse des PHA par spectrométrie de masse (MALDI/MS)

En spectrométrie de masse, les deux nouvelles techniques d'ionisation, la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation par électronébulisation ou électrospray (ESI) sont rapidement devenues des outils incontournables pour la chimie des biopolymères comme les protéines. La technique MALDI, généralement couplée à un analyseur à temps de vol (TOF pour *Time Of Flight*), est l'un des derniers et des plus intéressants nouveaux développements dans l'analyse des polymères. L'étude par ESI/MS et/ou MALDI/MS, à l'origine développée pour l'analyse des protéines, s'est avérée très puissante pour la caractérisation des polymères, en termes de propriétés chimiques et physiques, dont la masse moléculaire moyenne en nombre (M_n), la masse moléculaire moyenne en poids (M_w), en remplaçant ainsi les techniques analytiques classiques (RMN, FTIR), la chromatographie d'exclusion (SEC) et la MS et la pyrolyses-GC (Pasch et Schrepp, 2003).

2.6 Dérivatisation assistée par micro-ondes

En chimie, la technologie des micro-ondes retrouve quatre catégories de produits et applications : en chimie analytique pour la préparation d'échantillons; en synthèse organique, soit pour la recherche pharmaceutique ou la chimie fine, en biosynthèse et en extraction par solvant, notamment pour extraire ou purifier des produits naturels.

L'irradiation des milieux réactionnels par les micro-ondes est une technique de plus en plus utilisée en chimie organique. Les premières synthèses organiques réalisées dans un four domestique furent décrites en 1986 par Gedye et *al.* (1986) et Giguere et *al.* (1986). Le caractère instantané du chauffage conduit à des réactions plus rapides et à une faible dégradation des produits dont de nombreux exemples sont rapportés dans la littérature (Joly, 2003; Kappe, 2004) dont l'acétylation de l'ester méthylique de l'acide cholanique, les réactions d'acylation d'alcools primaires, secondaires et tertiaires, la réactions de glycosylation en absence de solvant, la synthèse stéréosélective de C-glycosides à partir de lactones par réaction de Wittig, la réaction de métathèse des alcènes, l'acylation de cellulose, etc.

Des réactions d'estérification activées par micro-ondes ont aussi été étudiées. L'estérification de l'acide benzoïque avec du méthanol, du propanol et du butanol, effectuée pour la première fois en 1986 (Gedye et *al.*, 1986) a permis de diminuer à quelques minutes les temps réactionnels de plusieurs heures sous le chauffage conventionnel. Des réactions enzymatiques d'estérification ont aussi été réalisées dans des réacteurs aux micro-ondes dont l'estérification sélective du glucose (Gelo-Pujic et *al.*, 1996).

Plus récente, une nouvelle méthode d'estérification en utilisant l'activation micro-ondes a été mise au point pour la synthèse des esters de cellulose microcristalline, réduisant ainsi le temps de réaction de plusieurs heures à une minute (Satge, 2002). D'autres procédés d'estérification, trans-estérification et inter-estérification assistées par micro-ondes ont été brevetés récemment (Charlier de Chily et Raynard, 2003).

Des réactions d'hydrolyse en milieu acide ou alcalin par irradiation aux micro-ondes sont citées dans la littérature (Gedye et *al.*, 1986; Kappe, 2004). Citons par exemple l'hydrolyse alcaline de la benzamide, donnant de l'acide benzoïque (Gedye et *al.*, 1986).

2.6.1 Principe du chauffage par rayonnement micro-onde

Les hyperfréquences ou les micro-ondes représentent un segment de spectre électromagnétique de 1-300 GHz, mais pour éviter les interférences avec les télécommunications les réacteurs micro-onde pour la synthèse organique opèrent à 2,45 GHz. Au-dessous de la moyenne des énergies de liaisons cette fréquence n'affecte que les énergies de rotation des molécules.

Le mécanisme de chauffage par micro-ondes, aussi appelé chauffage diélectrique, se fait par interactions entre la composante électrique de l'onde électromagnétique avec les substances lors que celles-ci sont soumises à un champ électrique statique ou alternatif. Il procède donc par un mécanisme de polarisation dipolaire des molécules et les substances présentant un moment dipolaire différent de zéro (ex. eau, acides, solvants) ou par conduction ionique des ions en phase liquide ou incrustés dans les interstices solides.

Ce phénomène est lié au déplacement des charges positives et négatives à l'intérieur du champ électrique qui varie très rapidement ($2,45 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$). L'ensemble des molécules essaie de s'orienter en fonction des lignes de champ et sont de ce fait soumises à des rotations-vibrations. Le dégagement de chaleur à l'intérieur du matériau résulte de la friction produite. Ne pouvant répondre instantanément aux changements de direction du champ l'énergie de l'onde électromagnétique est transformée en énergie calorifique (Galema, 1997).

Par rapport au chauffage classique, l'échauffement des molécules se traduit par un dégagement instantané de chaleur au cœur de la masse et la répartition finale de température est plus régulière. Sous l'effet des micro-ondes, l'élévation de température pour les solvants polaires sera rapide, à *contrario*, les solvants apolaires ne s'échaufferont pas ou très peu. En ce qui concerne les solides, l'augmentation de température serait liée au système cristallin ou à l'écart de stœchiométrie leurs conférant ainsi un certain caractère polaire (Guillard, 2007).

La faculté qu'a une matière d'absorber l'énergie micro-ondes est exprimée par son facteur de perte diélectrique ($\tan \delta$). Le facteur de perte diélectrique ($\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$) est défini par la perte diélectrique (ϵ'') et la constante diélectrique (ϵ'). La perte diélectrique indique l'efficacité avec laquelle le rayonnement électromagnétique est converti en chaleur. La constante diélectrique, décrit la capacité des molécules à être polarisées par le champ électrique. Les solvants peuvent être classifiés en fonction de leur facteur de perte diélectrique ou $\tan \delta$ comme suit (Kappe, 2004):

- hautement absorbants ($\tan \delta > 0,5$): éthylène glycol 1,350; éthanol 0,941; DMSO 0,825
- modérément absorbants ($\tan \delta 0,1-0,5$): acide acétique 0,174; DMF 0,161; eau 0,123
- faiblement absorbants ($\tan \delta < 0,1$): chloroforme 0,091; acétone 0,054; toluène 0,040

Les molécules ayant un moment dipolaire, permanent ou induit sous l'action d'un champ électrique absorberont de l'énergie dans le domaine des micro-ondes. Par contre, pour une molécule ne possédant pas de moment dipolaire, le CO_2 linéaire ou de CCl_4 symétrique, il n'y aura pas d'absorption dans cette région.

Le chauffage diélectrique dépend également de la taille des tubes de réaction, de la quantité de mélange réactionnel, de la capacité de chaleur du milieu, de la température initiale, etc. (Kappe, 2004).

Les effets des micro-ondes dépendent du milieu réactionnel donc trois possibilités sont à envisager (Joly, 2003) :

- Dans le cas de réactions en solvant polaire, qu'il soit protique ou aprotique, la principale interaction micro-ondes/matière se fait avec le solvant, ce qui induit une augmentation de température. Le transfert d'énergie se fait du solvant vers les réactifs. Il s'agit alors d'effet de solvant et les rendements de réaction seront proches de ceux obtenus par chauffage classique.
- Si le solvant utilisé est apolaire, les molécules de solvant sont «transparentes» vis-à-vis du rayonnement et n'absorbent pas ou très peu les microondes. Ainsi, si les réactifs sont polaires, ce sont eux qui absorberont le rayonnement et le transfert d'énergie se fera des réactifs au solvant. Le résultat de la réaction peut alors être différent entre micro-ondes et chauffage classique. Cependant, ces effets semblent être variables et dépendent de la réaction. Ainsi, aucune règle générale ne peut être définie.
- Enfin, l'effet micro-ondes peut être observé plus facilement lors de réactions réalisées sans solvants. Outre l'intérêt économique et écologique de cette absence de solvants, le rayonnement est, dans ce cas, absorbé exclusivement par les réactifs. Les réactions interfaciales, les réactions de transfert de phase et sur supports solides couplées à l'irradiation micro-ondes ont conduit à des résultats probants.

De manière générale, plus les molécules sont polaires, plus l'effet micro-ondes sera important et donc plus grande sera la montée en température. Toutefois, au cours de la réaction, la polarité du système peut varier selon le mécanisme réactionnel et de ce fait, il peut être observé une variation des effets micro-ondes. De même, lorsque deux réactions sont en compétition, la sélectivité sera en faveur de celle dont l'état de transition sera le plus polaire (Loupy et Haudrechy, 1996).

Il est à noter que les réactions telles que l'hydrolyse, impliquant les acides sulfurique et phosphorique concentrés, peuvent être problématiques. En effet, ces acides absorbent très fortement l'énergie des micro-ondes et la température de réaction peut s'élever rapidement à plus de 300 °C (Kingston et *al.*, 1997), entraînant ainsi la fonte des récipients en polymères.

Selon Guillard (2007), deux hypothèses peuvent expliquer les effets des micro-ondes:

1^{ère} hypothèse : effet thermique. Le milieu réactionnel subit un échauffement important puisque la perte diélectrique atteint sa plus grande valeur et que la profondeur de pénétration est appréciable. « Ainsi, plus un milieu polaire captera l'énergie des micro-ondes en profondeur et plus le milieu s'échauffera. Cette énergie calorifique, dégagée par les mouvements des molécules polaires, fournira à celles qui réagissent, l'énergie d'activation nécessaire à la réaction ».

2^{ème} hypothèse : effet non thermique. Bien que moins efficace qu'à basse fréquence le mécanisme de polarisation demeure intense sous l'effet du champ électromagnétique. Il en résulte une grande aptitude des molécules polaires à s'aligner dans la direction du champ électrique entraînant une diminution de l'entropie initiale sous l'effet de l'irradiation (création d'un ordre moléculaire) provoquant une accélération de la vitesse de réaction. Ainsi, « ordonner » les réactifs comme peut le faire le champ électrique des micro-ondes favorise le déroulement de la réaction.

2.6.2 Réacteurs micro-ondes

Il existe deux types de réacteurs micro-ondes (figure 2.5): les fours micro-ondes multi-modes (ou domestiques) et les réacteurs micro-ondes monomodes (ou de laboratoire). Les réacteurs multi-modes sont composés d'un ou plusieurs magnétrons qui génèrent le rayonnement micro-ondes (a). L'onde se réfléchit sur les parois du four et forme ainsi un champ réparti de façon hétérogène dans la cavité. Dans le cas des fours à micro-ondes multi-mode, la puissance émise est constante mais le temps d'impulsion va varier selon la puissance voulue par la consigne (fonctionnement séquentiel). Ce type de réacteur a aussi son application en laboratoire, mais la puissance est dans ce cas variable selon la nécessité et délivrée de façon

continue (Joly, 2003). Le contrôle de la réaction dans ces systèmes ne se fait que par le choix d'un pourcentage de la puissance micro-onde pendant un temps. Les réacteurs monomodes sont aussi constitués d'un magnétron émetteur des micro-ondes, mais cette fois elles sont focalisées sur l'échantillon à irradier par l'intermédiaire d'un guide d'onde. Pour que le chauffage soit homogène, il est nécessaire que la hauteur de l'échantillon soit inférieure ou égale aux dimensions du guide d'onde (figure 2.5 b). De plus, ce type de réacteur permet de réguler la puissance et/ou la température selon les besoins.

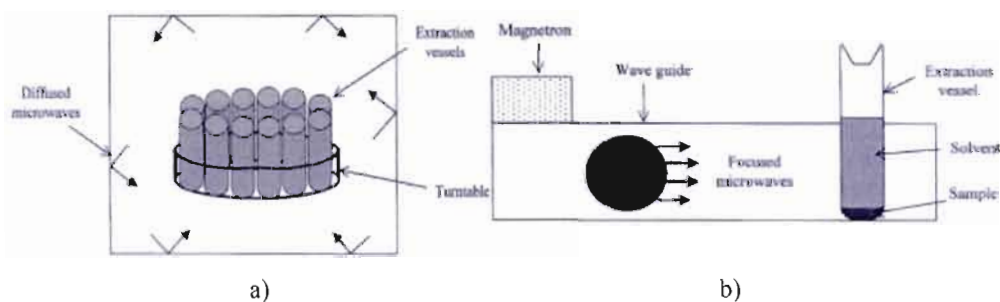


Figure 2.5 Principe d'un réacteur micro-ondes, a) multi-mode (*diffused microwaves*), b) monomode (*focused microwaves*). (Tirée et adaptée de : Camel, 2000.)

CHAPITRE III

MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE RÉCUPÉRATION DES PHA

La dernière étape de la production du PHB implique la séparation du polymère des cellules. Cette étape peut être réalisée à l'aide d'un solvant organique ou en milieu aqueux. Dans le processus aqueux, les parois des cellules sont rompues : rupture chimique, mécanique ou enzymatique (Maia et *al.*, 2004). Le polymère est alors relâché, extrait et purifié. Les processus par rupture sont écologiquement durables, ceux qui utilisent la digestion chimique ou les méthodes de séparation mécaniques sont moins chers, mais produisent des dommages aux polymères suite à une réduction de leur poids moléculaire. Par exemple, l'extraction par solvants peut produire des poids de 1 000 000 daltons, tandis que les poids moléculaires typiques des PHA extraits par digestion chimique sont dans la gamme 600 000 daltons (Luzier, 1992).

Les PHA ne sont solubles que dans peu de solvants, notamment dans les solvants halogénés. De plus, ils nécessitent de grandes quantités de solvant en raison de la forte viscosité des solutions résultantes. L'extraction par solvants s'avère donc être une technique consommatrice de grandes quantités de solvants toxiques et polluants (Ramsay et *al.*, 1994; Lee, 1996).

Afin de récupérer les PHA, avec des taux de rendement très élevés, un haut degré de pureté, et à des prix concurrents et en équilibre avec l'environnement, plusieurs techniques de purification ont été développées durant ces dernières années. Les plus importantes sont résumées ci-après.

3.1 Extraction par solvants

Différentes techniques d'extraction par solvants ont été proposées dans la littérature : les ultrasons, l'agitation, l'extraction au Soxhlet, l'extraction par micro-ondes, le système ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) et l'extraction par fluide supercritique (SFE). La récupération des PHA par cette technique nécessite l'usage de solvants organiques dont le chloroforme, le chlorure de méthylène, le carbonate de propylène (PC), le dichloro-1,2-éthane sont comptés parmi eux (Doi, 1990; Ramsay et al., 1994).

3.1.1 Extraction par solvant sans chauffage

L'extraction par solvant à basses températures ou extraction par solvant à froid est une technique qui permet la récupération des PHA pratiquement intacts (Hahn et al., 1995) avec une pureté aussi élevée que 99 % (Ghatnekar et al., 2001 et Ramsay et al., 1994). Pourtant, opérant à la température ambiante, il est nécessaire d'utiliser des quantités très grandes de solvants, souvent de chloroforme, ce qui n'est ni économique ni écologique (Anderson et Dawes, 1990).

Par exemple, l'extraction du PHB stocké dans *Escherichia coli* recombinant (*E.c*) et dans *Alcaligenes eutrophus* (*A.e*) a été menée à 30 °C avec 50 volumes de CHCl_3 et ceci a nécessité 48 h pour extraire 98% du PHB (Hahn et al., 1995). En utilisant l'extraction continue dans un Soxhlet à 30 °C, 78 % du PHB dans *Methylobacterium sp* ont été récupérés après 15 heures et en utilisant 30 volumes de CHCl_3 (Ghatnekar et al., 2001).

Dans une autre application, le PHB a été extrait d'une biomasse lyophilisée d'*Alcaligenes eutrophus* contenant 50 % w/w. L'extraction était menée durant 12 heures à conditions ambiantes ($T = 25$ °C), avec agitation continue et 10 volumes de solvant. Ils ont été utilisés trois solvants différents, le chloroforme (CHCl_3), le chlorure de méthylène (CH_2Cl_2) et le dichloro-1,2-éthane ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}_2$). Dans ces conditions, le rendement de l'extraction a été 27 % dans CHCl_3 et 26 % dans CH_2Cl_2 , et 0 % dans $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Le PHB récupéré avait une pureté d'au moins 95 % et un poids moléculaire de $1,2 \times 10^6$ g/mol (Ramsay et al., 1994).

Afin d'accroître l'efficacité de l'extraction, différentes techniques ont été explorées dont le prétraitement à l'acétone pour dissoudre les résidus d'eau et de bactéries et favoriser l'extraction ultérieure (Berger, 1989; Hahn *et al.*, 1995; Ramsay *et al.*, 1994).

Il y a aussi d'autres techniques conçues pour maximiser ce taux de diffusion dont le broyage, l'agitation, la sonication et la centrifugation. Les flux de liquides à contre-courant contribuant à maximiser la concentration des composés, les températures élevées servant à maximiser les coefficients de diffusion et parfois des pressions très élevées sont aussi utilisés, pour rendre les liquides supercritiques afin de surmonter les limitations des coefficients de diffusion.

3.1.2 Extraction par solvant avec chauffage

L'extraction liquide-solide avec du chloroforme chaud a été largement utilisée pour l'isolation des PHA de la biomasse (Doi, 1990; Ramsay *et al.*, 1994; ...). Les températures élevées servent à maximiser les coefficients de diffusion et donc la vitesse et le rendement d'extraction. Bien que le chauffage facilite l'extraction des PHA, il peut aussi affaiblir le poids moléculaire du biopolymère, à des températures aussi basses que 40 °C (Ramsay *et al.*, 1994).

En utilisant un extracteur Soxhlet, l'extraction est réalisée en continu, et de manière optimale, en recourant à des quantités nettement moindres de solvants (Omar *et al.*, 2001; Ghatnekar *et al.*, 2001), et/ou plus rapide (Doi, 1990; Ramsay *et al.*, 1994). Ceci s'explique par le fait que le solvant qui arrive au contact du solide est toujours frais, ce qui joue sur le gradient de concentration à l'interface solide-liquide et permet de diminuer la résistance au transfert de masse.

3.1.3 Extraction par solvant à hautes pressions

Ces techniques permettent d'accroître l'efficacité de l'extraction. L'extraction au fluide supercritique (SFE), l'extraction accélérée aux solvants (ASE) ou l'extraction renforcée aux solvants (ESE) sont des méthodes relativement nouvelles.

Extraction par fluide supercritique (SFE) : L'extraction de solutés présents dans des matrices solides peut être réalisée par utilisation d'un fluide à l'état supercritique, principalement le dioxyde de carbone sous pression ($100 - 4 \times 10^4$ kPa) et à température voisine de l'ambiante (30 - 60 °C). Lorsque la matière organique est exposée à un fluide supercritique, l'état gazeux pénétrera dans les cellules et s'y trouvera en équilibre avec son état liquide dans lequel les molécules vont se dissoudre. Le liquide étant également en équilibre avec l'état gazeux, la vapeur va entraîner hors de la cellule les molécules que l'on cherche à extraire. Ceci permet de contourner le problème de la barrière cellulaire que certains solvants ne peuvent franchir. Pour récupérer les composés organiques que l'on a cherché à extraire, il suffit de laisser le CO₂ s'échapper sous forme de gaz en le ramenant dans des conditions de pression et de température plus classiques.

L'extraction accélérée par solvant (ASE) ou l'extraction renforcée par solvant (ESE) utilisent des solvants conventionnels à des températures et des pressions élevées. La cinétique d'extraction augmente avec la température, le rôle de la pression est de maintenir le solvant à l'état liquide. Le principal avantage de l'ASE, outre sa rapidité et son automatisation, est sa faible consommation de solvant (Becue et Nguyen, 2005).

3.1.4 Extraction assistée par micro-ondes

Le survol des méthodes d'extraction, fait jusqu'ici, montre que, même s'il est possible d'obtenir des rendements raisonnables du produit, par les méthodes classiques d'extraction, celles-ci sont limitées par le choix du solvant et comporte des durées d'extraction parfois très longues et des pressions et/ou des températures élevées qui risquent de dégrader la structure des biopolymères.

La technologie d'extraction assistée par micro-ondes (EAM), appelée MAE (*microwave-assisted extraction*) ou MAP, s'applique dans les mêmes secteurs que les méthodes classiques. Appliquée à l'extraction de produits naturels, cette technologie innovatrice et écologiquement rationnelle favorise le développement durable dans la bio-économie.

Le gradient thermique inversé « chauffage à cœur », caractéristique du chauffage par micro-ondes, est l'élément déterminant du succès de cette technologie. Le fait que la force motrice de l'extraction n'est pas contrôlée par la diffusion présente un intérêt particulier pour l'extraction en accélérant la diffusion du soluté puisque les composés peuvent être expulsés directement de la matrice, ce qui permet aussi une plus grande flexibilité au niveau du solvant.

Contrairement à l'extraction par solvant conventionnelle, le chauffage très rapide de l'eau résiduelle qui est présente dans la biomasse entraîne une augmentation aussi rapide de la pression à l'intérieur des cellules de la matière et provoque l'éclatement des structures cellulaires par surpression interne. Cela mène à une inversion du gradient de température (figure 3.1) et à une amélioration du transfert de la masse sous l'effet de la pression des matières solubles à l'extérieur de la biomasse (Foragen, 2001).

Lors de l'extraction assistée par micro-ondes, comme pour toute autre technique d'extraction, les taux de rendement reposent en la connaissance des paramètres influant sur la nature et la cinétique du transfert de masse du solide vers le solvant. Les paramètres les plus étudiés sont : le temps d'extraction, la température (ou la pression pour les systèmes à récipient fermé), la puissance de micro-onde (P_{MO}), la nature du solvant et le volume (Camel, 2000).

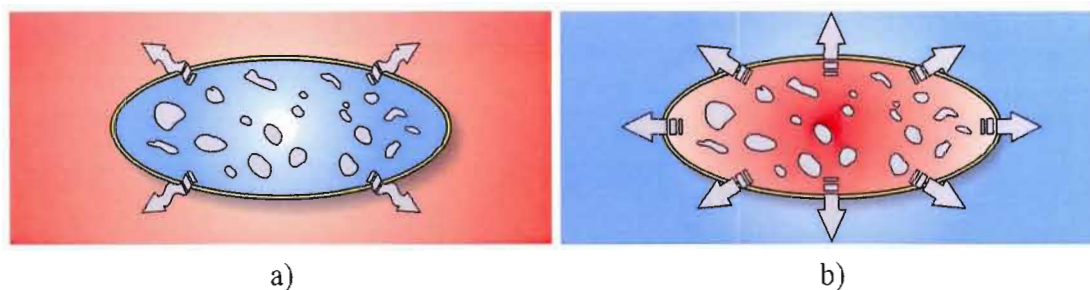


Figure 3.1 L'extraction par solvant. a) Extraction par solvant selon la méthode classique, ce procédé est contrôlé par la diffusion donc la force motrice de la séparation est la différence de concentrations (réelle et à l'équilibre), b) Extraction par solvant assistée par MO où l'inversion du gradient de température mène au « transfert de la masse sous l'effet de la pression ».

Le temps d'extraction : la durée de l'extraction est fonction de la puissance de micro-onde et doit toujours être optimisée. Le temps d'extraction optimum varie avec la nature du solvant. Des temps de séjour prolongés, cherchant à maximiser le taux de rendement, peuvent occasionner la dégradation des produits (Camel, 2000). Dans un système scellé, des longs temps d'irradiation entraînent l'incrément progressif de la pression ayant pour résultat une explosion (Gedye, 1991).

La puissance de micro-onde et la température : les micro-ondes focalisées ou monomode (illustré à la figure 2.5 b), offrent la possibilité de contrôler la réaction en fonction de la température. Avec les micro-ondes multi-mode (figure 2.5 a), la puissance est variable selon la nécessité et délivrée de façon continue, donc en absence d'un système de réfrigération interne, la température évolue tout au long du processus. La température dépend principalement du solvant, de la matrice et de P_{MO} . Sous les micro-ondes, la température du solvant n'est pas régie par le point d'ébullition (comme dans un chauffage conventionnel) mais plutôt par les propriétés diélectriques du milieu. Un solvant fortement absorbant de l'énergie des microondes tel que le méthanol ($\tan\delta = 0,659$) peut être facilement surchauffé quand il est irradié dans un réservoir scellé.

Sous ces conditions, sa température peut dépasser 100 °C au-dessus de sa température d'ébullition. Pour les liquides ioniques, des sauts de température de l'ordre de 200 °C en quelques secondes, peuvent être observés (Kappe, 2004).

La température affecte directement la cinétique du transfert de masse du solide vers le solvant donc l'efficacité de l'extraction. Cependant, l'utilisation de composés organiques inflammables peut poser des risques d'incendie. La température doit aussi tenir compte de la nature des solutés pour éviter leur dégradation lors de l'irradiation.

La pression : la pression dépendra des propriétés physico-chimiques des produits, ainsi que du volume qu'ils occupent. À des pressions élevées, le solvant peut être chauffé au-dessus de son point d'ébullition normal, et éventuellement incrémenter la vitesse et l'efficacité d'extraction (Camel, 2000). En absence d'un système de contrôle, les risques associés doivent être jugés.

Nature du solvant : la plupart du temps, l'absorption et donc le réchauffement sont proportionnels à la polarité du solvant (Camel, 2000). Les solvants peuvent être combinés afin d'atteindre les caractéristiques de solvatation et le chauffage par micro-ondes nécessaires.

Le toluène est un solvant «transparent» aux micro-ondes ($\tan \delta = 0,040$). Cependant, suite à l'ajout d'eau (1 % v/v), il a été possible d'extraire plusieurs composés à partir de sédiments marins dont HAP, BPC et pesticides organochlorés (Camel, 2000).

Lors de l'extraction des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) à partir des sols contaminés, des rendements semblables à ceux obtenus avec du chlorure de méthylène ont été obtenus en utilisant un mélange acétone-hexane 1 : 1 (v/v) (Camel, 2000).

Le volume : pour des réactions dans des flacons sellés, l'augmentation du volume du mélange de la réaction cause une augmentation de la pression, et éventuellement une explosion. Selon (Gedye, 1991) le volume du liquide ne doit pas dépasser 10 % du volume du tube réactionnel scellé, et ceci, à des puissances inférieures à 560 W.

En général, l'EAM est effectuée avec le même solvant que celui utilisé pour l'extraction conventionnelle, mais pas toujours. Les herbicides sulfonylurées sont traditionnellement extraits à partir des sols en milieu aqueux alcalin. Pourtant, les meilleurs résultats par EAM ont été obtenus en utilisant le mélange dichlorométhane-méthanol (90 : 10 v/v) pour éviter ainsi la co-extraction des acides humiques et fulviques (Camel, 2000).

L'EAM est bien adaptée à l'extraction des composites dans des matrices complexes, biologiques et environnementales. C'est pourquoi l'une des applications principales de l'extraction assistée par micro-ondes est sans doute l'analyse des échantillons environnementaux (boues, sédiments).

Des phénols, des pesticides (organochlorés, organophosphoré, imidazolinones, sulfonylureas, triazines, hexaconazole), des polychlorobiphényles, des composés organométalliques (organotins, méthyle-mercure) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques ont tous été extraits dans les matrices environnementales (Camel, 2000).

Environnement Canada a publié en 1996 la première méthode de référence visant les BPC dans l'huile faisant expressément appel à la technologie des micro-ondes. Dans sa forme actuelle, elle réduit les volumes de solvant utilisés (et donc les déchets produits) et l'énergie consommée d'environ 90 %. Par ailleurs, le temps d'extraction est considérablement raccourci, soit à peu près 30 minutes en tout pour 14 échantillons, contre 8 à 16 heures avec la méthode Soxhlet. Elle peut servir à la détermination de plus de 100 polluants dans diverses sources dont le sol, l'eau, les tissus et les animaux (Environnement Canada, 1998).

Un exemple dans cette liste non exhaustive d'applications est le dosage des HAP, des hétéropolycycles aromatiques soufrés (HPAS) et des HAP nitrés présents dans les particules émises par la combustion du carburant Diesel. Leur analyse doit en être précédée par une extraction. Les composés recherchés sont recouverts grâce à la méthode d'extraction aux micro-ondes au moyen d'un mélange 1 : 1 d'hexane et d'acétone pendant 20 min à 100 °C sous 500 W d'énergie des micro-ondes. D'après les résultats, l'extraction par les micro-ondes se compare à l'extraction classique dans un Soxhlet, pour ce qui concerne l'efficacité et la précision du dosage des HAP, des HPAS et des HAP nitrés présents dans les particules produites par le carburant Diesel. L'avantage de remplacer le Soxhlet par les micro-ondes est le gain extraordinaire de temps (environ 20 min contre 16 h) et l'économie de solvants (20 mL par échantillon contre plus de 200 mL).

En outre, les solvants (mélange d'hexane et d'acétone) utilisés pour l'extraction aux micro-ondes sont moins dangereux que le dichlorométhane normalement exigé pour l'extraction des HAP nitrés dans le Soxhlet classique (Environnement Canada, 2002).

Cette technique est aussi très utilisée pour extraire des produits de la biomasse renouvelable. L'extraction des arômes par micro-ondes est une des innovations les plus récentes dans le domaine de l'extraction des produits naturels. L'extraction des arômes naturels, les fragrances, les colorants, les oléorésines d'épices, les extraits, botaniques et les phytochimiques et composés pharmaceutiques naturels, est tout à fait réalisable par l'EAM (Foragen, 2001).

Une approche, utilisant l'EAM appliquée à la bio-séparation, a été développée pour l'extraction de deux colorants, la purpurine et l'alizarine, à partir des racines de la *Rubiaceae*. Sous les conditions optimales, les rendements s'étendant de 84 à 94 % respectivement, avec une réduction du temps d'extraction (20 min contre 6 h) et de la consommation de solvant (20 mL contre 100 mL), par rapport aux techniques conventionnelles (sonication et l'extraction par reflux) (Dabiri et *al.*, 2005).

L'EAM n'est pas uniquement un moyen de raccourcir les temps d'opération et/ou de réduire la consommation de solvants, dans bien de cas, elle permet aussi d'augmenter les taux de rendements (Chemat et *al.*, 2005). Ces auteurs ont évalué l'effet des radiations micro ondes dans les cinétiques d'extraction de la carvone et du limonène de graines de carvi (*Carum carvi L.*). Le rendement a été de 19 g de carvone et 13,5 g de limonène par kg de graines de carvi après 60 minutes d'irradiation à 120 W. Des extractions conventionnelles, menées en parallèle, ne donnaient que 13,5 g de carvone et 12,6 g de limonène par kg de graines.

Il y a aussi l'extraction par micro-ondes sans solvant (SFME). La SFME (*Solvent-free microwave extraction*) est opérée dans des conditions atmosphériques sans ajouter de solvants organiques ou d'eau. Cette technique a servi à la récupération des huiles essentielles à partir de la matière végétale, fraîche ou sèche. Et elle consiste à extraire l'huile essentielle entraînée dans le mélange formé avec la vapeur d'eau propre au produit biologique traité (évaporation *in situ*) (Lucchesi et *al.*, 2004). La SFME a été utilisée pour l'extraction des huiles essentielles à partir de *Cuminum cyminum L.* et de *Zanthoxylum bungeanum Maxim.* La biomasse sèche, sans aucun prétraitement, a été mélangée avec la poudre de carbonyle de fer (CIP), une matière inerte à l'huile et dont le pouvoir absorbant est supérieur à celui de l'eau. Le mélange a été irradié pendant 30 min à une puissance de 85 W (Wang et *al.*, 2006).

3.2 Méthodes de rupture de la membrane plasmique

Les organismes unicellulaires (microorganismes) sont constitués d'une paroi cellulaire externe semi-perméable, solide et rigide, entourant la membrane protoplasmique (cytoplasmique) et le cytoplasme. Le cytoplasme est constitué d'acides nucléiques, protéines,

glucides, lipides, enzymes, ions inorganiques, vitamines, pigments, inclusions, et d'environ 80 % d'eau. Pour isoler et extraire les produits intracellulaires, il est nécessaire de briser la paroi cellulaire et la membrane protoplasmique.

Il existe différentes méthodes pour rompre les membranes cellulaires (lyse) : les méthodes physiques (mécaniques), chimiques ou enzymatiques, selon les types de cellules. Les méthodes mécaniques sont plutôt dévolues aux cellules et aux tissus, les méthodes enzymatiques sont réservées aux bactéries, aux levures et aux virus afin de dissoudre des structures (capsides, membranes bactériennes...) inaccessibles à la rupture mécanique (Bastard et *al.*, 2002).

3.2.1 Rupture mécanique (méthodes physiques pour la lyse de cellules)

Il existe différentes méthodes de lyse cellulaire mécaniques dont, broyage, broyage à l'azote liquide, agitation rapide, sonication, choc osmotique, congélations décongélations successives, pressage et ultracentrifugation. Les fluides supercritiques, tel que le dioxyde de carbone, sont aussi utilisés pour rompre les membranes cellulaires et « libérer » les produits intracellulaires.

Des homogénéisateurs à haute pression et des broyeurs à balles ont été utilisés pour libérer les substances intercellulaires telles que les protéines et les polyhydroxyalcanoates (Chisti et Moo-Young, 1986; Tamer et *al.*, 1998b).

La lyse mécanique, peut aussi être réalisée après une congélation-flash dans l'azote liquide, à l'aide d'un mortier-pilon (broyage à l'azote liquide) ou d'un broyeur type « Hybaid Ribolyser » ou « Mixer Mill MM300 » (Qiagen). Ce dernier fait subir à l'échantillon à la fois agitation et torsion à forte vitesse permettant la rupture des cellules, sous l'action de billes de céramique et de détergents. L'agitation rapide, avec particules de silice (pour les bactéries) et de céramique (pour les levures, champignons et algues), peut également conduire à une lyse efficace d'une grande variété de matériaux (Bastard et *al.*, 2002).

La sonication est l'utilisation d'ultra-sons pour rompre les membranes des cellules. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de permettre ou faciliter l'extraction de molécules thermosensibles.

De nombreux travaux d'extraction assistée par ultrasons sont décrits, pour des cas récents comme l'extraction des graines de carvi par Chemat et *al.*, (2004) ou de fenouil (*Foeniculum vulgare*), houblon (*Humulus lupulus*), consoude (*Calendula officinale*), menthe (*Mentha piperita*), etc. par Toma et *al.*, (2001). Dans d'autres cas, un traitement ultrasonique lysera la plupart des bactéries gram-positives et gram-négatives libérant ainsi les matériel intracellulaire (Bastard et *al.*, 2002).

L'échantillon, finement divisé, est immergé dans un « bain à ultra-son » avec du solvant et il est soumis à des radiations dans le domaine de l'ultra-son. Les ultrasons de puissance appliqués dans les liquides produisent de nombreux effets intéressants qui reposent surtout sur le phénomène de formation de bulles de cavitation et induisent des effets mécaniques et chimiques. Le domaine d'applications des effets mécaniques se trouve à des basses fréquences, entre 20 – 40 kHz. À ce niveau les cavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois cellulaires et produisent l'accélération de la diffusion au travers de membranes, la lyse des cellules et donc la libération de contenus cellulaires (Costes, 2004).

Feliu et Villaverde (1994) ont utilisé la sonication pour provoquer la rupture des membranes cellulaires de l'*E. coli* recombinant et extraire du matériel intracellulaire. La sonication a été donnée à 100 W et 20 kHz, et la réussite a consisté en la façon dont l'expérience a été réalisée. Deux traitements consécutifs de 15 min chacun, avec séparation du lysat et adjonction de solvant frais (chloroforme–SDS), ont été effectués. Chaque traitement a été réalisé par étapes successives de 3 min de sonication suivi de 3 min de repos (pour éviter le surchauffage des échantillons) jusqu'à compléter une période de 15 min. Cette approche a permis un rendement global de 90 %. L'application d'une seule étape de sonication de 15 min, n'en permettait qu'un 70 %, même si le temps d'irradiation était prolongé.

Les fluides supercritiques peuvent détruire la structure du matériel biologique pour atteindre des substances d'inclusion telles que les PHA, afin de les isoler ou de les analyser. Le CO₂ à l'état supercritique est mis en contact avec un aliquot de la suspension cellulaire. Sous les conditions d'opération le CO₂ peut traverser la barrière cellulaire et pénétrer dans la cellule. Par conséquent, la cellule gonflera et éclatera, en relâchant ainsi le biopolymère.

Les PHA peuvent être séparés des débris cellulaires *a posteriori*, par dilution dans un solvant organique approprié ou par la digestion *in situ*, chimique ou enzymatique, de ladite « matière cellulaire qui n'est pas du PHA » ou NPCM (*non-PHA cell material*).

L'avantage de la SFE est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les PHA. À ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité de CO₂. Le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars.

L'ultracentrifugation, le broyage, la sonication et la lyse par fluides supercritiques ont été appliqués à l'extraction des PHA. Ces méthodes ont été complétées par des méthodes chimiques. Des exemples en seront présentés dans la partie 3.3 « Méthodes combinées ».

3.2.2 Digestion chimique

Les principaux agents chimiques utilisés pour rompre les membranes cellulaires (lyse) sont : 1) des oxydants, l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), 2) des bases : l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de potassium (KOH), l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH), 3) les acides, chlorhydrique (HCl) et sulfurique (H₂SO₄), 4) des chélates : acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), 5) des agents tensio-actifs : le di(éthylhexyl)sulfosuccinate de sodium (AOT), le sodium dodécyl sulfate (SDS), l'éther de polyéthylèneglycol et d'octylphénol (Triton X-100) et le polyéthylène sorbitan monolaurate (Tween 20). Tous ces agents tensio-actifs ont montré leur capacité de digérer la NPCM

(Choi et Lee, 1998). Ils agissent en déstabilisant les édifices lipido-protéiques des enveloppes bactériennes et en sensibilisant les micro-organismes aux traitements lytiques.

La digestion en utilisant de l'hypochlorite de sodium a été proposée comme une alternative à l'extraction par solvant (Berger *et al.* 1989). Cette technique repose sur l'hydrophobicité des PHA et l'hydrophilicité de la NPCM.

L'hypochlorite de sodium agit comme un solvant des acides gras contenus dans les parois membranaire des micro-organismes en les transformant en sels et glycérol. Cette réaction a pour conséquence de solubiliser les parois cellulaires et le contenu de la cellule est libéré.

Le problème majeur reste la dégradation partielle du polymère, ayant jusqu'à 50 % de perte du poids moléculaire lors de la récupération du PHB contenu dans l'*Alcaligenes eutrophus*, (Harrison *et al.*, 1991a; Hahn *et al.*, 1995; Choi et Lee, 1998; Hejazi *et al.*, 2003).

Il est à noter que la dégradation produite par le traitement avec l'hypochlorite dépend l'hôte, ainsi que montré par Hahn *et al.* (1995). Dans ce travail, le PHB a été récupéré à partir de deux souches bactériennes différentes, *Escherichia coli* recombinant (*E.c*) et *Alcaligenes eutrophus* (*A.e*) avec NaClO 3 % v/v. Et il a été recouvré 93 % w/w du PHB contenu dans *E.c* et 86 % de celui accumulé dans *A.e*, avec des poids moléculaires de $1,5 \times 10^6$ et $0,6 \times 10^6$ respectivement. Pourtant des poids moléculaire de $1,2 \times 10^6$ pour l'*Alcaligenes* et de $1,5 \times 10^6$ pour l'*E. coli* étaient observés lorsque le PHB a été extrait avec du chloroforme à 30 °C. Donc, pour le PHB provenant de l'*A. eutrophus*, il y eu une perte du poids moléculaire de 50 %, tandis qu'aucune dégradation n'a été observée pour le PHB obtenu d'*E. coli*.

La lyse alcaline permet en deuxième intention de lyser des bactéries résistantes par des protocoles utilisant la soude à basse molarité. 91 % du PHB accumulé dans l'*E.Coli* recombinant ont été isolés par la digestion dans une solution d'hydroxyde de sodium (0,2 M) durant une heure à 30 °C. La pureté du produit final restant satisfaisante (98,5 %), le poids moléculaire a été 710 000. Finalement, le NaOH, étant un réactif peu cher, son utilisation entraîne une réduction des coûts de production allant jusqu'à 75 % par rapport aux méthodes qui utilisent NaOCl – SDS (Choi et Lee, 1998).

Chen et *al.* (2001) proposent une méthode de digestion chimique combinant l'action d'un surfactant (bétaine) et d'un chélate, l'éthylène diamine tétraacétate (EDTA) pour déstructurer la membrane bactérienne des cellules l'*Alcaligenes* et extraire le PHB. L'EDTA affaiblit la membrane des bactéries gram-négatives pour permettre le passage de la bétaine qui s'attaquera à la membrane cellulaire. C'est ainsi qu'après 10 min, il a été récupéré environ 90 % de PHB, d'une pureté d'au moins 96 et sans affecter le poids moléculaire du biopolymère.

Le palmitoyl-carnitine est un ester d'acide gras à longue chaîne de carnitine ((3S)-3-hexadecanoyloxy-4-triméthylammonio-butanoate) qui existe sous forme naturelle mais qui peut également être synthétisé à partir de l'acide palmitique. Le palmitoyl-carnitine (1 mM) a été utilisé pour la rupture chimique des parois cellulaires de l'*Alcaligenes eutrophus* et l'*Alcaligenes latus* (Lee et *al.*, 1993). La lyse de la biomasse a été complétée en 60 min à 30 °C, avec un taux de récupération de 87 % pour l'*Alcaligenes latus* et 72 % pour l'*Alcaligenes eutrophus*.

3.2.3 Lyse enzymatique

Dès lors que les enzymes lytiques sont capables de détruire la paroi des cellules des bactéries, la lyse ou digestion enzymatique a aussi été ciblée comme technique de récupération des biopolymères. Celles-ci permettent l'isolement efficace et précis des PHA accumulés dans l'*Alcaligenes eutrophus*, l'*Alcaligenes latus*, l'*Escherichia coli*, et toute autre bactérie dont les parois cellulaires sont susceptibles d'être lysées par des enzymes lytiques.

Des enzymes lytiques telles que le lysozyme ont été largement utilisées pour la lyse enzymatique de la paroi cellulaire des bactéries gram-positifs (G^+). Pourtant, la plupart des bactéries productrices de PHA sont du type gram-négative (G^-).

La figure 3.2 illustre les principales structures bactériennes. Il est à noter qu'aucune bactérie ne contient toutes ces structures, mais la plupart en contiennent une majorité (Hurlbert, 1996).

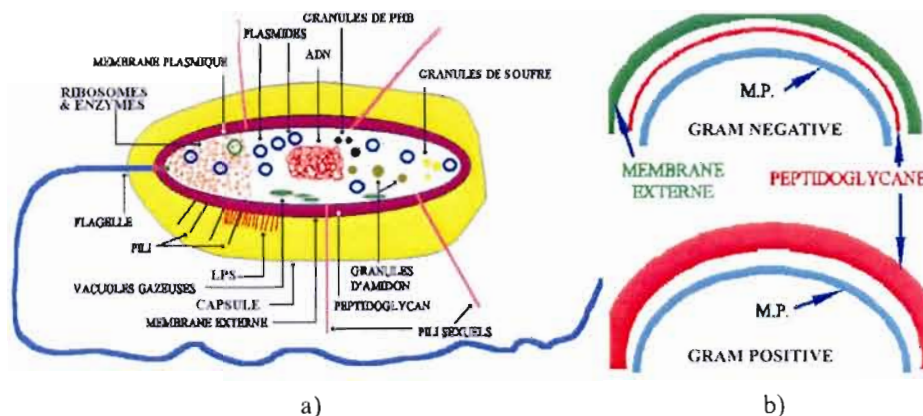


Figure 3.2 a) Les principales structures bactériennes, b) comparaison des enveloppes de bactéries gram négatives et gram positives. Les différences plus importantes sont l'épaisseur de la couche rigide de peptidoglycane et la présence d'une membrane externe chez les G⁻. Les G⁻ ont une couche de peptidoglycane très mince, de quelques molécules de large, alors qu'elle est très épaisse chez les G⁺. (Source : Hurlbert, 1996.)

La membrane plasmique (MP) est fluide et en général très fragile et peut se rompre facilement en l'absence de paroi cellulaire. La paroi cellulaire, quant à elle, est l'ensemble de la structure qui définit la frontière du cytoplasme. Elle inclut la MP et une ou deux couches dans la plupart des procaryotes. Chez les cellules gram-négatives (G⁻) la paroi cellulaire est constituée de trois couches, la MP et une seconde double couche lipidique appelée la membrane externe (ME) (figure 3.2 b).

La présence de cette membrane externe dans l'enveloppe des bactéries gram-négatives fournit à ces microorganismes une résistance accrue à l'attaque enzymatique par des enzymes disponibles commercialement comme l'alcalase, la labiase, le lysozyme, l'achromopeptidase, mutanolysin, etc. (Sigma-Aldrich, 2006). L'utilisation de ces enzymes pour la lyse cellulaire des G⁻ requiert alors d'un prétraitement de la biomasse avec de chélates, détergents, etc. (Andrews et Asenjo, 1987; Lee et al., 1993; Sigma-Aldrich, 2006).

Les premiers traitements enzymatiques appliqués à la récupération des PHA avec des enzymes ont été brevetés dans les années 80. Ceux-ci étaient, des traitements combinés impliquant le lysozyme comme enzyme lytique conduisant à la libération des granules PHA-intracellulaire d'*Alcaligenes eutrophus* (Holmes, 1982) et l'utilisation, entre autres, de

l'alcalase, la neutrase et la lecitase pour la récupération de PHB et PHBV d'*Alcaligenes eutrophus* et le PHB du *Methlobacterium organophilum* (Holmes et Lim, 1989). D'autres auteurs ont aussi rapporté des applications du lysozyme comme enzyme lytique, combiné à d'autres agents chimiques (Harrison et al., 1991a; Fidler et Dennis, 1992 et Lee et al., 1993).

La biomasse de *Pseudomonas putida* a été lysée par étapes avec EDTA – lysozyme – SDS (de Koning et Witholt, 1997). Dans cette approche, l'EDTA, en tant que chélateur de cations divalents, inhibe les métalloprotéases, le lysozyme qui hydrolyse les liaisons osidiques du peptidoglycane constituant la paroi des bactéries et le SDS dissout les lipides. Dans un autre exemple, les bactéries ont été suspendues dans un tampon de lyse constitué de : Tris-HCl ; EDTA, lysozyme, Triton X-100. Ceci a permis de récupérer le PHB présent dans l'*E. coli* recombinant. L'efficacité de la lyse a été de 95 % (Fidler et Dennis, 1992).

Il a été montré que les *Pseudomonas fluorescent*, peuvent être lysées par l'utilisation d'un traitement consécutif consistant en : 1) chauffage et agitation vigoureuse), 2) l'enzyme alcalase, 3) un surfactant (SDS) et 4) un chélate (EDTA). Le pourcentage de PHB dans le produit final a dépassé 95 % et plus de 98 % de la suspension bactérienne a été solubilisée. Il est toutefois à préciser que l'application des traitements séparément n'a donné que des pourcentages de solubilisation au-dessous de 25 % (de Koning et Witholt, 1997).

L'utilisation des préparations lytiques enzymatiques issues des microorganismes pourrait contourner le problème de résistance à la lyse des G⁻ (Andrews et Asenjo, 1987). Selon ces auteurs, l'action lytique des enzymes d'origine microbienne est le résultat de l'activité simultanée de plusieurs enzymes. Ce cocktail permet de rompre la membrane externe chez les bactéries gram-négatives et d'atteindre la membrane plasmique, à l'intérieur de laquelle se trouvent les granules de PHB (Andrews et Asenjo, 1987; Harrison et al. 1991b).

Pour assurer une lyse efficace, il est essentiel de respecter les conditions optimales de pH, de température et de concentration de la préparation enzymatique (Andrews et Asenjo, 1987). Ces auteurs reportent de nombreuses enzymes lytiques de la paroi cellulaire d'origine microbienne, abrégé mCWLE (*microbial Cell Wall Lytic Enzyme*), étant potentiellement actives pour la lyse bactérienne des G⁻ (voir tableau B-1 de l'appendice B).

Les enzymes produites par *Cytophaga*, contiennent une activité protéase, glucanase ainsi que d'autres activités enzymatiques secondaires (Andrews et Asenjo, 1987). Cette préparation enzymatique a été utilisée pour la destruction de la membrane cellulaire de l'*Alcaligenes eutrophus* contenant environ 75 % de PHB. La lyse a été menée à 37,5 °C pendant 60 minutes. Le dosage de protéines par méthode de Lowry, a montré que la lyse avait été accomplie, sans besoin de prétraitement ou d'autre agent lytique. Cette procédure, en tant que mode d'extraction douce, prévient une éventuelle détérioration du polymère, provoqué par le stress mécanique, thermique ou chimique (Harrison et *al.*, 1991b).

La *Microbispora sp.*, produit une enzyme lytique de la paroi cellulaire, capable de lyser la membrane externe des bactéries G⁻ (Kshama et Ramachandriah, 2006). Leur croissance résulte d'une fermentation secondaire, c'est-à-dire, elle est placée pour leur multiplication dans le même milieu de culture qui avait servi à alimenter le *Rhizobium meliloti* pour la production intracellulaire de P(HB-co-3HV). Les cellules de *R. meliloti* ont été lysées par les enzymes lytiques provenant de *Microbispora sp.* et 94 % du copolymère a été ainsi récupéré.

Les bactéries peuvent aussi s'autolyser (figure 3.3) et donc libérer les granules de PHB y accumulés (Resch et *al.*, 1998; Çetin et *al.*, 2006). La lyse peut être induite par l'inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane (PG) à l'aide de petites protéines de lyse.

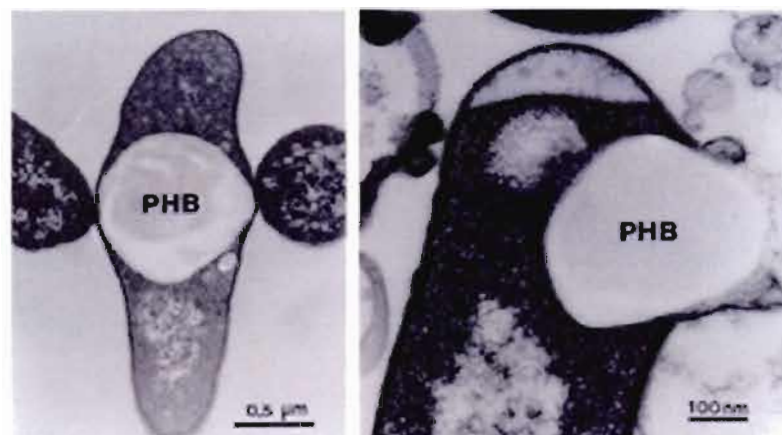


Figure 3.3 Micrographie électronique de l'expulsion des granules de PHB des cellules d'*E. coli* recombinant par autolyse bactérienne. Le chauffage du milieu de culture favorise la formation d'un petit tunnel à travers l'enveloppe cellulaire et ainsi le relargage concomitant des granules de PHB intracellulaire. (Tirée et adaptée de : Resch et *al.*, 1998.)

3.3 Méthodes combinées

La plupart des travaux qui ont été reportés, combinaient l'extraction au CHCl_3 avec la digestion chimique ou enzymatique. La combinaison de l'hypochlorite de sodium avec chloroforme a été utilisée par plusieurs auteurs (Hahn et *al.*, 1995; Jan et *al.*, 1995; Choi et Lee, 1997; Yu et *al.*, 2001). Cette approche est moins « agressive » que l'exposition unique à l'hypochlorite et dans bien des cas, il est possible d'abaisser la demande en solvant. Elle peut également être effectuée à basse ou hautes températures ou en continu dans un extracteur Soxhlet (Ghatnekar et *al.*, 2001).

La digestion du PHB a aussi été achevée dans une suspension de $\text{NaClO} - \text{CHCl}_3$, par agitation du mélange à 37 °C pendant 1 heure (Yu et *al.*, 2001) ou en utilisant le CHCl_3 et des agents coagulants à base d'aluminium ou à base de fer, ces derniers donnent au produit final une coloration rousse persistante (Ryu et *al.*, 2000).

L'action combinée surfactant-hypochlorite a été amplement étudiée (Ramsay et *al.*, 1990; Choi et Lee, 1997; Hahn et *al.*, 1998; Dong et Sun, 2000). Les auteurs ont montré que la digestion dans NaClO et pré traitement avec surfactant, dans des conditions optimisées (pour chaque bactérie), permet d'obtenir du PHB acceptablement pur (96-98 %) avec une faible dégradation. Du PHB à partir d'un hôte d'*Alcaligenes eutrophus* a ainsi été obtenu avec 98 % de pureté et un poids moléculaire (M_w) entre 730 000 et 790 000 (Ramsay et *al.*, 1990). Et dans une autre application, le 98 % du PHB contenu dans l'*Azotobacter chroococcum*, a été récupéré après prétraitement avec du SDS, suivie de l'exposition au NaClO (30 % v/v) pendant 3 min. Dans ces conditions, la pureté de PHA a atteint 96,5 %, sans dégradation du polymère (Dong et Sun, 2000).

De nombreuses applications, s'en servant des procédures mécaniques – chimiques, ont aussi été proposées, dans le but de détruire la structure de la biomasse et d'y isoler le PHA (Chisti et Moo-Young, 1986; Harrison et *al.*, 1991a; Ling et *al.*, 1997; Tamer et *al.*, 1998a; 1998b).

Dans leur travail, Ling et *al.* (1997) décrivent une stratégie pour isoler PHB synthétisé par l'*E. coli*, permettant la récupération de 80 % du PHB avec 96,5 % de pureté. L'approche a consisté en l'utilisation de trois étapes d'homogénéisation-centrifugation et un traitement intermédiaire à de l'hypochlorite de sodium. Aussi à partir de l'*E. coli*, le PHBV a été isolé en suivant une extraction par « choc osmotique » en présence de lysozyme/EDTA (Fidler et Dennis, 1992).

Plus récemment, l'extraction du PHB accumulé dans *Methylobacterium* a été effectuée en présence d'un surfactant (SDS) dans un homogénéisateur hydraulique « APV - Gaulin » à 400 kg cm⁻² avec un rendement d'extraction de 98 % (Ghatnekar et *al.*, 2001).

Dans une autre approche, le PHB accumulé dans l'*Alcaligenes latus*, a été relâché : en combinant un traitement chimique (SDS - NaClO) avec l'homogénéisation haute pression ou avec le broyage en continu dans un broyeur à billes (Tamer et *al.*, 1998b) ou par la digestion alcaline avec NaOH à 60 °C, complétée dans un broyeur à balles (Tamer et *al.*, 1998a). Dans ce travail, ainsi que celui présenté par Chisti et Moo-Young (1986), il a été fait une revue approfondie de la littérature sur les méthodes développées en utilisant des systèmes mécaniques de bio-séparation.

La SFE a été combinée avec l'extraction classique au chloroforme pour provoquer la lyse de cellules d'*Alcaligenes eutrophus* et dissoudre les granules de PHB de la suspension en résultante (Hejazi et *al.*, 2003). La SFE a été effectuée avec du CO₂/méthanol à 2 x 10⁴ kPa (T = 40 °C). Le méthanol joue le rôle de modificateur polaire du fluide supercritique (CO₂) ayant pour fonction d'améliorer la solubilité à travers les compartiments aqueux intra et extracellulaire. Avec cette stratégie le taux de récupération a été 89 % de PHB dont le poids moléculaire a été 760 000.

La technologie supercritique peut être aussi utilisée sans recourir aux solvants chlorés. Khosravi-Darani et *al.* (2004) ont récupéré 82 % du PHB produit par *A. eutrophus* en exposant un aliquote de suspension cellulaire, mélangé avec une solution de NaOH/méthanol/toluène, au CO₂ supercritique pendant 45 min.

3.4 Méthodes de purification

La dernière étape de l'obtention des PHA, consiste à les séparer des autres substances organiques, de sorte qu'ils puissent être purifiés. Après l'extraction par un solvant organique la phase de séparation du PHA est indissociable de la phase de contact car elle permet, le plus souvent par simple filtration, la séparation de la biomasse en épuisée du solvant en enrichi. Mais, généralement ce sont des solutions saturées et très visqueuses pour lesquelles, il est recommandé l'utilisation des filtres rotatifs sous pression.

Nonobstant, la filtration peut uniquement être utilisée pour séparer le PHA dissous des résidus insolubles. Les PHA dans le filtrat peuvent être récupérés par leur précipitation sélective dans le méthanol, l'éthanol, l'hexane ou l'éther diéthylique (Doi, 1990).

En 2006, il a été breveté une technique d'extraction et récupération des PHA présents dans la biomasse cellulaire. La récupération du biopolymère se fait par l'injection du solvant enrichi en PHA dans un flux de vapeur afin de favoriser la précipitation complète du PHA dans l'eau tout en traitant le solvant évaporé; épuisement du solvant résiduel; séparation des particules purifiées de PHA de la suspension et séchage desdites particules (PHB Industrial S.A., 2006).

Lorsque l'extraction des PHA se fait en milieu aqueux, par la dégradation de la paroi bactérienne, impliquant les différentes méthodes de lyse cellulaire (mécaniques, chimiques ou enzymatiques), les granules sont lavés et purifiés par centrifugation. En commençant par un lavage intense des granules avec de l'eau, afin d'éliminer des résidus de tampon, des sels et d'autres matières cellulaires soluble dans la phase aqueuse. Puis, par l'ajout du méthanol ou l'éther diéthylique, il est possible de remuer d'autres matériaux (Doi, 1990).

Pourtant, étant donné que la masse volumique du PHB est comprise entre 1,20 g cm⁻³ (de Koning et Witholt, 1997) et 1,66 g cm⁻³ (Pal et Paul, 2002), dans certains cas, la différence des masses volumiques par rapport à l'eau ne sera pas suffisante, en résultant une suspension très stable, difficile à séparer par centrifugation. Alors, il sera nécessaire de centrifuger à grande vitesse pour éviter de perdre le PHB durant l'étape de purification (de Koning et Witholt, 1997).

CHAPITRE IV

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les résultats de la présente étude ont donné lieu à la publication de deux articles qui seront présentés dans le chapitre « RÉSULTATS » (chapitre V), dans la section 5.1, l'article 1, « *Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells* » et dans la section 5.2, l'article 2, « *Rapid microwave assisted esterification method for the analysis of poly-3-hydroxybutyrate in *Alcaligenes latus* by gas chromatography* ». La description détaillée des matériels et méthodes se retrouve dans ces articles. Dans cette section, ils ne sont présentés que les parties non incluses dans les publications.

4.1 Produits chimiques et instrumentation

Les produits chimiques utilisés dans ce projet, ne figurant pas dans les articles :

Pour la lyse enzymatique, il a été utilisée une préparation enzymatique en poudre provenant de *Rhizoctonia solani* (kitalase), avec une activité lytique de β - (1-3)-glucanase, de protéase, de pectinase et d'amylase, fournie par Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Le tampon phosphate salin (PBS) a été fourni par Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA), le Tris (trishydroxyméthylaminométhane) par Gibco BRL ultraPURE, Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA) et l'acide chlorhydrique, grade environnemental, par Anachemia (Montreal, QC, Canada). Lors de l'extraction par solvant, outre le chloroforme et le méthanol, énoncés dans les articles 1 et 2 (voir sect. 5.1 et 5.2), il a été employé de l'hélium ultrahaute pure, fourni par Praxair Canada Inc. (Mississauga, ON, Canada). L'hydroxyde de sodium (pellets), pureté 99 %, a été fourni par Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Les appareils utilisés non décrits dans les articles sont exposés ci-dessous :

Centrifugeuse : Centrifugeuse réfrigérée Beckman Allegra série X-12R (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA), plage de températures de- 10 °C à + 40 °C, alimentation 220 Volts, 50 Hz, rotor libre 4 x 750 mL ARIES SX4750A, vitesse maximale 3750 t/min (rpm), force centrifuge relative maximale (RCF Max) 3270 g-force.

Agitateur : Agitateur Vortex (VWR International, Mississauga, ON, Canada) avec réglage de vitesse analogique, vitesse de rotation 0 - 990 rpm (1/min), alimentation 100 – 120 Volts, 50/60 Hz et puissance 60 W. Balance analytique : Mettler Toledo XS204, (Mettler-Toledo, Inc., Columbus, OH, USA), capacité 220 g, précision 0,1 mg.

Bain ultra-sons : Aquasonic 150D (VWR International, Mississauga, ON, Canada) à balayage de fréquence de cavitation 38,5 – 40,5 kHz et puissance des ultrasons de 135 W. Chauffage jusqu'à 80 °C et temporisation de 0 à 99 minutes avec commande digitale. Alimentation électrique, 117/120 Volts, 50/60 Hz, puissance absorbée 350 W, dimension du panier 26 x 18 x 10,5 cm, dimensions internes de la cuve : 30 x 23 x 15 cm, capacité 9 L. Appareil de mesure de l'intensité de cavitation à ultrasons (*Cavitation meter*) : modèle CM-3-100 (Alexy Associates, Inc. Bethel, NY, USA), écran analogique (0-1000 Cavins).

Le pH-mètre : modèle Accumet, AB15, (Fisher Scientific, PA, USA) avec électrode de référence Ag/AgCl. Les solutions tampons utilisées pour calibrer le pH-mètre sont des solutions à pH 4, pH 7 et pH 10.

4.2 Réactions de dérivation du PHB et méthodes de préparation des échantillons

4.2.1 Dérivation par méthanolyse acide et préparation des échantillons pour l'analyse GC

La réaction de dérivation du PHB par méthanolyse acide en présence et en absence de chloroforme, par chauffage classique et activation par les micro-ondes, suivie de l'extraction liquide-liquide comme technique de préparation des échantillons est décrite dans l'article 1. La méthanolyse acide combinant l'activation par micro-ondes suivie d'une micro-extraction en phase solide en mode « *headspace* » (MO-HS/SPME) a été schématisée dans la fig. 4.1.

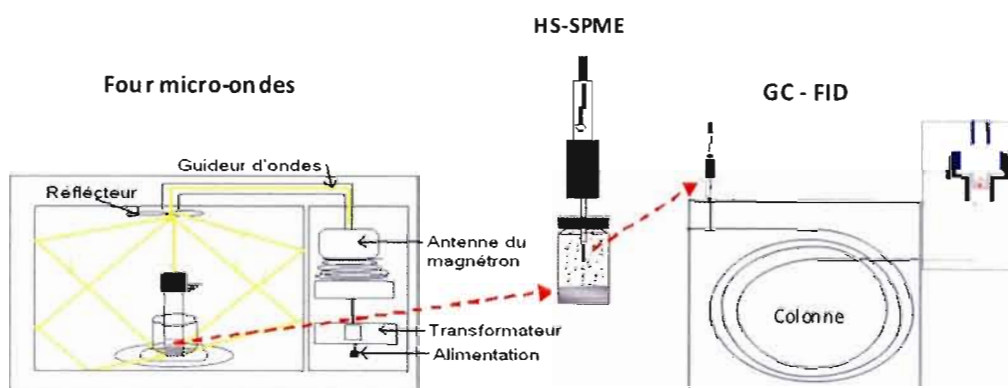


Figure 4.1 Schéma du protocole d'analyse des PHA dans la biomasse par MO-HS/SPME-GC/FID.

Afin de tracer la courbe d'étalonnage, divers poids de PHB (entre 0 et 20 mg) sont pesés directement dans des tubes Kimax 50 mL (150 x 20 mm). Les étalons de PHB commercial et les échantillons de PHB intracellulaire (environ 20 mg de biomasse lyophilisée) ont été mélangés avec 2 mL de méthanol acidifié (H_2SO_4 10 % v/v) contenant 1 g L^{-1} d'acide benzoïque comme étalon interne. Les solutions ont été homogénéisées et exposées à un champ de micro-ondes (110 W) pendant 4 min.

La solution résultante a été refroidie jusqu'à température ambiante. Ensuite 1 mL de chaque solution a été transféré dans un flacon SPME de 20 mL (75,5 x 22,5 mm). La SPME est réalisée par un passeur automatique CombiPal avec une fibre 50-30 μm Divinylbenzene/Carboxen/Polydiméthylsiloxane. La séparation est faite par chromatographie en phase gazeuse avec une colonne capillaire DB- WAXetr (30 m x 0,25 μm x 0,25 mm i.d.) couplée à un détecteur par ionisation à flamme (FID). Les conditions de la SPME et de l'analyse par GC/FID sont celles décrites dans l'article 1 (section 5.1).

4.2.2 Dérivatisation par hydrolyse et préparation des échantillons pour l'analyse HPLC

Hydrolyse alcaline - HPLC/UV : la dépolymérisation du PHB par hydrolyse alcaline est menée selon le protocole proposé par Yu et *al.* (2005). Ceci consiste à ajouter 1 mL de NaOH 4 M à des échantillons de PHB et à chauffer les solutions pendant 4 h à 70 °C. Une fois la réaction terminée, les solutions ont été partiellement diluées en ajoutant 10 mL d'eau dé-ionisée (Milli-Q^{UV}), neutralisées et acidifiées à pH = 3 par l'adjonction de l'acide sulfurique dilué (5 N). Puis, elles ont été laissées au repos afin d'atteindre la température de la pièce pour jauger. Les analyses ont été effectuées par HPLC avec détection UV à 210 nm. Pour l'étude du PHB intracellulaire, les résidus insolubles de la biomasse ont été éliminés avant l'analyse pour ne pas endommager la colonne HPLC. Pour ce faire, les solutions ont été clarifiées à l'aide des unités de filtration Millex (25 mm) avec membrane en fluorure de polyvinylidène hydrophile (PVDF) HV 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, USA).

Hydrolyse alcaline - HS/SPME - GC/FID : l'hydrolyse a été réalisée dans le flacon SPME (tel qu'il a été décrit pour l'hydrolyse acide dans l'article 1, section 5.1). Une fois terminée la réaction, les solutions sont portées à la température ambiante et il a été ajouté, prudemment, 1 mL d'acide sulfurique dilué (5 N). Les solutions, homogénéisées et refroidies, sont transférées à l'échantillonneur automatique pour la SMPE et l'analyse par GC/FID, dans les mêmes conditions utilisées pour l'extraction de l'acide crotonique produit par l'hydrolyse acide.

Hydrolyse alcaline par activation micro-ondes - HS/SPME - GC/FID: environ 10 mg de PHB ont été mélangés avec 1 mL de NaOH 4 M dans des tubes Kimax 15 mL. La solution a été placée dans le four micro-onde et irradiée à 110 W pendant 4 min, tel qu'il a été illustré à la figure 4.1.

Hydrolyse acide : le développement de la méthode impliquant l'hydrolyse acide et son couplage avec la SPME est exposé dans l'article 1. Lors des analyses par HPLC/UV l'hydrolyse et la préparation des échantillons ont été effectuées de la même façon que pour l'hydrolyse alcaline, décrite plus haut. Le pH a été ajusté avec du NaOH 4 M.

4.3 Techniques analytiques utilisées

Chromatographie en phase gazeuse : La description détaillée des techniques analytiques utilisées, GC/MS, GC/FID, HS/SPME – GC/FID, se retrouve dans les articles 1 et 2 (voir sect. 5.1 et 5.2).

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) équipé d'un détecteur PDA : Les tests des produits issus de chaque réaction des hydrolyse acide et alcaline ont été réalisés par HPLC (*Waters Chromatography*, Milford, MA, USA) avec un appareil équipé d'un détecteur PDA (*Photo Diode Array*), modèle 2996, d'une pompe modèle 600 et d'un injecteur de type 717+. La séparation a été effectuée à l'aide d'une colonne d'acide organique de marque Transgenomic (San Jose, CA, USA) de type Icsep ICE-ION-300 (300 mm x 7,8 mm d.i.). La HPLC était également équipé d'un détecteur d'indice de réfraction de type 2414 (Waters). La phase mobile était composée d'une solution 0,035 N d'acide sulfurique pH = 2 et circulait à un débit de 0,4 mL/min à 35 °C. Les tests ont été menés à une longueur d'onde de 210 nm.

4.4 Techniques d'extraction et de récupération du PHB

4.4.1 Extraction au chloroforme, méthode classique

Le PHB a été isolé de la biomasse par une extraction solide-liquide, extraction au chloroforme « classique ». Pour cela, 3 mL, 5 mL et 10 mL de solvant d'extraction sont ajoutés à environ 20 mg de biomasse (préalablement broyée dans un mortier) dans des tubes type Kimax 15 mL. Après 1 min d'agitation au Vortex, les échantillons sont portés à 50 °C, selon l'expérience, 5 ou 30 minutes, à l'aide d'un bloc chauffant. À la moitié et à la fin du temps fixé pour l'extraction, les solutions ont été agitées pendant une minute. Après leur refroidissement, elles ont été filtrées. Les échantillons laissés pendant 24 h et 48 h ont été maintenus à la température ambiante et ils ont été agités pendant une minute à 3 reprises, avant, au milieu et à la fin de l'extraction. Tous les essais ont été effectués en triplicata et le temps d'extraction et d'agitation ont été soigneusement contrôlés à l'aide d'une minuterie.

L'isolation et la purification du PHB a été effectuée en filtrant les solutions (filtration par gravité) avec du papier-filtre Whatman n° 1. Les tubes d'extraction et le résidu sur le papier ont été rincés à trois reprises avec 2 mL du chloroforme. Pour les solutions, les plus visqueuses, la filtration s'est avérée très lente et une partie du solvant s'évaporait avant de traverser le papier, deux autres millilitres de solvant ont y été ajoutés. Afin de déterminer la quantité de PHB récupéré, le solvant du filtrat a été évaporé sous jet d'hélium et resuspendu dans 2 mL de méthanol acidifié (H_2SO_4 10 % v/v) contenant AB 8 g L^{-1} et 2 mL de chloroforme pour l'analyse GC/FID (tel que décrit dans les articles 1 et 2).

4.4.2 Extraction au chloroforme assistée par sonication

Environ 20 mg de biomasse ont été placés dans de tubes de verre Kimax de 15 mL et différents volumes de chloroforme (3 mL, 5 mL et 10 mL) ont été y ajoutés. L'ensemble est homogénéisé par agitation au Vortex durant 2 min. Les tubes sont placés dans le bain ultrasons, au milieu de la cuve, dans un râtelier métallique (3 x 6) pour tubes à essai. Les échantillons ont été traités aux ultra-sons à balayage de fréquence de 38,5 à 40,5 kHz pendant un certain temps (entre 5 et 30 minutes), de façon continue ou par intermittences et avec contrôle automatique de la température à 50 °C. Lors de l'application des ultrasons, l'intensité de cavitation était entre 80 et 100 CAVINS. À la fin de la sonication, les suspensions ont été refroidies à la température de la pièce et ensuite filtrées pour éliminer les débris solides et recouvrer le PHB dissout dans le chloroforme. Le biopolymère est récupéré par filtration en suivant la procédure exposée plus haut.

4.4.3 Extraction au chloroforme assistée par micro-ondes

Les échantillons de PHB ont été extraits à partir d'un échantillon d'environ 20 mg de biomasse dans des tubes scellés Kimax 50 mL (150 x 20 mm), en utilisant 3 mL de chloroforme. Les échantillons sont homogénéisés au Vortex et exposés aux micro-ondes dans le four micro-ondes domestique (celui indiqué dans l'article 2). Les solutions (une à la fois) ont été irradiées pendant différents temps et à des puissances entre 110 à 440 W. Après chaque irradiation, la suspension résultante a été refroidie et filtrée.

4.4.4 Extraction du PHB par lyse enzymatique

La lyse enzymatique fut effectuée avec de la kitalase, une préparation enzymatique produite par la bactérie *Rhizoctonia solani*. Le tapon de lyse, dont la concentration finale d'enzyme était de $0,48 \text{ g L}^{-1}$, a été préparé en diluant 24 mg de kitalase dans 50 mL d'une solution tampon de Tris/HCl pH 5,03. La mesure du pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre.

La masse cellulaire, environ 80 mg de biomasse lyophilisée, a été broyée dans un mortier et mélangée avec 1 mL de phosphate-buffer saline (PBS) pH = 7,4. Le mélange est vigoureusement agité (Vortex à 990 rpm) et puis centrifugé à température ambiante, pendant 5 min à 3270 g. Cette opération a été répétée deux fois. Le surnageant a été prélevé et le culot bactérien a été resuspendu dans 1 mL de PBS et 5 mL du tampon de lyse constitué de $0,48 \text{ g L}^{-1}$ de kitalase et 50 mM Tris/HCl. Les cellules ont été alors remises en suspension par agitation et les solutions ont été incubées dans un bloc chauffant à 50 °C, après une heure de digestion, le lysat a été retiré et ensuite traité pour récupérer et purifier le biopolymère.

Pour la séparation, purification et analyse du PHB après la lyse enzymatique, les solutions résultantes ont été agitées vigoureusement avec le Vortex et centrifugées à trois reprises, en ajoutant à chaque fois, 5 mL d'un solvant. En commençant par l'eau, le tout est centrifugé à 3270 g pendant 15 min à 8 °C. La phase aqueuse contenant le lysat cellulaire et les sels dissouts a été éliminée. Puis, le culot a été lavé avec du méthanol (deux fois) pour éliminer, entre autres, des lipides qui y sont solubles. Le culot de centrifugation, n'étant pas stable, le surnageant était retiré délicatement avec une pipette Pasteur. Finalement le chloroforme a servi pour séparer le PHB du reste des cellules éventuellement non lysées et ainsi évaluer l'efficacité de la lyse lors de l'analyse par GC/FID. Pour ce faire, 5 mL de chloroforme ont été ajoutés et le mélange a été agité par Vortex pendant 2 min. La suspension a été ensuite filtrée et les débris cellulaires insolubles retenus par le filtre, ainsi que les tubes, ont été rincés avec 2 mL de solvant. Le filtrat a été séché sous jet d'He. Le produit résultant a été resuspendu dans 2 mL de MeOH acidifié et 2 mL de CHCl_3 pour la méthanolyse et l'analyse par GC/FID, comme décrit dans les articles 1 et 2.

CHAPITRE V

RÉSULTATS

Les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire seront divisés en deux parties :

Partie 1 : Développement des méthodes analytiques pour le dosage du PHB intracellulaire. Cette première partie est consacrée à la présentation des méthodes d'analyse de biopolymères, les techniques de dosage abordées comportent trois étapes :

1. Dépolymérisation : par méthanolyse et par hydrolyse (acide et alcaline), en utilisant le chauffage classique ou sous irradiation micro-ondes.
2. Préparation de l'échantillon : par extraction liquide-liquide et par micro-extraction en phase solide.
3. Analyse : par chromatographie en phase gazeuse (GC/FID) et par chromatographie en phase liquide (HPLC/UV).

L'objectif général de cette étude consiste à développer une méthode d'analyse du PHB dans la biomasse qui soit fiable, pratique d'utilisation dans divers contextes et écologique.

Partie 2 : Méthodes d'extraction du PHB intracellulaire. La deuxième partie est consacrée à l'étude de différentes techniques d'extraction du biopolymère accumulé dans l'*Alcaligenes latus* dont l'extraction par solvant classique et assistée par la sonication et par les micro-ondes et le relargage des granules par lyse enzymatique.

L'objectif général de cette étude consiste à diminuer ou d'éliminer l'utilisation du chloroforme lors de l'extraction et la récupération du PHB.

PREMIÈRE PARTIE

DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES ANALYTIQUES POUR LE DOSAGE
DU PBH INTRACELULAIRE

5.1 Article 1. « *Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells* »

Ce travail a été fait sous l'encadrement de mon directeur, Dr Huu Van Tra, professeur du département de chimie de l'UQÀM et mon codirecteur, Dr Jalal Hawari chercheur principal et chef du groupe chimie analytique et environnementale à l'IRB-CNRC. Cet article est le résultat de mon travail et de celui de Dr Fanny Monteil-Rivera avec la collaboration de Dr Abdessalem Yezza, chercheurs dans le laboratoire de Dr Jalal Hawari. Ma contribution dans cet article concerne la participation à la conception du projet, la planification et réalisation des travaux expérimentaux, l'optimisation des méthodes d'analyse, développement des nouvelles applications et la rédaction des rapports servant à la rédaction finale des articles.



Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells

Fanny Monteil-Rivera^{a,*}, Airmesther Betancourt^a,
Huu Van Tra^b, Abdessalem Yezza^a, Jalal Hawari^a

^a Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Quebec H4P 2R2, Canada

^b Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec H3C 3P8, Canada

Received 17 January 2007; received in revised form 12 March 2007; accepted 21 March 2007

Available online 4 April 2007

Abstract

Biopolymers such as poly(hydroxyalkanoates) (PHAs) have received much attention due to their physico-chemical properties, biodegradability, and biocompatibility that make them good candidates for industrial and medical applications. Produced by some microorganisms PHAs accumulate within the cells of these organisms. The optimization of microbial processes to produce PHAs at a lower cost requires rapid and accurate techniques for quantification of the biopolymer in biomass. The present study describes a method based on solid-phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography (GC) for the determination of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in *Alcaligenes latus* cells. First PHB was depolymerized by either methanolic or hydrolytic digestion into methyl 3-hydroxybutyrate (Me-3-HB) or crotonic acid (CA), respectively. The resulting analytes were then subjected to analysis by headspace SPME/GC with flame ionization detection (FID). The two depolymerization/SPME/GC-FID methods were optimized and applied to the analysis of PHB in bacterial biomass harvested from a fermentation process that uses *A. latus*. Results were compared with those obtained using GC-FID analysis of MeOH/CHCl₃ digested samples. Excellent agreement was found between the three methods but the two SPME-based methods were environmentally friendly and easier to perform.

© 2007 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB); *Alcaligenes latus*; Methanolysis; Hydrolysis; Solid phase microextraction (SPME)

1. Introduction

Poly(hydroxyalkanoates) (PHAs) are known as polymers composed of short or medium-chain-length 3-hydroxy fatty acids produced by many different species of bacteria. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB), the most common member of the PHAs series, occurs as inclusion granules in the cells of various microorganisms, and can be accumulated as carbon and energy storage material under nitrogen limited conditions. Because PHB has physical properties similar to those of commonly used, non-biodegradable, petrochemical-derived thermoplastic polypropylene, it has attracted much attention. The inherent biodegradability and biocompatibility of PHB and other PHAs make them ideal candidates for medical and pharmaceutical applications [1,2].

Several microbial processes are presently being optimized to produce PHB at a lower cost. The development and optimization of biotechnological processes requires rapid and accurate quantification of PHB in microbial cells. A number of methods have been used to serve this purpose, including gravimetry [3] or IR-spectrometry [4] after solvent extraction, spectrophotometry after quantitative conversion to crotonic acid (CA) in concentrated sulfuric acid [5], gas chromatography (GC) after hydrolytic esterification in a chlorinated solvent [6–9], and liquid chromatography after quantitative conversion of PHB to CA [10] or 3-hydroxybutyric acid (3-HB) [11]. The method developed by Braunegg et al. [6] based on the hydrolytic methanolysis of PHB in chloroform followed by chromatographic analysis is currently the most commonly used. This method, which allows extraction, hydrolysis, and derivatization to take place in one vessel, represented a major advance in rapidity and reproducibility compared to the previously employed techniques. However, the Braunegg technique [6] requires handling and disposal of the hazardous chlorinated solvent CHCl₃, and is still rather fastidious due to the liquid–liquid extraction step.

* Corresponding author. Tel.: +1 514 496 6259; fax: +1 514 496 6265.
E-mail address: Fanny.Monteil@nrc-nc.gc.ca (F. Monteil-Rivera).

The aim of this work, therefore, was to design and optimize a method for the rapid quantitative determination of PHB in microbial cells harvested from fermentation processes. Two methods were investigated that are both based on the use of solid-phase microextraction (SPME), a recently developed solvent-free sample preparation technique [12]. The first method consisted in the methanolysis of PHB in the absence of chloroform followed by SPME/GC with flame ionization detection (FID) analysis while the second method consisted in the total conversion of PHB to crotonic acid in concentrated sulfuric acid followed by SPME/GC-FID analysis. Accuracy, reproducibility, and practicality of each method were estimated and compared to those obtained using the methanolysis/ CHCl_3 method as described by Braunegg et al. [6].

2. Experimental

2.1. Chemicals

Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] (PHB), (+/-)-3-hydroxybutyric acid (3-HB) (95%), methyl (*S*)-3-hydroxybutyrate (Me-3-HB) (99%), *trans*-crotonic acid (*t*-CA) (98%), benzoic acid (BA) (99.5%), and *trans*-hex-2-enoic acid (*t*-HA) (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Concentrated sulfuric acid (H_2SO_4 , 95–98%) was purchased from Anachemia (Montreal, Canada). Chloroform (CHCl_3 , approximately 0.75% ethanol as preservative/certified ACS) was from Fisher Chemical (Nepean, Canada), and methanol (CH_3OH , HPLC grade) from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Deionized water was obtained with a Milli-Q^{UV} plus system (Millipore, Mississauga, Canada).

2.2. Production of PHB-containing biomass

PHB was produced by *Alcaligenes latus* (ATCC 29714) using a sucrose-rich medium as carbon source. Five to 10 mL of fermentation broth was centrifuged and the biomass was washed twice with distilled water to remove residual culture medium, frozen, and lyophilized prior to PHB analysis.

2.3. PHB treatments

2.3.1. Methanolysis in chloroform

A slightly modified version of the method described by Braunegg et al. [6] was used to analyze commercial PHB or bacterial PHB still embedded in the freeze-dried cell mass (PHB-CM). Briefly, PHB or PHB-CM (0–20 mg) was added to a mixture of 2 mL methanol acidified with 10% sulfuric acid and containing benzoic acid (8 g L^{-1}) as the internal standard and 2 mL chloroform. The mixture, kept in 10-mL Pyrex test tubes equipped with PTFE-lined screw caps, was heated for 3 h at 100°C using a modular dry block heater. Samples were vortexed for 2 min every hour during heating, then cooled down to room temperature and treated with deionized water (1 mL). Finally, samples were agitated for 2 min and the organic phase was dried over sodium sulfate for subsequent analysis by GC-FID.

2.3.2. Methanolysis without chloroform

PHB or PHB-CM (0–20 mg) was added to 1 mL of methanol acidified with 10% sulfuric acid and containing benzoic acid (1 g L^{-1}) as the internal standard. Unless otherwise mentioned the mixture was heated for 3 h at 100°C in 20-mL amber glass vials fitted with magnetic screw caps with PTFE silicone septa (Varian, Mississauga, Canada). Samples were then cooled down to room temperature before extraction of Me-3-HB by SPME directly in the reaction vial and subsequent analysis by GC-FID as described below.

2.3.3. Acid hydrolysis

PHB or PHB-CM (0–10 mg) was added to 1 mL of an aqueous solution of sulfuric acid (10, 50, 98%). Unless otherwise mentioned each mixture was heated for 4 h at 70°C in 20-mL amber glass vials fitted with magnetic screw caps with PTFE silicone septa and brought down to room temperature. The vial was then opened to allow slow addition of 2 mL of NaOH (4 M), and SPME was conducted directly in the recapped reaction vial for subsequent analysis by GC-FID as described below.

2.4. Solid-phase microextraction

Me-3-HB and *t*-CA resulting from methanolysis or hydrolysis of PHB were extracted from the headspace of the methanol (1 mL) or the aqueous (3 mL) samples, respectively, by a fused-silica fiber coated with the sorbent phase of interest (Supelco, Bellefonte, PA, USA) under static conditions. Five different fibers were tested for their ability to extract Me-3-HB and *t*-CA: a Stable Flex (23-Gauge) $70 \mu\text{m}$ Carbowax/divinylbenzene (CW/DVB); a Stable Flex (23-Gauge) $65 \mu\text{m}$ polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB); a Stable Flex (23-Gauge) $85 \mu\text{m}$ Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS); a Stable Flex (23-Gauge) $50\text{--}30 \mu\text{m}$ divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS); and a (24-Gauge) $85 \mu\text{m}$ polyacrylate (PA) that was used manually only. The five fibers were conditioned in a GC injector port prior to use, according to the manufacturer's recommendations.

Optimization (described in more details in Section 3) and validation of the method were done using a Combipal autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) equipped with sample trays, a temperature-controlled agitator tray, and a fiber conditioning station. All movements of the SPME fiber including preconditioning, adsorption, and desorption were precisely controlled by a Cycle Composer software with Macro Editor version 1.5.3, Firmware 2.4.0. The magnetic displacement of vials in the Combipal autosampler implied using 20-mL ($75.5 \text{ mm} \times 22.5 \text{ mm}$) amber glass vials sealed with magnetic crimp caps with 1.3 mm PTFE-coated silicone septa (Varian).

2.5. Analytical techniques

2.5.1. Gas chromatography

Both Me-3-HB and *t*-CA were analyzed using a Hewlett-Packard HP 6890 gas chromatograph equipped with a FID system.

Samples desorbed from the SPME fibers were injected in the splitless mode on a DB-WAXetr capillary column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm) from Agilent J&W Scientific (Wilmington, DE, USA). The injector temperature was kept at 220 °C. The GC oven temperature was held at 80 °C for 2 min, ramped to 160 °C at a rate of 30 °C min⁻¹, held for 4 min, and ramped to 250 °C (held for 4 min) at 35 °C min⁻¹. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.9 mL min⁻¹. The flame ionization detector was maintained at 250 °C.

Chloroform samples (1 μL) were injected in the split (3:1) mode on a capillary column SPB-1 (15 m × 0.53 mm I.D., 0.15 μm) from Agilent J&W Scientific. The injector and detector temperatures were set at 265 and 275 °C, respectively. The oven temperature was set at 50 °C for 5 min, then increased at a rate of 30 °C min⁻¹ until the maximum temperature, 270 °C, was reached and maintained for 8 min.

2.5.2. Gas chromatography–mass spectrometry

Byproducts generated during treatment of PHB under various conditions were identified by GC–MS using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to a 5973 quadrupole mass spectrometer with electron impact (70 eV ionization energy). Chloroform extracts (1 μL) were injected in the splitless mode on a 50 m × 0.2 mm, 0.33 μm HP-5MS capillary column (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). The column was heated at 50 °C for 3 min then raised to 250 °C at a rate of 10 °C min⁻¹, and kept at this temperature for 12 min. Helium was used as carrier gas at an average velocity of 28 cm s⁻¹. The injector temperature was set at 250 °C and the detector interface was maintained at 300 °C. Data were collected in the scan mode between 45 and 500 amu.

3. Results and discussion

Different products may result from the depolymerization of PHB depending on the treatment that is applied to disrupt the polymer.

3.1. Product distribution upon application of various digestion treatments to commercial PHB

3.1.1. Methanolysis in chloroform

The method first developed by Braunegg et al. [6] was used as a reference method for the analysis of commercial PHB. Different amounts of commercial PHB were treated with acidified methanol and chloroform for 3 h at 100 °C. GC–FID analysis of the resulting chloroform phase showed Me-3-HB and methyl benzoate (Me-B, internal standard) as the only products to be detected.

3.1.2. Methanolysis without chloroform

Since chloroform is known to facilitate the methanolysis of PHB by helping the polymer to dissolve, it was necessary to first confirm the occurrence of methanolysis in the absence of chloroform. Various amounts of PHB were treated with acidified methanol at 100 °C for 3 h and water and chloroform were added *a posteriori* to allow phase separation. The chloroform

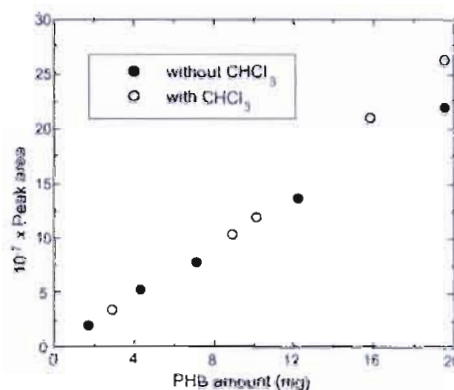


Fig. 1. Gas chromatographic determination of Me-3-HB dissolved in chloroform after methanolysis of PHB in the presence and absence of chloroform.

phase was analyzed by GC–FID and results were compared to those obtained when introducing chloroform at the beginning of methanolysis (Fig. 1). Response of Me-3-HB in the chloroform added at the end of the reaction was close to the one obtained using Braunegg's method, thus confirming the reactivity of PHB with methanol even in the absence of chloroform. Highest yields for the methanolysis of PHB without the formation of byproducts were obtained after 3 h heating at 100 °C. All further methanolysis experiments were thus conducted at 100 °C for 3 h.

3.1.3. Acid hydrolysis

A different way of analyzing PHB without using chlorinated solvent was to take advantage of its ability to hydrolyze under acid or alkaline conditions [13]. As reported in the literature [13], we confirmed that hydrolysis of PHB using 4 M NaOH at 70 °C gave the two monomeric products, 3-hydroxybutyric acid (3-HB) and crotonic acid (CA). While the latter could be detected both by GC–FID or HPLC–UV, 3-HB was not volatile enough to be detected by GC. We, therefore, decided to hydrolyze PHB under acid conditions. Several concentrations of H₂SO₄ were investigated together with various temperatures. Using concentrated H₂SO₄ at 70 °C for 4 h led to complete digestion of PHB with CA being the only product observed. These optimal conditions were the ones selected for all subsequent acid hydrolysis experiments.

Conditions selected for the depolymerization of PHB and the resulting products are presented in Fig. 2.

3.2. Optimization of SPME/GC analysis

3.2.1. Me-3-HB in methanol

Reaction media resulting from the methanolysis of commercial PHB in the absence of chloroform (0–20 mg PHB, 1 mL MeOH, 10% H₂SO₄, 1 g L⁻¹ BA, 100 °C, 3 h) were used directly to optimize SPME parameters. Among the five fibers tested for their ability to extract Me-3-HB from the methanolic solutions two stationary phases, DVB/CAR/PDMS and CW/DVB,

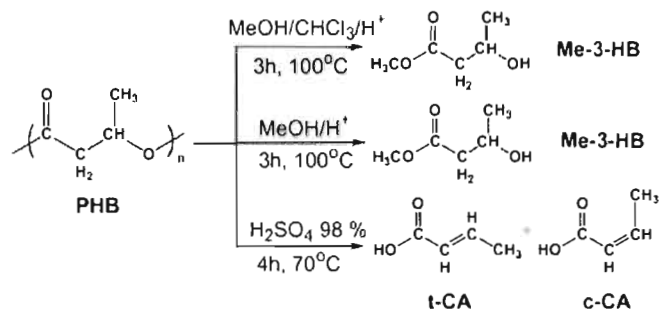


Fig. 2. Depolymerization of PHB under various treatments.

appeared to be the most sensitive (Fig. 3). The former was selected for subsequent method development. Addition of salt was not investigated in this non-aqueous medium. The fiber was exposed to the headspace under static conditions at 40 °C and preincubation, extraction, and desorption times were varied in order to determine the optimal conditions (Fig. 4). Increasing the preincubation time above 10 min did not change significantly the response of Me-3-HB and Me-B. Similarly, varying the desorption time between 1 and 9 min did not affect significantly the response of Me-3-HB and Me-B. Preincubation and desorption times were thus fixed at 15 and 5 min, respectively, in the remaining experiments. Indeed 15 min was selected for the preincubation time to allow temperature to reach equilibrium in case samples were not completely cooled down before the analysis. Blank controls confirmed that 5 min desorption was sufficient to prevent any carryover. Extraction time profiles (Fig. 4C) showed that Me-3-HB and the internal standard, Me-B, behaved differently towards the fiber, with the former adsorbing faster, as illustrated by the decreasing ratio of areas. Since a stable ratio of areas between the analyte and the internal standard is a prerequisite for valid quantifications, extraction times of 20 min were applied in all subsequent work.

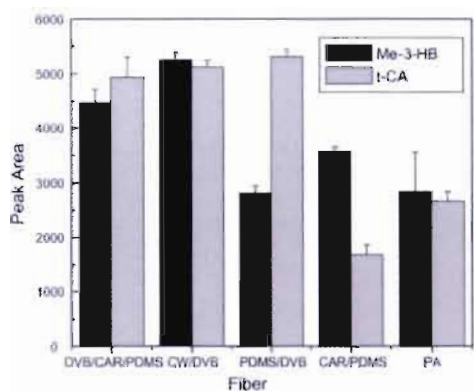


Fig. 3. Comparative responses using various fibers for SPME/GC-FID analysis of Me-3-HB after methanolysis (SPME: static, 40 °C; black columns) and *t*-CA after acidic hydrolysis (SPME: static, 35 °C; gray columns).

3.2.2. *t*-CA in concentrated H_2SO_4

SPME parameters were optimized using the reaction media resulting from the hydrolysis of commercial PHB in concentrated H_2SO_4 (0–20 mg PHB, 1 mL 98% H_2SO_4 , 70 °C, 4 h, neutralization with 2 mL of NaOH (4N)). Among the five fibers tested for their ability to extract *t*-CA from the acid solutions three stationary phases, DVB/CAR/PDMS, CW/DVB, and PDMS/DVB, appeared to give the highest responses (Fig. 3). Fiber DVB/CAR/PDMS was also selected for subsequent method development. The medium resulting from partial neutralization of H_2SO_4 with NaOH contained 1.33 M Na_2SO_4 (189 g L^{-1}) so that no additional salt was introduced in the SPME vial.

The fiber was exposed to the headspace under static conditions at 35 °C and preincubation, extraction, and desorption times were varied in order to determine the optimal SPME conditions (Fig. 5). Increasing the preincubation time above 5 min did not improve significantly the response of *t*-CA. Similarly, varying the desorption time between 3 and 9 min did not affect the response of *t*-CA. Preincubation and desorption times were thus fixed at 10 and 3 min, respectively, in the following experiments. Again a longer preincubation time was selected to ensure temperature equilibrium. Blank controls demonstrated the existence of a small carryover (1–2%) that was totally removed by introducing a bakeout step of 3 min at 250 °C between each measurement. Extraction time profiles (Fig. 5C) showed that approximately 40 min were necessary to reach the equilibrium of *t*-CA extraction. Methyl benzoate could not be used as internal standard due to its facility to hydrolyze in acid media. Another compound, *trans*-hex-2-enoic acid (*t*-HA), was tested as internal standard based on its chemical resemblance with *t*-CA but the much longer time required to reach the extraction equilibrium ruled out its use for quantification. Analyses were thus performed without internal standard. Although the *t*-CA extraction equilibrium was reached after 40 min extraction times of 10 min were selected to ensure a sufficient answer while keeping reasonable the duration of analysis.

It is worthwhile noting that in all experiments where CA was formed, the peak of *trans*-CA (*t*-CA) was preceded by a smaller peak that was identified as *cis*-CA (*c*-CA) by GC-MS, and that represented approximately 9% of the sum of areas for *t*-CA and *c*-CA. Since *c*-CA was not commercially available,

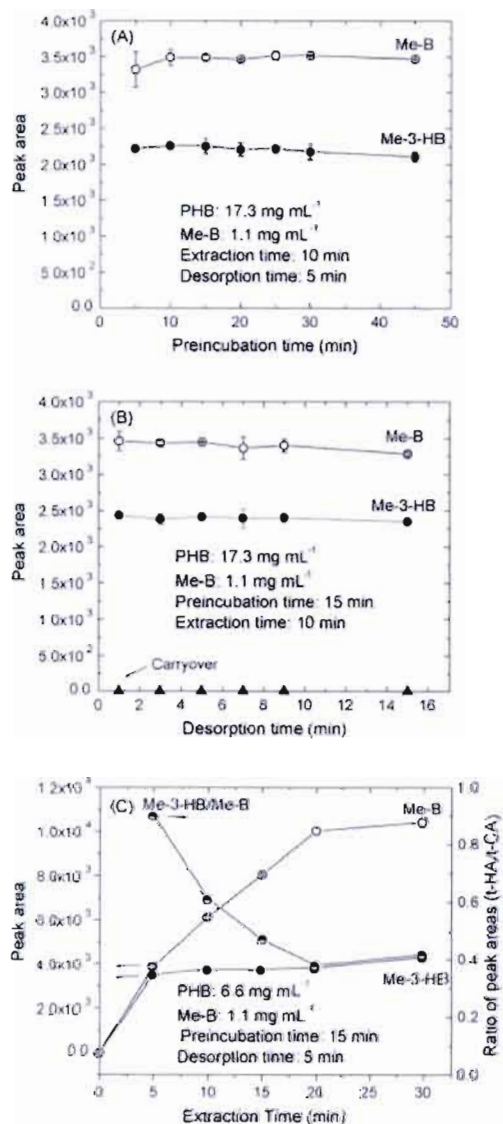


Fig. 4. Effect of (A) preincubation time, (B) desorption time, and (C) extraction time on the response of Me-3-HB and Me-B (OV-17-CAR/PLM/S fiber, temperature 40 °C, other parameters are indicated within each figure). Error bars represent the standard deviation of triplicate experiments ($n = 3$).

quantifications of PHB was performed using the *t*-CA peak only, taking advantage of the fact that the proportion of *c*-CA relative to *t*-CA remained constant in all experiments.

3.3. Application of SPME/GC to the analysis of PHB: method performances

Method performances of the two sequences (methanolysis/SPME/GC-FID and hydrolysis/SPME/GC-FID) were evaluated

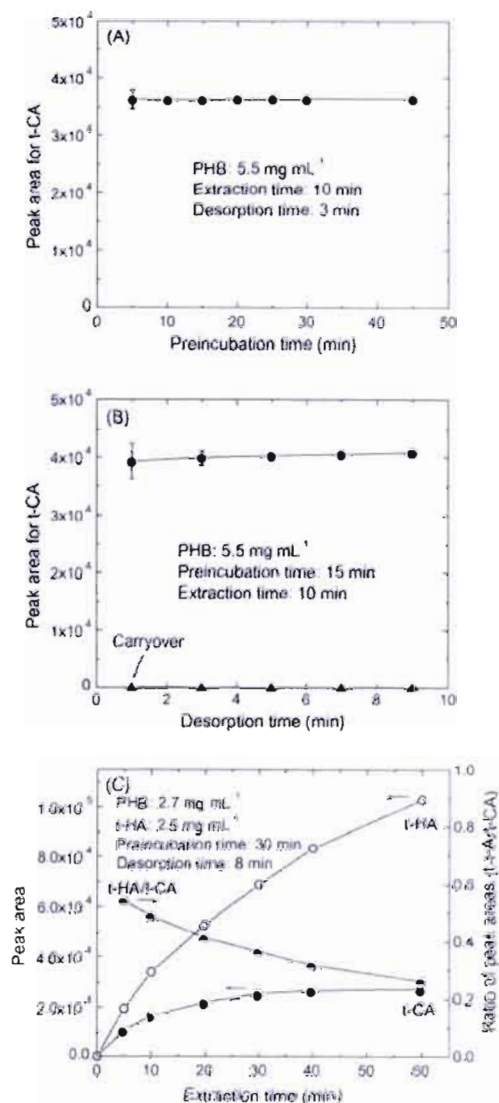


Fig. 5. Effect of (A) preincubation time, (B) desorption time, and (C) extraction time on the response of *t*-CA and (temperature 35 °C, other parameters are indicated within each figure). Error bars represent the standard deviation of $n = 5$.

using commercial PHB at a concentration close to the one used in the reference method, *i.e.* few milligrams of PHB per milliliter of solution. In order to determine the lowest amounts of PHB detectable, some standards were also prepared by dilution of the methanolized or hydrolyzed solutions. All standards were analyzed in triplicate using Me-B as internal standard for Me-3-HB and without internal standard for *t*-CA. The linearity ranges, equation parameters, and correlation coefficients resulting from linear regression are given in Table 1. The two calibration curves were well represented by

Table 1
Analysis of calibration standards^a by SPME/GC-FID using DVB/CAR/PDMS coating

Method	Target analyte	Linearity range (g PHB L ⁻¹)	Linear equation ^b	Correlation coefficient ^c (r ²)
Methanolysis	Me-3-HB	0.22–15	$y = 0.0467 (\pm 0.0006)x + 0.0102 (\pm 0.005)$	0.9995 (n = 7)
Hydrolysis	t-CA	0.016–2	$y = 6811.3 (\pm 67.9)x - 75.8 (\pm 65.9)$	0.9997 (n = 8)

^a For methanolysis, standards were made of 1 mL MeOH containing 10% H₂SO₄, 1.1 g L⁻¹ Me-B, and various amounts of Me-3-HB; for hydrolysis, standards were made of 1 mL 98% H₂SO₄, 2 mL 4 M NaOH, and various amounts of t-CA.

^b For Me-3-HB, y is the ratio of peak area relative to the internal standard and x is the concentration of PHB in g L⁻¹. For t-CA, y is the measured peak area and x is the concentration of PHB in g L⁻¹. Errors are given between brackets.

^c Determined from the linear regression analysis of n standards, using Microcal Origin 6.0 software.

linear equations, as demonstrated by the correlation coefficients (Table 1).

The method detection limits (MDLs) were calculated for the hydrolysis and methanolysis according to published guidelines [14], as 3 times the standard deviation for a measurement value not higher than 10 times the MDL. On the basis of these guidelines, the method quantification limits (MQL) was estimated as 10 times the standard deviation. The accuracy (recovery) and precision (RSD) of the SPME/GC-FID method were evaluated by analyzing a check standard of known concentration (216.3 mg L⁻¹ after methanolysis; 36.67 mg L⁻¹ after hydrolysis) seven times, and quantifying it using the established linear calibration curves. The results for the detection limits, precision, and accuracy of quantification are given in Table 2.

Accuracy and precision were reasonable for both methods although the reproducibility obtained in methanol was somewhat lower than that measured in sulfuric acid solutions. MDL of methanolysis/SPME was found one order of magnitude higher than that of hydrolysis/SPME likely due to the better extraction of organic compounds from aqueous solutions compared to methanolic solutions. The fact that the extraction time of 10 min for hydrolysis was still on the rising portion of the time profile did not weigh down the precision of the method, thus justifying our initial choice to reduce the analysis time. It should be noted that the present data were obtained with a fiber that had already

been subjected to approximately 500 analyses all performed in acid media.

According to the above-determined MDL amounts of 53 and 4.8 μg of PHB could be detected by methanolysis/SPME/GC-FID and hydrolysis/SPME/GC-FID, respectively. Although these amounts are higher than the minimal quantity detected by Brauneegg et al. using GC-MS (0.5 μg [6]) they are largely sufficient to analyze the amount of PHB commonly obtained in microbial cells. MDLs could have been improved by performing the extraction step at higher temperature or under stirred conditions but detection of traces was not the aim of the present work. On the contrary the extraction was performed at 40 °C and under static conditions to avoid the saturation of the fiber that was observed when increasing the extraction temperature or introducing some stirring.

3.4. Application of SPME/GC to the analysis of PHB in microbial cells: comparison between methods

The two developed techniques, methanolysis/SPME/GC-FID and hydrolysis/SPME/GC-FID, were applied to real PHB-CM samples and results were compared to those obtained using the method adapted from Brauneegg et al. [6]. Three different lots of PHB-CM grown on a sucrose-rich medium were harvested, lyophilised, and grinded, and the resulting homogenized lots were subsampled for analysis by the three methods (Table 3). The two SPME-based methods agreed very well with Brauneegg's determination, thus demonstrating the applicability of the present SPME-based methods to the analysis of PHB in microbial cells. Precisions however were lower than those obtained with the reference method (methanolysis: 1.0% < RSD < 16.4%; hydrolysis: 5.5% < RSD < 12.0%) as often observed with SPME.

Table 2
Detection limits and accuracies for the analysis of PHB by methanolysis/SPME/GC-FID and hydrolysis/SPME/GC-FID

	Methanolysis	Hydrolysis
Detection limits		
MDL ^a (mg L ⁻¹)	53	1.6
MQL ^b (mg L ⁻¹)	175	5.5
Accuracies		
Actual concentration, [PHB] (mg L ⁻¹)	216.3	36.67
Concentration found ^c , [PHB] (mg L ⁻¹)	216.5 ± 17.55	35.95 ± 0.55
Recovery ^d (%)	100	98
RSD ^e (%)	8	2

^a Limits of detection were calculated using the equation, MDL = 3σ, where σ is the standard deviation of 10 measurements of low-concentration spikes.

^b Limits of quantification were calculated using the equation, MQL = 10σ.

^c Concentration is given as the mean ± SD based on seven measurements.

^d Percent recoveries is used as a measure of accuracy.

^e Percent relative standard deviation is given as a measure of precision.

Table 3
Determination of PHB in samples of PHB-cell mass using three different methods

Sample	Percent of PHB in dry cells ± SD of triplicate analyses (n = 3)		
	Brauneegg's method	Methanolysis/SPME/GC-FID	Hydrolysis/SPME/GC-FID
A	13.20 ± 0.44	12.77 ± 0.12	13.11 ± 1.57
B	24.47 ± 2.71	24.87 ± 1.40	23.74 ± 2.73
C	61.75 ± 2.75	60.21 ± 3.49	61.55 ± 3.34

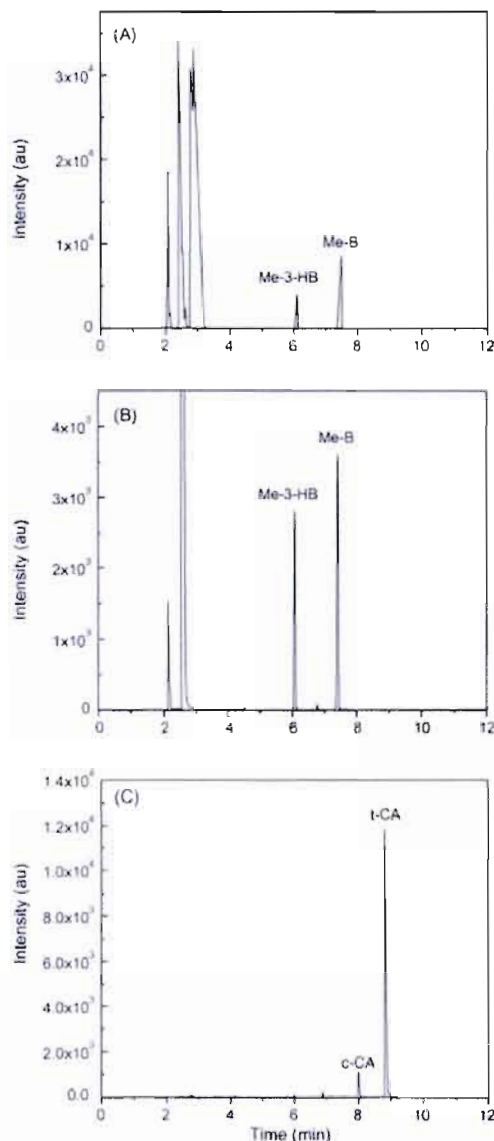


Fig. 6. Typical GC-FID chromatograms of (A) a chloroform extract obtained after methanolysis of PHB-CM; (B) a DVB/CAR/PDMS SPME fiber exposed to the acid methanolic solution after methanolysis of PHB-CM; (C) a DVB/CAR/PDMS fiber exposed to the H_2SO_4 -NaOH solution after hydrolysis of PHB-CM.

Whether extraction was performed with chloroform or with the solid adsorbent (DVB/CAR/PDMS), clean chromatograms were obtained (Fig. 6) indicative of the prevalence of PHB as hydrolysable material in the microbial cells. SPME-implicating methods gave results of similar accuracy as Braunneg's method, so that quantitatively, the three methods were more or less equivalent. However, compared to the method initially devel-

oped by Braunneg the two SPME methods involve much less time and manual operations. Methanolysis samples can be analyzed directly just by displacing the vial from the heating block to the SPME autosampler, while hydrolysis samples only require opening the vials, adding NaOH and recapping the vials before analysis by SPME. Those are very simple and fast operations compared to the fastidious solvent extraction. In addition, the two new methods present the advantage of avoiding using the unwanted chlorinated solvent that is chloroform.

Copolyesters such as poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) are currently gaining interest due to their physical and mechanical properties that are more appropriate for medical and pharmaceutical applications. Preliminary tests showed that methyl 3-hydroxypentanoate resulting from the methanolic digestion of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) could also be analyzed by SPME/GC-FID thus demonstrating the applicability of the method to other biopolymers.

4. Conclusion

The present study demonstrated that SPME which is generally a method of choice for the analysis of analytes in aqueous media can also be applied to pure alcoholic solutions or concentrated acid solutions. The two depolymerization/SPME/GC-FID methods developed were applied to the analysis of PHB in microbial cells. Results were in excellent agreement with those obtained using methanolysis in chloroform but the SPME-based methods are less harmful for the environment and less time consuming. In addition, the fibers could be used more than 500 times under harsh conditions thus making the methods very promising for routine analysis of biopolymers in microbial cells.

Acknowledgements

The authors acknowledge Stéphane Deschamps and Chantale Beaulieu for technical assistance.

References

- [1] C. Scholz, in: C. Scholz, R.A. Gross (Eds.), *Polymers from Renewable Resources. Biopolyesters and Biocatalysts*, American Chemical Society/Oxford University Press, Washington, DC, 2000, p. 328.
- [2] U. Edlund, A.-C. Albertsson, in: A.-C. Albertsson (Ed.), *Degradable Aliphatic Polyesters (Advances in Polymer Science)*, vol. 157, Springer, Berlin, 2002, p. 67.
- [3] M. Lemoigne, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8 (1926) 770.
- [4] R.-R. Jüttner, R.M. Lafferty, H.-J. Knackmuss, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1 (1975) 233.
- [5] J.H. Law, R.A. Slepecky, *J. Bacteriol.* 82 (1961) 33.
- [6] G. Braunneg, B. Sonnleitner, R.M. Lafferty, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1978) 29.
- [7] V. Riis, W. Mai, *J. Chromatogr.* 445 (1988) 285.
- [8] G.N.M. Huijbers, H. van der Wal, C. Wilkinson, G. Eggink, *Biotechnol. Technol.* 8 (1994) 187.
- [9] S. Jan, C. Roblot, G. Goethals, J. Courtois, B. Courtois, J.E.N. Saucedo, J.P. Séguin, J.N. Barbotin, *Anal. Biochem.* 225 (1995) 258.

- [10] D.B. Karr, J.K. Waters, D.W. Emerich, *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1983) 1339.
- [11] R.P.X. Hesselmann, T. Fleischmann, R. Hany, A.J.B. Zehnder, *J. Microbiol. Methods* 35 (1999) 111.
- [12] J. Pawliszyn, S. Pedersen-Bjergaard, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 291.
- [13] J. Yu, D. Plackett, L.X.L. Chen, *Polym. Degrad. Stab.* 89 (2005) 289.
- [14] *Tests Methods SW-846, Part 1: Quality Control*, US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste, Washington, DC, 1992 (Chapter 1).

5.2 Article 2. « *Rapid microwave assisted esterification method for the analysis of poly-3-hydroxybutyrate in *Alcaligenes latus* by gas chromatography* »

Ce travail a été fait sous l'encadrement de mon directeur, Dr Huu Van Tra, professeur du département de chimie de l'UQÀM et mon codirecteur, Dr Jalal Hawari chercheur principal et chef du groupe chimie analytique et environnementale à l'IRB-CNRC. Cet article est le résultat de mon travail, avec la collaboration de Dr Abdesslem Yezza et MSc Annamaria Halasz, chercheurs dans le laboratoire de Dr Jalal Hawari. Ma contribution pour cet article concerne la participation à la conception du projet, la planification et réalisation des travaux expérimentaux, l'optimisation des méthodes d'analyse, développement des nouvelles applications et la rédaction des rapports servant à la rédaction finale des articles.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Chromatography A, 1154 (2007) 473–476

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY Awww.elsevier.com/locate/chroma

Short communication

Rapid microwave assisted esterification method for the analysis of poly-3-hydroxybutyrate in *Alcaligenes latus* by gas chromatography

Aimesther Betancourt^{a,b}, Abdessalem Yezza^a, Annamaria Halasz^a,
Huu Van Tra^b, Jalal Hawari^{a,*}

^a Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montréal (Québec) H4P 2R2, Canada

^b Chemistry Department, Université du Québec à Montréal, Case Postale 8888, succ. Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3P8, Canada

Received 12 February 2007; received in revised form 5 April 2007; accepted 10 April 2007

Available online 19 April 2007

Abstract

In the present study, we used microwave energy instead of conventional heating to transform poly-3-hydroxybutyrate (PHB) into methyl 3-hydroxybutyrate (Me-3HB) in acidified methanol (H₂SO₄, 10%, v/v) mixture in less than 4 min at 10% microwave power. The microwave assisted method was then applied to analyze PHB produced by *Alcaligenes latus*. The PHB content in the biomass determined using microwave heating was comparable to the amount found by conventional heating. Moreover, the new esterification method was at least 50 times faster than the conventional method, affording a significant saving of time and energy.

© 2007 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Microwave heating; Poly-3-hydroxybutyrate; Esterification; Methyl 3-hydroxybutyrate; *Alcaligenes latus*

1. Introduction

Poly-3-hydroxybutyrate (PHB), the simplest and most commonly known poly-3-hydroxyalkanoate (PHA), is gaining attention as a substitute for petroleum-derived plastic because of its competing thermoplastic properties with recalcitrant polymers derived from fossil fuel and above all because of its biodegradability [1]. PHAs are produced by several microorganisms, such as *Alcaligenes latus* as intracellular energy and carbon storage materials. PHA granules are accumulated under unbalanced growth (nitrogen, phosphorous, sulfur, or magnesium limitation) or balanced growth (without limitation) conditions and in the presence of excess carbon source [2].

Presently, biomass is analyzed for its PHB content according to the widespread method developed by Braunege et al. [3]. The method involves hydrolysis and subsequent methanolysis of lyophilized PHB containing biomass followed by gas chromatography analysis of the 3-hydroxybutyric acid methyl ester (Me-3HB) produced. However, this method is time consuming and requires more than 3 h of heating in a dry block heater.

Several researchers attempted to improve Braunege method [3] by changing the acid concentration and the dry-biomass weight [4,5] or by changing the acid and the derivatizing agent [6] using the conventional heating method.

Recently, microwave technology has received considerable attention as a green process for sample extraction and preparation in analytical chemistry [7–10]. The major advantage of the microwave digestion technique is its high heating efficiency which allows the occurrence of rapid breakdown of the sample matrix [11]. In the present study, a microwave digestion method was developed for the analysis of PHB in bacterial biomass obtained after fermentation of *A. latus* in sucrose. The effect of several variables, such as heating time, microwave power, and acid concentration on the methanolysis of PHB was investigated to quantify the biopolymer in the microbial biomass. To our knowledge, the use of microwave heating for PHB esterification has not been reported before.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Methyl(5)-3-hydroxybutyrate (Me-3HB)

* Corresponding author. Tel.: +1 514 496 6267; fax: +1 514 496 6265.
E-mail address: jalal.hawari@nrc.ca (J. Hawari).

(99%), and benzoic acid (99.5%) were purchased from Sigma–Aldrich (Oakville, Canada). Chloroform (CHCl_3 , stabilized in 0.75% ethanol/certified ACS) was from Fisher Chemical (Nepean, Canada), and methanol (CH_3OH , HPLC grade) was obtained from J.T. Baker Chemicals (Phillipsburg, NJ, USA). Concentrated sulfuric acid (H_2SO_4 , 95–98%) was acquired from Anachemia (Montreal, Canada). Deionized water was obtained by passing water through Milli-QUV plus (Millipore) system.

2.2. Production of PHB by *A. latus*

PHB was produced by *A. latus* (ATCC 29714) using sucrose as sole carbon source as described by Grothe et al. [12]. Aliquots of fermentation broth (5–10 mL) were centrifuged and the precipitated biomass was washed twice with distilled water to remove residual culture medium, frozen and then lyophilized prior to methanolysis of PHB for subsequent GC analysis.

2.3. PHB esterification

2.3.1. Conventional heating

Pure PHB reference material (20 mg) was treated with a 2 mL $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (3% or 10%, v/v) solution in 150 mm \times 20 mm screw-cap Kimax tubes. Chloroform (2 mL) was added to the resulting mixture and then spiked with benzoic acid to serve as an internal standard. The tubes were sealed tightly and heated in a block heater at 100 °C for 3.5 h [3]. Samples were homogenized periodically at 1 h intervals for 1–2 min. Bacterial biomass containing PHB was lyophilized and treated with acidified methanol under conditions similar to the ones described for the PHB standards.

2.3.2. Microwave heating

A Sharp Carousel, Model R-430CSC, microwave oven (1.5 kW, 1100 W output, 2.45 GHz) was used for the esterification of PHB. A PHB sample (20 mg) was first esterified in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (3% or 10%, v/v) solution in 150 mm \times 20 mm screw-cap Kimax tubes. Samples were heated for several minutes (1–6 min) with occasional shaking every 1 min using a power ranging between 10 and 30%. The reaction mixture was brought to room temperature and treated with chloroform (2 mL) and 1 mL of water. The mixture was vigorously shaken every 1 min. The organic phase was separated and analyzed for methyl 3-hydroxybutyrate (Me-3HB) by gas chromatography. Lyophilized bacterial biomass was subjected to microwave irradiation in acidified methanol (3% or 10%, v/v, H_2SO_4) under conditions similar to the ones described above for PHB standard.

2.4. GC-flame ionization detection (FID)

Me-3HB was quantified by a gas chromatograph (Agilent 6890 GC-FID; Agilent Technologies Inc., Wilmington, USA) equipped with a capillary column SPB-1 (15 m \times 530 μm , 0.15 μm , Agilent J&W GC Columns) connected to an FID system. The injector and detector temperatures were set at 265 and 275 °C, respectively. The oven temperature was set at 50 °C for

Table 1
Methyl 3-hydroxybutyrate (Me-3HB) obtained at different microwave irradiation time and power from 20 mg pure PHB sample

Parameters		Me-3HB mean \pm SD (mg)
Power (%)	Time (min)	
10	2	Incomplete reaction
	3	7.6 \pm 0.972
	4	12.6 \pm 0.114
	5	11.8 \pm 0.644
	6	Sample degradation
20	1	Incomplete reaction
	2	10.8 \pm 0.036
	2.5	12.4 \pm 0.102
	3	12.4 \pm 0.284
	4	Sample degradation
30	1	Sample degradation

Each value is the average of three measurements.

5 min and then increased at a rate of 30 °C/min until 270 °C. A split injector (3:1) and He carrier gas (7.1 mL/min) were used.

3. Results and discussion

Table 1 summarizes the amount of Me-3HB as recovered in the chloroform phase after methanolysis of PHB (20 mg) at different time intervals and microwave power. Generated Me-3HB was quantified using a reference standard material of Me-3HB. Fig. 1 represents GC chromatograms of Me-3HB produced after treatment of pure PHB and biomass containing PHB with acidified methanol (10%, v/v, of H_2SO_4) using a microwave heater at 10% of power for 4 min (Fig. 1(A and C)) and 30% of power for 2 min (Fig. 1(B)). We found that 4 min irradiation at 10% power

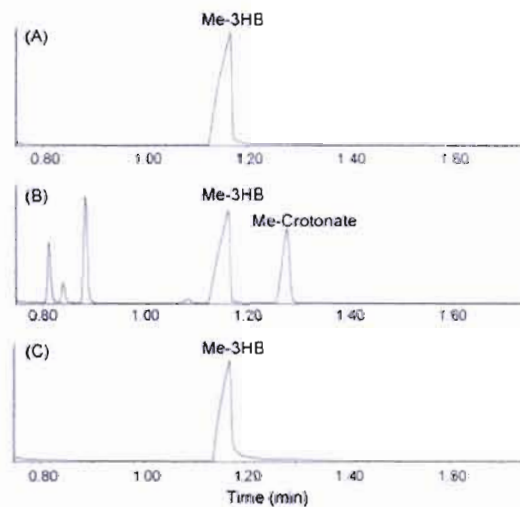


Fig. 1. GC-FID chromatograms of the methyl 3-hydroxybutyrate (1.17 min) produced during treatment of PHB with acidified methanol (10%, v/v, H_2SO_4) using microwave oven: (A) PHB standard at 10% of power, 4 min, (B) PHB standard at 30% of power, 2 min, (C) PHB in biomass at 10% of power, 4 min.

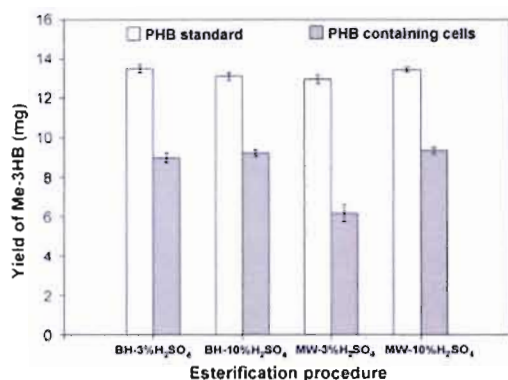


Fig. 2. Me-3HB amount quantified in PHB standard and PHB contained in *A. latus* after esterification in block heater (BH) for 3.5 h and microwave (MW) for 4 min and 10% power at 3 and 10% sulfuric acid concentration.

gave the highest Me-3HB amount (12.6 mg), representing 56% of the theoretical yield (Table 1; Fig. 1(A)). The lower yield of Me-3HB was attributed to the partition of the chemical between the organic phase and water [13]. Below 2 min, methanolysis was incomplete and prolonged irradiation to 6 min lead to the transformation of Me-3HB to Me-crotonate (Table 1; Fig. 1(B)) [6].

Fig. 2 shows the amounts of Me-3HB obtained from pure PHB and from *A. latus* biomass after being subjected to microwave irradiation (10% power, 4 min) or heated in a heater block (100 °C, 3.5 h) in acidified methanol (3 and 10%, v/v, H₂SO₄). The two tested acidified methanol (3 and 10%, v/v, H₂SO₄) solutions did not reveal any major difference in the amount (9 mg) of Me-3HB produced using conventional heating, but recovered amount increased from 6 to 9 mg, respectively, by changing the acid concentration from 3 to 10% (v/v) using microwave. Lower recovery of Me-3HB obtained at 3% (v/v) H₂SO₄ was partially attributed to incomplete rupture of cell membrane and thus reduced efficiency of PHB depolymerization and methylation.

We found that microwave assisted depolymerization/methylation of PHB was 50 times faster than that of conventional heating. According to Gedye et al. [9], microwave irradiation produces efficient internal heating due to direct coupling of microwave energy with polar molecules, such as methanol leading to a temperature increase in the system. Such increase in temperature drastically depends on the dielectric properties of the medium [14]. Since chloroform is bound to decrease the dielectric properties of the reaction mixture we thus modified the process by adding chloroform at the end of esterification so that the microwave efficiency will not be affected.

After optimizing the microwave conditions for the methanolysis of PHB standards we applied the method for the analysis of *A. latus* containing PHB. Fig. 1(C) shows GC chromatogram of Me-3HB obtained after esterification of PHB from biomass in acidified methanol (10%, v/v, H₂SO₄) during 4 min irradiation at 10% microwave power. The PHB content (% w/w,

Table 2

PHB content in *A. latus* biomass after PHB esterification in conventional block heater and microwave heating

	Conventional heating		Microwave heating
	In chloroform	Without chloroform	Without chloroform
PHB content (% w/w)	61.73	60.64	61.49
SD (%) ^a	4.49	3.86	2.44
RSD (%)	7.27	6.37	3.96

^a Standard deviation of five measurements.

dry biomass) obtained in bacterial biomass from both the conventional heating method and the microwave-based method are given in Table 2. PHB content in biomass was quantified using PHB reference standard material to reduce the bias created by the partition of Me-3HB between the organic and aqueous phases [13] and benzoic acid as internal standard. We found that the presence and absence of CHCl₃ has no effect on the measured amounts of PHB in biomass using the block heater method (Table 2), indicating that the solvent is not needed in the esterification step as previously reported [3]. Regardless of the heating method, similar PHB content (61.49%, w/w, biomass) were obtained, thus confirming that the new microwave assisted esterification method was suitable for PHB quantification. The new microwave method affords a significant saving of time and energy. For example, in block heater the energy consumed for the esterification step is about 5800 kJ, however in microwave oven, the energy consumed does not exceed 360 kJ, which means an energy saving of 94%.

4. Conclusion

Use of microwave oven instead of block heater for PHB esterification proved to be rapid, quantitative and a competitive method. The PHB content produced by *A. latus* measured after 4 min microwave treatment was comparable to that obtained by conventional esterification using a dry block heater for 3.5 h. The developed microwave method for PHB esterification may find utility as an alternative to the currently available protocol [3].

Acknowledgements

The authors are thankful to Ms. Chantale Beaulieu for her technical assistance and Dr. Fanny Monteil-Rivera for proof reading the revised manuscript.

References

- [1] G. Braunneg, R. Bona, M. Koller, *Polym-Plastics Technol. Eng.* 43 (2004) 1779.
- [2] S.Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 1.
- [3] G. Braunneg, B. Sonnleiner, R.M. Lafferty, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1978) 29.
- [4] R.G. Lageveen, G.W. Huisman, H. Preunping, P. Ketelaar, C. Eggink, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 2924.
- [5] G.N.M. Huijbens, H. Van der Wal, C. Wilkinson, G. Eggink, *Biotechnol. Lett.* 8 (1994) 187.

- [6] V. Riis, W. Mal, *J. Chromatogr.* 445 (1988) 285.
- [7] K. Srogi, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1261.
- [8] C.O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 6250.
- [9] R.N. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. All, L. Baldisera, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 279.
- [10] R.N. Gedye, W. Rank, K.C. Westaway, *Can. J. Chem.* 69 (1991) 706.
- [11] K.J. Lamble, S.J. Hill, *Analyst* 123 (1998) 103.
- [12] R. Grothe, M. Moo-Young, Y. Chisti, *Enzyme Microb. Technol.* 25 (1999) 132.
- [13] S. Jan, C. Roblot, G. Goethals, J. Courtols, B. Courtois, J.E. Nava Saucedo, J.-P. Seguin, J.-N. Barbotin, *Anal. Biochem.* 225 (1995) 258.
- [14] B.L. Hayes, *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, CEM Publishing, Matthews, NC, 2002.

5.3 Résultats non publiés

Les résultats qui ont été obtenus dans le cadre de ce mémoire lors des études faites en vue de développer une nouvelle méthode de dosage des PHA, notamment le PHB, et qui n'ont pas été publiés, sont présentés dans cette section.

5.3.1 Méthanolyse acide du poly(3-hydroxybutyrate) microbien (PHB). Couplage micro-ondes-HS/SPME-GC/FID

5.3.1.1 Micro-ondes - GC/FID

La dérivation par méthanolyse acide des échantillons du PHB accumulé dans les cellules d'*Alcaligenes latus* a été effectuée en utilisant le chauffage classique et le chauffage par micro-ondes (MO). Dans les deux approches les esters méthyliques dérivés ont été récupérés dans le chloroforme et analysés par chromatographie gazeuse. Les chromatogrammes ainsi obtenus sont montrés dans la figure 5.1, où Me3HB et MeAB sont, respectivement, les esters dérivés de l'acide 3-hydroxybutyrique (3HB) et de l'acide benzoïque (AB), ce dernier étant utilisé comme standard interne. La mise au point de cette méthode est exposée dans l'art. 2.

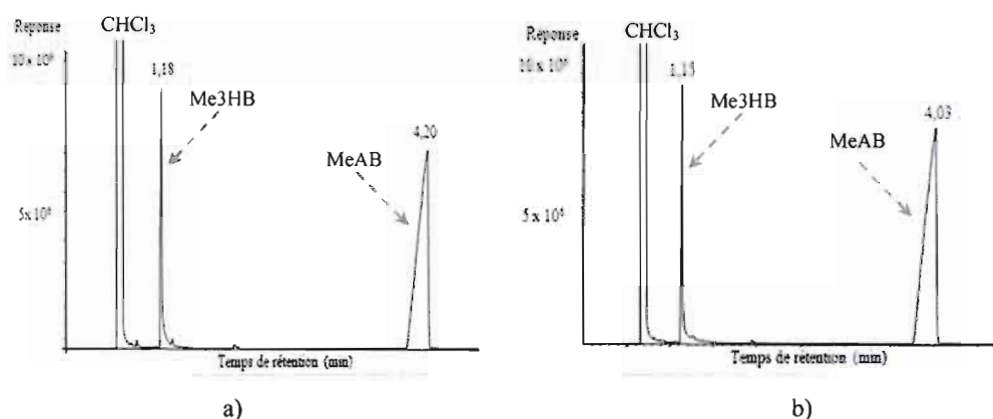


Figure 5.1 Méthanolyse acide (H_2SO_4 10 % v/v et AB 8 g L^{-1}) d'une biomasse contenant environ 60 % de PHB ; a) chauffage classique (3 h à $100 \text{ }^\circ\text{C}$), b) chauffage par MO (4 min à 110 W). Analyse par GC, colonne capillaire SPB-1, détecteur FID. Injecteur split (3 : 1), volume d'injection $1 \text{ } \mu\text{L}$.

5.3.1.2 HS/SPME - GC/FID

Le tableau suivant reprend quelques paramètres publiés dans l'article 1 (sect. 5.1) et qui ont été pris en compte comme coefficients de mérite pour évaluer la performance de l'approche HS/SPME-GC/FID suivie de la dérivation par méthanolyse acide. La mise en place de cette méthode, les résultats de l'optimisation et la validation sont exposés dans cet article.

Tableau 5.1 Performance de la méthode Méthanolyse/SPME (mode *headspace*) - GC/FID pour l'analyse du PHB dans les cellules d'*A. latus*. SPME à 40 °C (fibre : DVB/CAR/PDMS).

Limites de la méthode (à T d'extraction = 40 °C)		
	LOD ^a	53 mg L ⁻¹
	LOQ ^b	175 mg L ⁻¹
	LRL ^c	15000 mg L ⁻¹
Fiabilité		
PHB-étalons	conc. réelle	216,3 mg L ⁻¹
	conc. trouvée ^d	216 ± 18 mg L ⁻¹
	Er ^e	0,1 %
	CV ^f	8,1 %
PHB-biomasse	conc. trouvée ^g	2900 ± 50 mg L ⁻¹
	CV ^h	1,7 %

a,b: $LOD = 3 \times S$ et $LOQ = 10 \times S$ sont la limite de détection et de quantification de la méthode, S étant l'écart type des dix réponses consécutives de la solution dont la concentration du soluté est la plus basse; c: LRL (limite du domaine de réponse linéaire), selon la droite d'étalonnage; d: concentration moyenne ± écart-type de 7 mesures d'un étalon de PHB; e : erreur relative comme mesure d'exactitude, $Er (\%) = 100 \times (\text{conc. moy. trouvée} - \text{conc. réelle} / \text{conc. réelle})$; f: coefficient de variation comme mesure de la précision, $CV (\%) = 100 \times (\text{écart-type} / \text{conc. moyenne trouvée})$, concentration moyenne trouvée de 7 mesures d'un étalon de PHB; g: concentration moyenne ± écart-type de 10 mesures d'un échantillon de biomasse; h: coefficient de variation de l'analyse de biomasse, nombre de mesures égal à 10.

5.3.1.3 Micro-ondes - HS/SPME - GC/FID. Développement de la méthode

La figure 5.2 montre des chromatogrammes type, obtenus lorsque les produits dérivés sont extraits directement du milieu réactionnel, dans l'espace de tête (*headspace*), par SPME (HS/SPME) et analysés par GC/FID. La SPME a été réalisée sous les conditions préalablement optimisées (article 1). La dérivatisation a été effectuée par méthanolyse dans un bloc chauffant (HS/SPME-GC/FID) (fig. 5.2 a) et dans un four aux micro-ondes (MO-HS/SPME-GC/FID) (fig. 5.2 b). L'étalonnage et la validation de cette approche est abordée dans cette section.

Les tableaux 5.2 et 5.3 renvoient les résultats plus importants, obtenus lors de l'évaluation de la performance et la validation du couplage micro-ondes – HS/SPME et le dosage par GC/FID, ainsi que la comparaison avec les autres approches utilisées pour l'analyse du poly(3-hydroxybutyrate) après la dérivatisation par méthanolyse acide. Le tableau 5.2 montre la matrice décrivant la droite obtenue par la régression linéaire lors de l'étalonnage interne par la méthode MO-HS/SPME-GC/FID, et dans laquelle se trouvent les statistiques de régression supplémentaires renvoyées par la fonction « DROITEREG » du logiciel EXCEL.

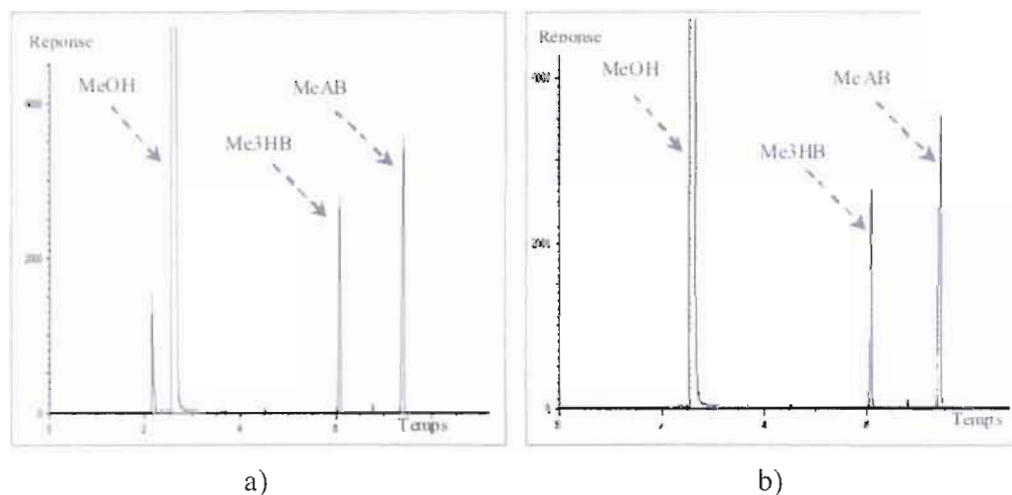


Figure 5.2 Méthanolyse acide (H_2SO_4 10 % v/v et AB 1 g L^{-1}) d'une biomasse contenant environ 60 % de PHB ; a) chauffage classique (3 h à $100 \text{ }^\circ\text{C}$), b) chauffage par MO (4 min à 110 W). HS/SPME sur une fibre DVB/CAR/PDMS. Analyse par GC, colonne capillaire DB-WAXetr avec détecteur FID

Tableau 5.2 Statistiques de régression supplémentaires de la méthode MO-HS/SPME-GC/FID.

<i>m</i>	0,0472	<i>b</i>	0,0066
<i>se_m</i>	0,0006	<i>se_b</i>	0,0055
R²	0,9993	<i>se_y</i>	0,0084
<i>F</i>	5410	<i>d_f</i>	4

Dans le tableau 5.2, *m* est la pente de la droite d'étalonnage interne (rapport du signal Me3HB/MeAB vs concentration de PHB (g L⁻¹)), *b* est l'ordonnée à l'origine, *se_m* est la valeur d'erreur type correspondant à *m*, *se_b* est la valeur d'erreur type correspondant à la constante *b* (ordonnée à l'origine), R² est le coefficient de détermination, *se_y* est l'erreur type pour la valeur *y* estimée, *F* est la statistique *F* observée et *d_f* les degrés de liberté utilisés pour obtenir la valeur critique (*F_c*).

Le test de validation de la méthode MO-HS/SPME-GC/FID a été réalisé à partir de la quantification d'une biomasse dont l'analyse quantitative avait déjà été faite en utilisant les différentes approches étudiées, y compris la méthode de référence (méthanolyse 3 h à 100 °C et analyse par GC), et qui ont été décrites dans les articles 1 et 2. Ces résultats ont été repris dans le tableau 5.3 pour les comparer à la nouvelle approche. Ce tableau montre aussi les équations de l'étalonnage interne et des statistiques de la régression des droites, obtenues par la méthode des moindres carrés. Pour la quantification du PHB dans la biomasse, le poids du PHB en fonction du poids sec de la biomasse est exprimé en pourcentage. La validation des différentes approches étudiées est présentée dans le tableau 5.3.

Le tableau 5.4 donne les valeurs critiques *F_c* en fonction de la certitude, $\alpha = 0,05$ et $\alpha = 0,01$ (degré de confiance de 95 % et 99 % respectivement) et du nombre de degrés de liberté (désignés dans la plupart des tables sous les abréviations ν_1 et ν_2) calculés comme suit : $\nu_1 = k$ et $\nu_2 = n - (k + 1)$, où *k* est le nombre de variables de l'analyse de régression et *n* est le nombre d'observations.

Tableau 5.3 Méthanolyse acide de la biomasse et analyse du PHB par les différentes approches.

Méthode	Paramètres d'étalonnage (étalonnage interne)	PHB dans la biomasse ± écart-type (%w/w) (n = 3)
GC/FID	$y = 0,0195 (\pm 0,0002) x - 0,0009$ $(\pm 0,003) R^2 = 0,999; F = 6774 (n = 6)$	62 ± 2
MO-GC/FID	$y = 0,0198 (\pm 0,0002) x - 0,012 (\pm 0,003)$ $R^2 = 0,999; F = 7583 (n = 9)$	62 ± 3
HS/SPME-GC/FID	$y = 0,0467 (\pm 0,0006) x + 0,010$ $(\pm 0,004) R^2 = 0,999; F = 6678 (n = 7)$	61 ± 3
MO-HS/SPME- GC/FID	$y = 0,0472 (\pm 0,0006) x + 0,007$ $(\pm 0,005) R^2 = 0,999; F = 5410 (n = 6)$	62 ± 2

n : le nombre d'observations; R^2 : le coefficient de détermination; F : La statistique F ou valeur F observée. Les statistiques R^2 et F , ainsi que les valeurs d'erreur type correspondant à la pente (s_{em}) et à l'ordonnée à l'origine (s_{eb}), ont été obtenues à partir de la matrice décrivant la droite et qui est renvoyée par la fonction « DROITEREG » du logiciel EXCEL.

Tableau 5.4 Valeur critiques de F (F_c), en fonction de la certitude (α) et du nombre de degrés de liberté (v).

n	v_2	α	$F_c (v_1 = 1)$
6	4	0,05	7,71
		0,01	21,2
7	5	0,05	6,61
		0,01	16,3
9	7	0,05	5,59
		0,01	12,2

F : Tiré de: D. W. Stockburger. *Introduction to Statistics: Concepts, Models, and Applications*, 1996. v_2 : le degré de liberté (ou « df » dans EXCEL), utilisé pour trouver les valeurs critiques de la statistique F , a été renvoyé par la fonction « DROITEREG » pour déterminer le niveau de confiance du modèle.

5.3.2 Hydrolyse alcaline et acide du PHB microbien

La figure ci-dessous illustre les produits issus de l'hydrolyse alcaline du PHB avec NaOH 4 M (le *cis* et le *trans*-acide crotonique (AC) et l'acide 3-hydroxybutyrique) et de l'hydrolyse acide avec de l'acide sulfurique 98 % v/v (le *cis* et le *trans*-AC) et qui ont été analysés par HPLC/UV.

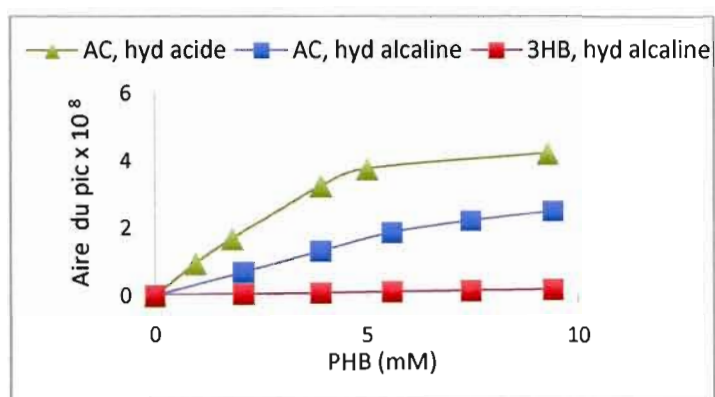


Figure 5.3 Séparation et analyse par HPLC/UV des produits dérivés de l'hydrolyse alcaline et acide du PHB. L'hydrolyse a été complétée après 4 h dans un bloc chauffant à 70 °C.

5.3.2.1 Hydrolyse alcaline – HPLC/UV

Pour évaluer si la masse ou la concentration de PHB en solution a un effet sur le rapport AC/3HB, des poids différents de PHB ont été prélevés et après l'hydrolyse les volumes de solution ont été choisis pour différentes concentrations. Le tableau 5.5 donne le rapport AC/3HB obtenu à 70 °C, en fonction de la quantité de PHB hydrolysé et de sa concentration molaire.

Le graphique 5.4 montre les droites d'étalonnage du PHB, exprimé par l'acide crotonique (*cis* et *trans*-AC) et par l'acide 3-hydroxybutyrique (3HB) issus de l'hydrolyse alcaline, établies par la méthode des moindres carrés. Ces courbes ont été construites en utilisant les solutions figurant dans le tableau 5.5.

Tableau 5.5 Rapport AC/3HB en fonction du poids et de la concentration molaire de PHB.
Hydrolyse alcaline, 4 h à T = 70 °C.

Échantillon	PHB (mg)	Vol. sol. (mL)	PHB (mM)*	AC/3HB
PHB-1	2,2	25	1,02	0,54
PHB-2	5,0	25	2,32	0,55
PHB-3	8,0	25	3,72	0,54
PHB-4	10,0	50	2,32	0,56
PHB-5	10,1	100	1,17	0,55
PHB-6	10,0	200	0,58	0,55

* poids moléculaire de l'unité monomérique du PHB = 86,09 mg mol⁻¹

Les paramètres de la régression (figure 5.4) pour la droite de l'AC sont: $m = 0,34 \text{ mM}^{-1}$, $R^2 = 0,9995$ et $F = 9452$ et pour la droite du 3HB : $m = 0,19 \text{ mM}^{-1}$, $R^2 = 0,9998$ et $F = 30\,741$.

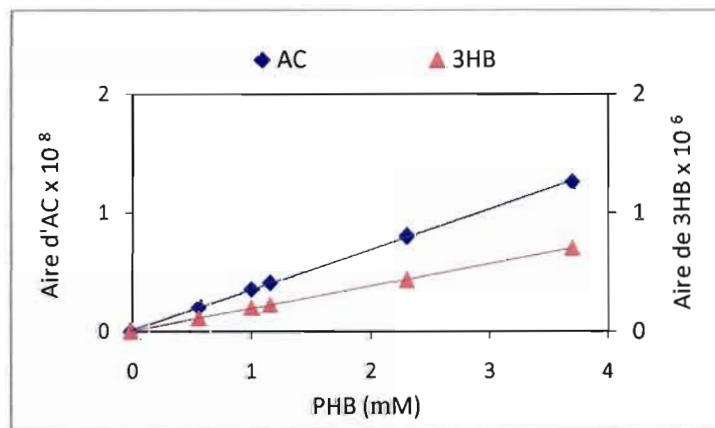


Figure 5.4 Courbes d'étalonnage pour le dosage du PHB à partir de l'AC et du 3HB issus de l'hydrolyse alcaline, analyse par HPLC/UV.

5.3.2.2 Hydrolyse alcaline – HS/SPME – GC/FID

La SPME a été effectuée après l'hydrolyse en milieu alcalin, selon les conditions optimisées pour la SPME de l'AC dérivé de l'hydrolyse acide. Ces résultats sont donnés dans la figure suivante.

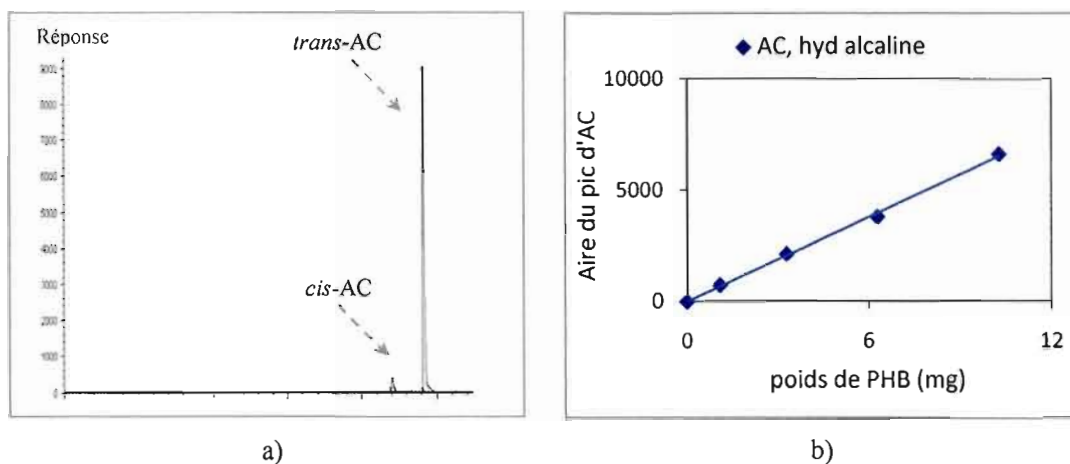


Figure 5.5 a) Chromatogramme type de l'analyse HS/SPME – GC/FID après l'hydrolyse alcaline; b) étalonnage du PHB exprimé par l'acide crotonique qui en découle.

5.3.2.3 Hydrolyse acide - HPLC/UV

L'étude de l'hydrolyse en milieu acide avec des solutions contenant 10, 50 et 98 % v/v d'acide sulfurique donne les résultats fournis dans la figure 5.6 a). L'effet du temps de réaction à $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, a d'ailleurs été étudié (figure 5.6 b). Les pourcentages de récupération de chaque produit, l'acide crotonique total (*cis* + *trans*-AC) et l'acide 3-hydroxybutyrique ont été exprimés en pourcentage molaire : $100 \times (\text{mM AC}/\text{mM PHB})$ et $100 \times (\text{mM 3HB}/\text{mM PHB})$.

Pour l'étude de l'effet de la température sur l'évolution des concentrations de l'acide crotonique (*cis* + *trans*-AC), des étalons de PHB ont été hydrolysés dans l'acide sulfurique concentré pendant 4 h. Les réactions ont été réalisées en triplicata à des températures de 25, 70 et $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figure 5.7 a).

Le profil de formation d'acide crotonique en fonction du temps de réaction, a été également vérifié. L'hydrolyse a été effectuée dans le H_2SO_4 (98 % v/v) à 100 °C, les solutions ont été chauffées pendant 30 min, 1, 2, 3 et 4 heures (fig. 5.7 b). Dans les graphiques de la figure 5.7, l'acide crotonique total (*cis* + *trans*-AC) a été exprimé en pourcentage molaire : $100 \times (\text{mM AC}/\text{mM PHB})$.

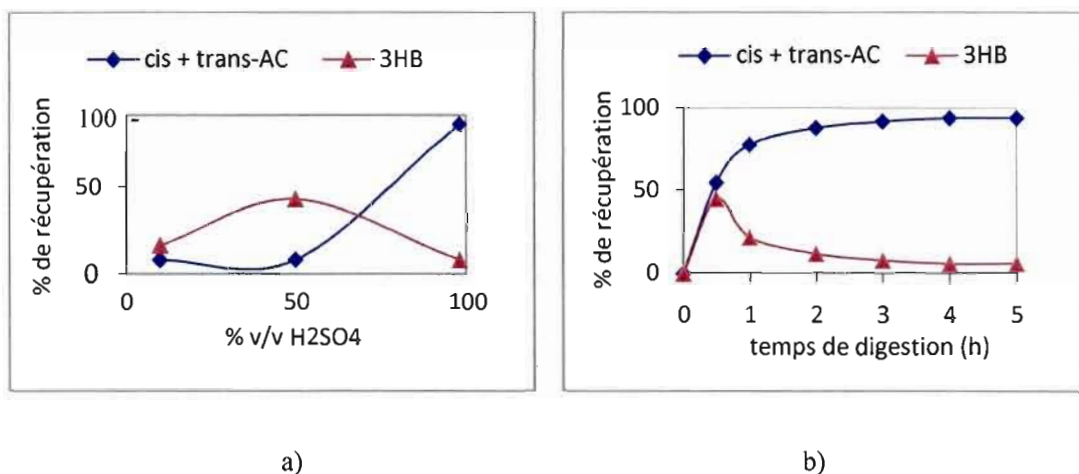


Figure 5.6 Récupération de l'AC et du 3HB obtenus par l'hydrolyse acide du PHB à 70 °C; a) en fonction de la concentration d'acide sulfurique ($t = 4$ h) et b) en fonction du temps de digestion (98 % v/v H_2SO_4).

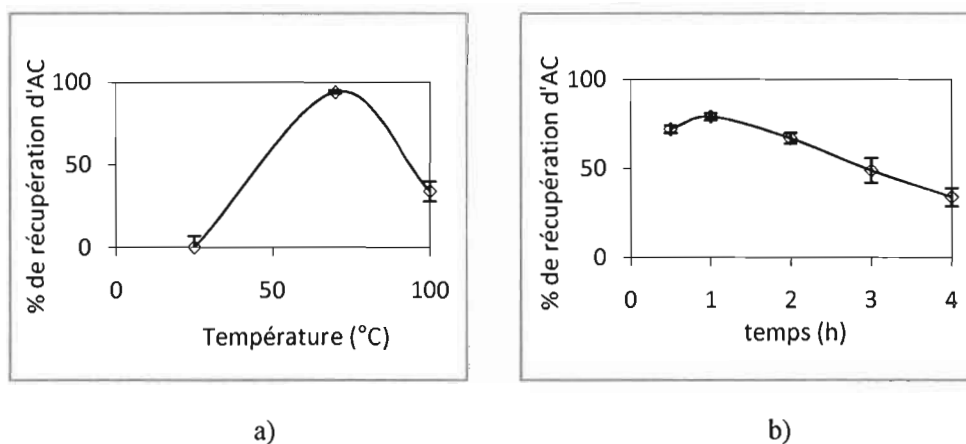


Figure 5.7 Représentation graphique des % de récupération d'acide crotonique; a) hydrolyse acide (H_2SO_4 98 % v/v), 4 h à différentes températures, b) effet du temps de réaction sur l'hydrolyse du PHB à 100 °C. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences ($n = 3$).

DEUXIÈME PARTIE

EXTRACTION ET RÉCUPÉRATION DU PBH INTRACELULAIRE

5.4 Extraction du PHB accumulé dans l'*Alcaligenes latus*

Des échantillons d'une biomasse provenant d'*Alcaligenes latus* et renfermant entre 60 ± 2 % de PHB (mg de PHB/mg de biomasse sèche) ont été traités différemment en vue de récupérer le PHB intracellulaire. L'extraction classique (EC) a été assistée par sonication (EAS) et par micro-ondes (EAM). La lyse enzymatique des cellules (LE) avec la kitalase a par ailleurs été utilisée comme méthode alternative à l'extraction avec du chloroforme. Toutes les extractions ont été faites en triplicata et avec un même lot de biomasse préalablement broyée. Pour les extractions avec du chloroforme, ils ont été prélevés environ 20 mg et pour la lyse 80 mg. Après extraction, récupération et purification, le PHB a été quantifié par GC/FID selon la procédure classique.

5.4.1 Extraction solide-liquide, méthode classique

La figure 5.8 résume les résultats de l'extraction avec le chloroforme. Les extractions à 5 et 30 minutes ont été menées à 50 °C, dans un bloc chauffant, avec trois périodes d'agitation d'une minute chaque. Les échantillons, dont le temps de contact était 24 et 48 heures, ont été laissés sous la hotte à la température ambiante et agités au Vortex trois fois.

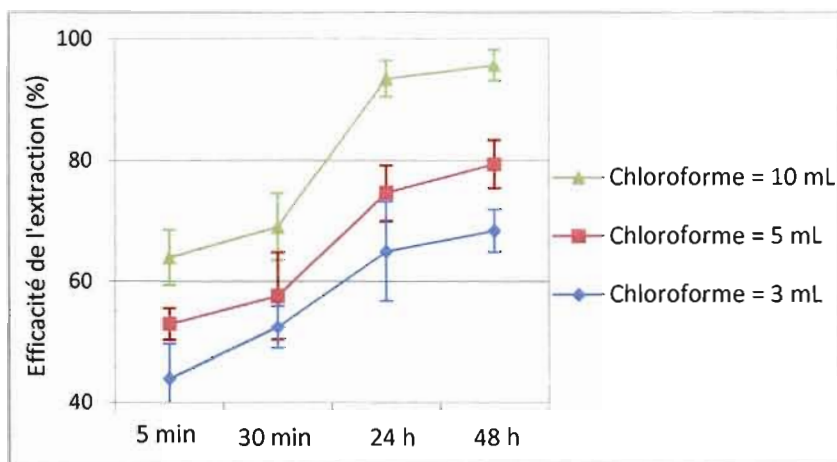


Figure 5.8 Efficacité de l'extraction de PHB par EC. Pour les échantillos traités durant 5 et 30 min, $T = 50$ °C, pour ceux traités pendant 24 et 48 h, $T \approx 25$ °C. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences ($n = 3$).

5.4.2 Extraction assistée par micro-ondes

Pour cette étude les échantillons ont été exposés pendant 4, 5 et 10 minutes, à des puissances de micro-ondes (P_{MO}) de 10, 20, 30 et 40 % de la puissance maximale ($P_{max} = 1100 \text{ W}$), avec 3 mL de solvant. La température après 10 min d'irradiation et $P_{MO} = 40 \%$ (440 W) a été de $50 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

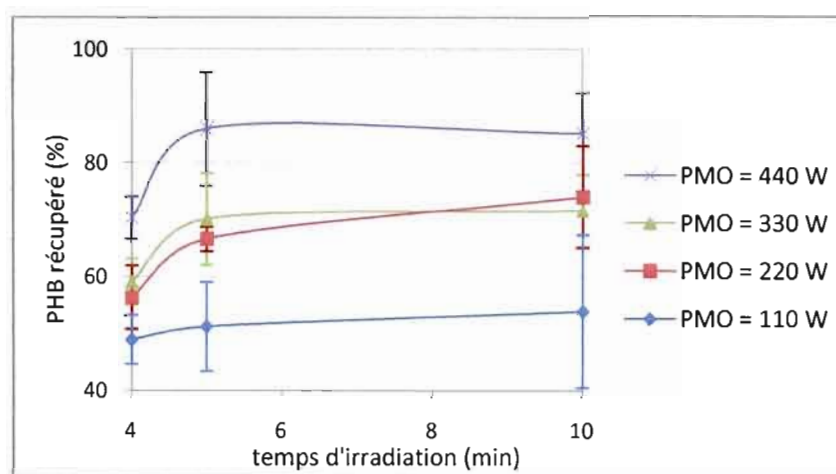


Figure 5.9 Efficacité de l'extraction de PHB par EAM, $T = 50 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences ($n = 3$).

5.4.3 Extraction assistée par sonication

La sonication a été envisagée pour casser les parois des cellules et libérer les granules de PHB de la matrice cellulaire et ainsi faciliter la solubilisation du PHB dans le chloroforme. Pour tous les échantillons le temps de contact solide-liquide a été égal à 30 minutes. Le graphique 5.10 représente les taux de récupération de PHB en fonction de la stratégie suivie.

Les conditions suivantes ont été utilisées :

- 1) « 5 min » : 5 min de sonication plus 25 min de repos
- 2) « 15 min (3 x 5 min) » : 15 min de sonication distribuées en 5 min de sonication et 5 min de repos, trois fois
- 3) « 30 min » : 30 minutes de sonication continue

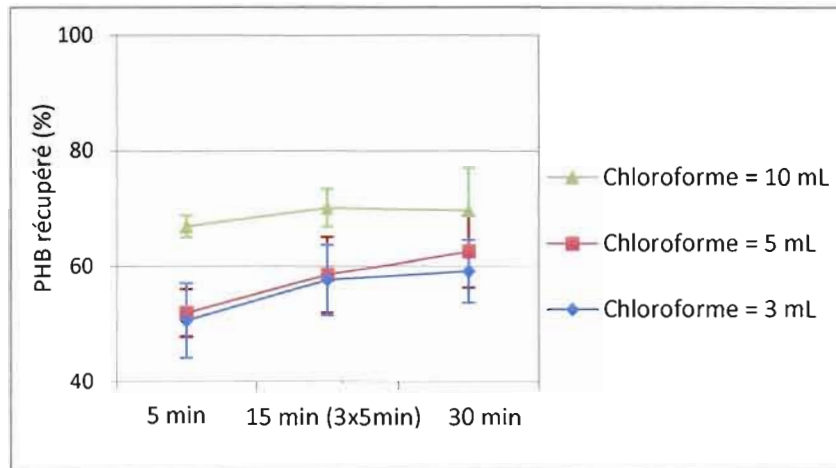


Figure 5.10 Efficacité de l'extraction de PHB par EAS, T = 50 °C. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences (n = 3).

La reproductibilité de l'EAS a été testée. Dans cette étude A et B représentent deux échantillons identiques avec 3 mL de chloroforme. La sonication a été effectuée à 50 °C pendant 5 min. La position des tubes dans le râtelier, dans le bain, est indiquée par les cercles noirs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de poids de PHB/poids de biomasse sèche.

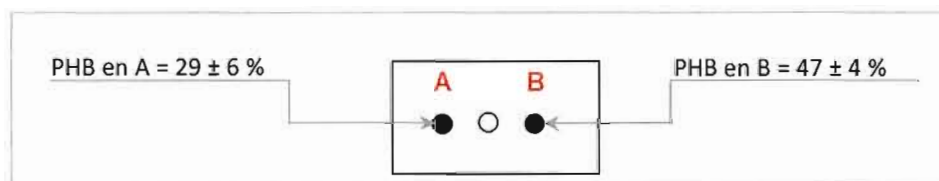


Figure 5.11 Test de reproductibilité dans le bain ultra-sons « Aquasonic » 150D. PHB (%), pourcentage récupération de PHB \pm l'écart type de trois expériences (n = 3).

5.4.4 Extraction du PHB par lyse enzymatique

La lyse enzymatique a été effectuée sur des échantillons de biomasse d'environ 80 mg, renfermant 62 % de PHB (mg de PHB/mg de biomasse sèche). La lyse a été poursuivie durant une heure à 50 °C.

Pour évaluer l'efficacité de cette méthode comme voie d'extraction du PHB intracellulaire, ils ont été introduits des témoins servant à évaluer les différentes étapes suivies.

Dans le but de déterminer les pertes de produit liées aux étapes de centrifugation et de filtration, il a été évalué le taux de récupération en utilisant des étalons témoins de PHB pur « PHB-LCF ». Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 5.6.

Des échantillons de biomasse ont également été utilisés comme de témoins pour évaluer le PHB récupéré, mais qui ne peut être expliqué par la lyse elle-même (tableau 5.7).

Tableau 5.6 Taux de récupération de PHB, obtenu à partir des étalons témoins (PHB commercial).

Échantillon	Quantité (mg)		Taux de récupération ^b (%)
	prélevée	trouvée ^a	
PHB-LCF-1	10,4	5,9	56
PHB-LCF-2	10,1	5,4	54
PHB-LCF-3	10,2	5,5	54
moyenne ± écart-type			55 ± 1

PHB-LCF : des échantillons de PHB pur qui ont été utilisés comme des témoins et qui ont suivi toutes les étapes : extraction par lyse enzymatique, purification par centrifugation et préparation de l'échantillon (dilution dans le chloroforme et filtration). Cette dernière est utilisée pour séparer le PHB extrait des cellules non lysées, en utilisant le chloroforme, étape nécessaire pour la préparation de l'échantillon avant de réaliser la méthanolyse acide précédant l'analyse GC/FID.

a : valeur trouvée lors de l'analyse et l'étalonnage par GC/FID.

b : taux de récupération, ce quotient permettra d'évaluer l'efficacité de la lyse enzymatique avec la kitalase comme technique de extraction du PHB.

Tableau 5.7 Quantité de PHB retrouvée dans les échantillons de biomasse lors des analyses par GC et qui ne provient pas de la lyse enzymatique.

Échantillon	Poids de biomasse (mg)	Masse de PHB expérimentale ^a (mg)
B-1	79,9	10,5
B-2	80,8	11,1
B-3	80,9	11,3
moyenne ± écart-type		11,0 ± 0,4

B: échantillons de biomasse qui n'ont pas été lysés et qui ont été utilisés comme contrôles de toutes les étapes, permettant ainsi d'évaluer la quantité de PHB apportée par les cycles de centrifugation et par la préparation des échantillons pour l'analyse GC, impliquant cette dernière, la dilution des échantillons dans le CHCl₃ et la séparation par filtration.

a : valeur trouvée lors de l'analyse et l'étalonnage par GC/FID après et la récupération du PHB dans le chloroforme, suivie de la méthanolyse acide.

Le tableau 5.8 montre les quantités de PHB récupéré à partir des échantillons de biomasse lysés. Pour évaluer uniquement l'efficacité de la lyse enzymatique comme méthode de récupération du PHB, les valeurs obtenues lors de l'analyse quantitative ont été affectées par les valeurs obtenues à partir des témoins (données aux tableaux 5.6 et 5.7).

Tableau 5.8 Efficacité de la lyse enzymatique avec de la kytalase comme méthode d'extraction du PHB accumulé dans les cellules d'*A. latus*.

Échantillon	Poids de biomasse (mg)	Masse de PHB (mg)			Efficacité d'extraction ^d (%)
		théorique ^a	expérimentale ^b	corrigée ^c	
BL-1	80,3	49,8	32,3	39,0	78
BL-2	80,5	49,9	30,4	35,5	71
BL-3	80,4	49,8	31,3	37,2	75
moyenne ± écart-type					75 ± 4

a : la masse théorique est la teneur de PHB dans la biomasse exprimée en mg, ex. : pour l'échantillon de biomasse BL-1, masse théorique = 80,3 x 0,62 = 49,8 mg

b : valeur trouvée lors de l'analyse et l'étalonnage par GC/FID après la lyse de la biomasse et la récupération du PHB dans le chloroforme, suivie de la méthanolyse acide.

c : valeur calculée tenant compte des témoins, ex. : pour l'échantillon de biomasse BL-1, masse corrigée = 100 x (32,3 - 11,0 / 55) = 39,0 mg

d : efficacité de l'extraction (ex. : pour BL-1), Efficacité = 100 x 39,0/(49,8) = 78 %

Dans l'histogramme suivant sont comparées les différentes méthodes d'extraction étudiées, l'extraction par solvant (EC, EAS, EAM) et en milieu aqueux par la lyse enzymatique :

- EC effectuée à température ambiante, 48 heures de contact et 10 mL de chloroforme.
- EC, EAS, EAM à $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, temps de contact solide – liquide de 5 min et la moindre quantité de chloroforme utilisée, 3 mL.
- LE, récupération en milieu aqueux par la lyse enzymatique, une heure de digestion à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

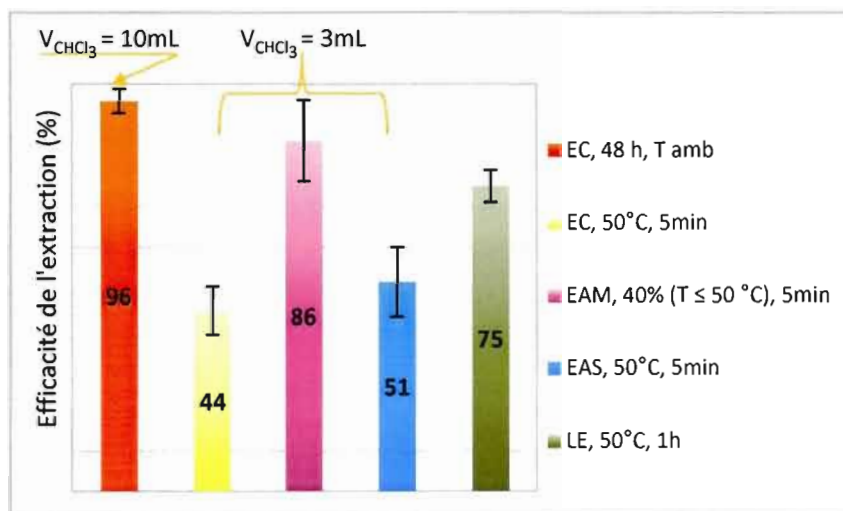


Figure 5.12 Comparaison de l'efficacité d'extraction de PHB selon l'approche utilisée. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois expériences ($n = 3$).

CHAPITRE VI

DISCUSSION

Une première étude de ce travail a été publiée et a montré que le couplage HS/SPME-GC/FID permettait d'analyser les PHA intracellulaire, avec des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), largement inférieures aux concentrations du biopolymère retrouvées dans les biomasses. Selon la société *Monsanto Chemical*, la production de polyesters bactériens ne serait pas commercialement viable tant que la teneur en PHA n'atteint pas 20 % (mg de PHA/mg de biomasse sèche) (AAC, 2003). Ceci correspond à une concentration de 2000 mg L⁻¹ (20 mg de biomasse sèche dans 2 mL de méthanol acidifié) ou 4000 mg L⁻¹ (20 mg de biomasse sèche dans 1 mL de méthanol acidifié), alors que la limite de quantification par méthanolyse acide et HS/SPME-GC/FID est de 175 mg L⁻¹ (tab. 5.1). La HS/SPME a été appliquée directement après la réaction de dérivation. En utilisant la méthanolyse comme méthode de dérivation, aucune manipulation supplémentaire n'était nécessaire.

Dans cette étude, la SPME/GC/FID a été aussi utilisée après l'hydrolyse acide. La mise en place de cette méthode d'extraction a demandé un travail analytique important dont les résultats de l'optimisation sont exposés dans l'article 1.

Une deuxième étude a prouvé expérimentalement que l'irradiation par micro-ondes des échantillons, aussi appelée chauffage diélectrique, permettait la dépolymérisation quantitative du biopolymère par méthanolyse acide. Les principaux résultats sont présentés dans la figure 5.1 et le tableau 5.3. L'optimisation et la validation de cette approche sont exposées dans une deuxième publication (voir article 2). Le recours au chauffage par micro-ondes a permis de réduire 50 fois le temps de digestion.

Après la réaction, les échantillons ont été préparés par extraction liquide-liquide avec le chloroforme, pour la chromatographie gazeuse, tel que décrit dans les articles 1 et 2. Cependant, la méthode pourrait encore être simplifiée et le temps d'analyse raccourci si, avant l'analyse GC/FID, l'ester méthylique dérivé (Me3HB) était extrait du milieu réactionnel par micro-extraction en phase solide.

6.1 Couplage micro-ondes-HS/SPME-GC/FID

6.1.1 Dérivatisation par méthanolyse

Dans la figure 5.2 et le tableau 5.3, ils sont comparés les résultats obtenus lors de la dérivation du PHB intracellulaire par méthanolyse acide, en utilisant le chauffage conventionnel et le chauffage par micro-ondes. Cette fois ci, au lieu de l'extraction liquide-liquide classiquement utilisée, il a été employé la micro-extraction en phase solide, en mode *headspace* (HS/SPME), comme technique de préparation de l'échantillon.

Le couplage micro-ondes, HS/SPME et GC/FID a été utilisé en suivant les conditions préalablement optimisées pour la HS/SPME et pour la méthanolyse assistée par micro-ondes présentées dans les articles 1 et 2 respectivement.

Neuf étalons de PHB ont été utilisés pour préparer la courbe d'étalonnage, par la méthode de l'étalon interne, avec de l'acide benzoïque (AB) 1 g L^{-1} comme étalon interne. Trois échantillons de biomasse ont ensuite été utilisés pour la validation de la méthode. Les résultats obtenus ont été résumés dans les tableaux 5.2 et 5.3 et comparés avec les autres approches étudiées au long de ce projet (tableau 5.3).

Il est à mentionner que pour les analyses impliquant la HS/SPME, la quantité d'AB comme étalon interne fut réajustée, de 8 g L^{-1} à 1 g L^{-1} , afin de favoriser l'adsorption du Me3HB sur la fibre SPME. Il avait été constaté qu'à des concentrations d'AB de 8 g L^{-1} , l'adsorption du benzoate de méthyle empêchait celle du méthyl-3-hydroxybutyrate.

La figure C.4 montre les chromatogrammes résultants de la méthanolyse de 10 mg de PHB, en utilisant des concentrations de 8 g L⁻¹ et de 1 g L⁻¹.

Les paramètres de la régression de la droite d'étalonnage ont été obtenus à partir de la matrice décrivant la droite et qui est renvoyée par la fonction « DROITEREG » du logiciel EXCEL. Tel qu'il a été montré dans le tableau 5.2, R² est égal à 0,999 et la valeur *F* observée nettement supérieure aux valeurs critiques (tableau 5.5). Il y a donc une relation significative entre la variable indépendante (concentration du PHB) et la variable dépendante (réponse du détecteur). De plus, les valeurs R² et *F* se trouvent dans le même ordre de grandeur que celles des autres approches, incluant la méthode classique, utilisée comme méthode de référence (tableau 5.3).

La teneur en PHB de trois échantillons d'un même stock de biomasse a été calculée en utilisant l'équation des moindres carrés obtenue par ajustement de la courbe d'étalonnage, de la méthode MO-HS/SPME-GC/FID. La valeur trouvée, 62 ± 2 %, correspond avec celles observées lors du dosage par les autres méthodes. Mais, au lieu des 6 heures approximativement requises pour l'analyse quantitative selon la méthode « classique » de dosage, la MO-HS/SPME-GC/FID permet la quantification du PHB dans les cellules en moins d'une heure.

Outre le PHB, la méthanolyse acide du copolymère P(3HB-co-3HV) est aussi faisable dans un four aux micro-ondes. C'est ce qui apparaît sur le chromatogramme obtenu par irradiation du copolymère à 110 W durant 5 min, illustré sur la figure C.7 et semblable à celui obtenu par les méthodes GC/FID, injection directe, et HS/SPME-GC/FID. Les conditions optimales d'irradiation n'ont cependant pas été déterminées pour le cas du copolymère. Les résultats préliminaires indiquent que la réaction complète d'estérification nécessite plus d'énergie que celle de l'estérification du PHB. Après 5 min à 110 W, de petites particules solides apparaissent encore en suspension, indiquant la présence de copolymère intact. Ceci pourrait être la conséquence de leur granulométrie. Tandis que le PHB commercial se présente comme une poudre très fine, le P(3HB-co-3HV) commercial est constitué de cailloux très durs difficiles à broyer.

6.1.2 Dérivatisation par hydrolyse

6.1.2.1 Hydrolyse en milieu acide

Lors de la réaction d'hydrolyse impliquant l'acide sulfurique concentré, le PHB dont la température de fusion est d'environ 180 °C, fond et brûle en quelques secondes sous l'irradiation aux micro-ondes à 110 W (limite inférieure de puissance du four micro-ondes utilisé dans ce travail). Comme déjà expliqué (section 2.6.1), l'acide sulfurique absorbe très fortement l'énergie micro-onde et la température de réaction s'élève à plus de 300 °C dans un temps très court.

Des études faites par chauffage conventionnel avec de l'acide sulfurique concentré ont montré que la formation d'acide crotonique dépendait d'une façon importante de la température (figure 5.7). À des valeurs de 100 °C dans l'acide sulfurique concentré la quantité d'acide crotonique était considérablement réduite, probablement dû à la formation de produits secondaires tel que le crotonate (Yu et *al.*, 2005) ou le *trans*-acide crotonique sulfoné (Amat et *al.*, 1987).

Sur plusieurs des chromatogrammes obtenus par HPLC/UV après l'hydrolyse dans l'H₂SO₄ (98 % v/v) à 25 et 100 °C, les pics des isomères *cis* et *trans*-acide crotonique, situés à 42,7 min et 47,4 min respectivement, étaient très larges, déformés, et/ou non résolus à la base, en plus d'autres pics non identifiés.

L'hydrolyse acide a aussi été étudiée avec des solutions diluées d'acide sulfurique en utilisant une plaque chauffante. La présence d'eau favorise la formation d'acide 3-hydroxybutyrique (figure 5.6a). Or l'acide 3-hydroxybutyrique ne présente qu'une faible absorption à 210 nm lors de l'analyse par HPLC/UV (voir figure 5.3 et le chromatogramme de la figure C.9). De plus, étant non volatil et fort dépendant du pH et de la température, qui entraînent la formation de la lactone de l'acide 3-hydroxybutyrique (β -butyrolactone) la SPME et l'analyse par GC s'avèrent inefficaces. Pour toutes ces raisons, il n'a pas été envisagé l'hydrolyse acide avec des solutions diluées d'acide sulfurique sous les MO.

6.1.2.2 Hydrolyse en milieu alcalin

Les expériences réalisées en milieu alcalin (NaOH 4 M, 4 h à 70 °C) ont montré qu'il y a de la formation de 3HB, *cis*-AC et *trans*-AC comme dans l'hydrolyse acide avec de l'acide sulfurique dilué, mais à différence de cette dernière, les chromatogrammes sont très clairs (figure C.9). Aussi, la quantité des produits formés est linéairement proportionnelle à la quantité de PHB hydrolysé (figures 5.4 et 5.5b). Toutefois, tel qu'il a été illustré à la figure 5.3, moins d'AC se produit lors de l'hydrolyse avec le NaOH, ce qui peut éventuellement nuire à la détection et la quantification des analytes. La figure 5.5a illustre le chromatogramme obtenu par HS/SPME-GC/FID d'une solution issue de l'hydrolyse alcaline du PHB par chauffage conventionnel et dans lequel les pics correspondants aux *cis* et *trans*-acide crotonique sont clairement identifiables.

L'hydrolyse alcaline a aussi été effectuée sous irradiation aux micro-ondes. Environ 10 mg de PHB ont été mélangés avec une solution de NaOH (4 M) et soumis à 4 min d'irradiation avec une puissance de 110 W. La solution résultante était transparente, en apparence égale à celle obtenue lors de l'hydrolyse alcaline par chauffage conventionnel. La micro-extraction en phase solide a été effectuée après le refroidissement de la solution et l'ajout d'acide pour abaisser le pH, les conditions opératoires sont les mêmes que celles appliquées après l'hydrolyse acide (décrites dans l'article 1).

L'analyse par GC/FID a donné le même profil chromatographique (figure C.11) que celui obtenu lors de la digestion en utilisant un bloc chauffant (figure 5.5a). Or l'acide crotonique ainsi obtenu pourrait servir pour le dosage du PHB.

Il est toutefois à noter que ceci est seulement possible dans un four micro-onde monomode, avec contrôle de la température. Selon les auteurs (Yu et *al.*, 2005), lors de la formation parallèle du 3HB et de l'AC dérivés de l'hydrolyse en milieu basique (figure 6.1), le rapport k_1/k_2 , dépend de la température.

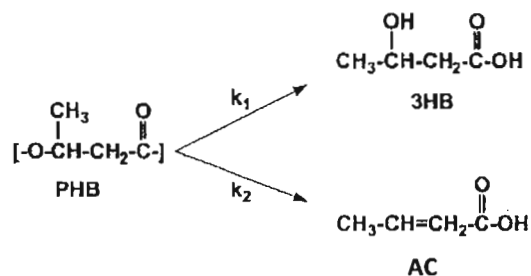


Figure 6.1 Formation parallèle d'acide 3-hydroxybutyrique (3HB) et d'acide crotonique (AC) à partir de l'hydrolyse alcaline du PHB, proposée par Yu et al., (2005).

Dans ce projet la variation du poids ou de la concentration de PHB, tout en maintenant constante les conditions de la réaction, ne semble pas affecter ce rapport de façon significative (voir tableau 5.5). De plus, les courbes de calibration, soit lors de l'analyse par HPLC/UV, soit par l'analyse HS/SPME-GC/FID, sont linéairement dépendantes de la quantité de PHB en solution (figures 5.4 et 5.5b).

6.2 Extraction par solvants

La transformation de la biomasse en bioplastique se heurte à des problèmes de qualité des produits finis. Ces difficultés sont en grande partie liées aux méthodes d'extraction produisant la dégradation du poids moléculaire des biopolymères et qui provoquent l'altération des propriétés en tant que plastiques. En général, l'extraction par solvants organiques à basses températures et la lyse enzymatique sont parmi les techniques qui dégradent le moins le polymère.

L'extraction du PHB avec le chloroforme, complétée par la précipitation sélective dans le méthanol a été une technique très utilisée pour la récupération des polyhydroxyalcanoates. À basses températures, il est possible d'obtenir des rendements raisonnables du produit, sans pratiquement aucune dégradation significative. À cet effet, la méthode d'extraction nécessite de grandes quantités de solvants et/ou implique des temps d'extraction considérables.

Dans la présente étude, diverses techniques ont été appliquées à l'extraction de PHB des échantillons d'une biomasse provenant d'*A. latus*. Afin de réduire la consommation de chloroforme, l'extraction classique (EC) a été assistée par sonication (EAS) et par micro-ondes (EAM).

Comme méthode alternative à l'extraction par solvant, il a été étudié la lyse enzymatique des cellules (LE) avec la kitalase, une préparation enzymatique obtenue de la *Rhizoctonia solani*.

6.2.1 Extraction assistée par micro-ondes

La figure 5.12 met en évidence l'efficacité du chauffage aux micro-ondes. La quantité de PHB extrait en utilisant l'énergie aux micro-ondes, de $86 \pm 10 \%$, a presque doublé celle recouvrée par la méthode classique ($44 \pm 6 \%$), dans un même intervalle de temps et avec la même quantité de solvant (3 mL de chloroforme). Il est à noter qu'à température ambiante, l'extraction quasi complète ($96 \pm 3\%$) n'a été possible qu'après 48 heures, et ceci en utilisant un volume de chloroforme de 10 mL et trois tours d'agitation d'une minute chacun.

Cette augmentation du rendement d'extraction sous l'effet des micro-ondes ne peut pas être expliquée par une élévation de la température puisque, après 10 min à $P_{MO} = 40 \%$ (440 W), la température finale de la suspension était de $50 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. La réponse se trouve plutôt sur le mécanisme d'extraction lui-même. Inversement à l'extraction par solvant conventionnelle, la force motrice de l'extraction n'est pas contrôlée par la diffusion du soluté en vue de son expulsion à la surface de la biomasse. Le chauffage très rapide de l'eau résiduelle qui est présente dans la biomasse entraîne une augmentation aussi rapide de la pression à l'intérieur des cellules de la matière. Cela mène à une inversion du gradient de température, illustré dans la figure 3.1, et à une amélioration du transfert de la masse sous l'effet de la pression des matières solubles à l'extérieur de la biomasse. Dans bien des cas, la pression interne s'élève de façon suffisamment élevée pour faire exploser la paroi de la cellule, ce qui entraîne l'expulsion du contenu qui sera dissous dans le solvant environnant (Foragen, 2001).

En général, les taux de récupération en utilisant l'EAM ont été très variables (écarts allant de 4 à 13 %). Il est à signaler que ces extractions ont été menées dans un four micro-ondes domestique en utilisant le plateau tournant. La variabilité des résultats peut s'expliquer par l'hétérogénéité du champ à l'intérieur du four. Pour obtenir des résultats reproductibles tous les paramètres doivent être soigneusement contrôlés.

Les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats sont regroupés dans la figure 5.9. Pour optimiser la consigne en puissance des micro-ondes, celle-ci a été variée de 110 à 440 W à des temps de réaction de 4, 5 et 10 min, tout autre paramètre restant constant. Les résultats montrent une forte augmentation des rendements entre 4 et 5 minutes d'irradiation, puis une stabilisation notamment aux puissances de 220, 330 et 440 W, probablement parce que le solvant est déjà saturé. Étant donné les conditions de l'extraction surtout que la pression à l'intérieur des tubes ne pouvait être contrôlée, des volumes supérieurs à 3 mL n'ont pas été étudiés.

6.2.2 Extraction assistée par sonication

L'onde ultrasonore est une onde de même nature qu'une onde acoustique, par opposition aux micro-ondes (MO) ou aux ondes hautes fréquences (HF) qui ont une nature similaire aux ondes radios. Les ultra-sons de forte intensité, par la cavitation, induisent des effets mécaniques et chimiques permettant de casser des cellules animales ou végétales. La lyse cellulaire se produit à des fréquences entre 20 – 40 kHz (Costes, 2004). La rupture de la membrane plasmique et l'accélération de la diffusion au travers de membranes, conduisant à la libération du contenu cellulaire, est une pratique couramment utilisée dans les laboratoires.

L'extraction assistée par sonication a été utilisée afin de faciliter la séparation du PHB du reste de la biomasse (lyse par ultrasons). Ce procédé visait la lyse par ultrasons de cellules et la dilution du PHB dans le chloroforme entourant. Le principe consiste à utiliser un bain à ultrasons rempli d'eau qui baigne la partie inférieure des tubes contenant les échantillons à lyser. Les échantillons ont été soumis à un champ ultrasonore, pendant une durée de 5, 15 et 30 minutes.

Pour l'étude de différentes combinaisons de paramètres pendant l'extraction, les échantillons ont été placés dans un panier grillagé adapté à la cuve et isolé du fond de la cuve, dans des tubes en verre pour que les ultrasons soient réfléchis avec un maximum d'efficacité. Pour appliquer les ultrasons, le tube a été situé au milieu du bain.

Comme pour toute propagation d'ondes vibratoires, la température et la viscosité sont des facteurs incidents. Pour ces expériences le bain a été donc préchauffé à 50 °C. Et bien que la température d'opération ait été fixée à cette valeur, elle était mesurée, en utilisant un thermomètre, après chaque série de pulsations. Des variations de température pouvant atteindre 4 °C ont été observées.

D'autres inconvénients existent qui peuvent compromettre la reproductibilité des résultats. Il est à signaler par exemple, la puissance acoustique, qui n'est pas équivalente dans toutes les zones du récipient recevant le bain pour la sonication. Ceci est dû à la construction même des bains à ultrasons qui comportent, sous la cuve, un ou plusieurs transducteurs. Or le champ ultrasonore rayonne par l'intermédiaire d'un transducteur, ce qui n'est pas homogène dans l'espace. Par conséquent, le degré de lyse des micro-organismes est hétérogène d'un échantillon à l'autre, et n'est pas contrôlable (Colin et *al.*, 2000). A cet effet, la cavitation a été mesurée dans différents points dans le bain. Sur une échelle de 0 à 100, des variations de 50 à 90 ± 10 CAVIN ont été observées. Cela pourrait expliquer les différences observées au début des expériences (voir figure 5.11). La cavitation dépendait aussi du nombre de tubes dans le bain, ce pourquoi toutes les extractions ont été effectuées en plaçant un tube à la fois au milieu du bain. Toutefois, le balayage de fréquence « *sweeping* » uniformise et répartit d'une façon plus homogène la cavitation pour augmenter l'efficacité des processus.

La figure 5.10 montre les résultats obtenus lors de l'extraction assistée par la sonication, en appliquant des ultrasons à balayage de fréquence de 38,5 à 40,5 kHz et une puissance de 135 W. Il est d'abord à mentionner que les meilleurs résultats obtenus dans cette expérience, 70 ± 6 % PHB, ont été réussis avec 10 mL de chloroforme et 15 min de sonication (5 min trois fois et 5 min de repos entre chaque pulsation) et il n'a été possible ni de les égaler en diminuant la quantité de solvant à 3 et 5 mL, ni de les améliorer en prolongeant le temps de sonication à 30 min (figure 5.10). Ces résultats sont d'ailleurs analogues à ceux obtenus par Feliu et

Villaverde (1994) lors de l'extraction de la β -galactosidase contenue dans *E. coli*. par sonication à 100 W et une fréquence de 20 kHz, en utilisant des volumes de solvant (chloroforme-SDS) de 10 et 15 mL (Feliu et Villaverde, 1994). Dans leur travail, les auteurs ont récupéré 70 % du produit intracellulaire dans un premier contact solide-liquide en sonicant 5 fois pendant 3 min (temps de sonication total 15 min), avec 3 min de repos entre chaque séance de sonication.

Finalement, et tel qu'il peut être constaté dans les la figures 5.8 et 5.10, les taux de récupération obtenus par EAS à 50 °C avec 10 mL de solvant et 30 min de contact (15 sonication + 15 repos) sont assez proches de ceux observés en utilisant l'extraction classique à 50 °C, 10 mL de solvant, 30 min de contact et trois minutes d'agitation au Vortex.

6.2.3 La lyse enzymatique

Cette étude a été réalisée afin de déterminer la capacité de l'enzyme lytique de la *Rhizoctonia solani* à rompre la membrane externe chez *Alcaligenes latus*. Cette enzyme a été choisie car sa production à l'échelle commerciale (*a priori* identifiée *R. solani*) est tout à fait réalisable (Kobayashi et al., 1982). Les conditions de digestion utilisées, pH \approx 5 et T = 50 °C, ont été celles rapportées pour la lyse des cellules de *Kluyveromyces fragilis* (Belem et Lee, 1998) par une enzyme produite par *Cytophaga*. Cette dernière avait déjà permis la lyse et le relargage du PHB accumulé dans *A. eutrophus* (Harrison et al., 1991b). Les résultats présentés dans le tableau 5.8 ont montré que la lyse enzymatique avec la kitalase est réalisable, toutefois, il reste à définir les conditions optimales de lyse ainsi que le temps nécessaire pour atteindre le rendement maximal.

Il est aussi important à signaler que la lyse enzymatique avec la kitalase, a été possible sans prétraitement de la biomasse (avec de l'EDTA, des détergents, etc.). À cet égard, il est à noter que la nature de la kitalase, comme celle d'autres enzymes lytiques d'origine microbienne, lui confère une activité de plusieurs enzymes dont essentiellement de la β -(1-3)-glucanase, de la pectinase et de l'amylase (Sigma-Aldrich). Ce cocktail permet de rompre la

membrane externe chez les bactéries gram-négatives, telles *Alcaligenes* et d'atteindre la membrane plasmique, à l'intérieur de laquelle se trouve le PHB (Harrison et *al.*, 1991b).

L'examen du tableau 5.6 permet de constater que des pertes d'environ 45 % de PHB (équivalente à un taux de récupération de 55 %) se sont produites lors de l'étape de récupération et purification, ce qui a entraîné un abaissement du rendement.

D'abord, la centrifugation à 3720 *g* s'est révélée inefficace, souvent, le culot instable se remettant en suspension. Comme déjà vu, des vitesses de centrifugation de l'ordre de 10 000 *g* et plus sont souvent nécessaires, notamment si le PHB produit possède une masse volumique très proche de celle de l'eau (de Koning et Witholt, 1997).

La filtration a été utilisée comme méthode de séparation du PHB dissout dans le chloroforme des éventuelles cellules non lysées. Ceci a été nécessaire pour évaluer la quantité de PHB récupérée lors de la digestion (lyse). La lyse a été effectuée en utilisant 80 mg de biomasse, engendrant ainsi une quantité de matière cellulaire telle que l'efficacité de la filtration a été compromise.

CONCLUSIONS

Ce projet a visé l'utilisation des procédés « verts » pour l'extraction et quantification de biopolymères notamment du poly3-hydroxybutyrate (PHB). D'abord, ils ont été développées plusieurs approches pour la quantification du PHB dans la biomasse, impliquant le chauffage par micro-ondes (MO) et la micro-extraction en phase solide (SPME). Plus tard, l'utilisation de la sonication, l'extraction assistée par MO et la lyse enzymatique ont été utilisées dans le but d'extraire le biopolymère de la biomasse.

La SPME a été utilisée comme méthode de préparation des échantillons avant les analyses par chromatographie gazeuse (GC). Dans le cas de la méthanolyse, outre les manipulations de base pour recouvrer l'ester méthylique de l'acide 3-hydroxybutyrique à être analysé, le chloroforme, solvant toxique et polluant, a pu être éliminé de l'analyse. Il a aussi été montré que l'utilisation des micro-ondes afin d'effectuer la méthanolyse, induit des temps de réactions considérablement diminués, passant de 3,5h (chauffage classique à 100 °C) à 4 min (sous irradiation micro-ondes à 110 W). La technique HS/SPME-GC/FID s'est avéré une méthode simple, rapide et fiable pour l'analyse du PHB dans la biomasse, et potentiellement applicable à l'analyse du copolymère PHBV. Après optimisation, les limites de détection et de quantification et les critères de fiabilité s'avèrent satisfaisants aussi bien pour la SPME à la suite de la méthanolyse qu'après l'hydrolyse acide avec de l'acide sulfurique 98 % v/v. Afin de valider les méthodes, méthanolyse-HS/SPME et hydrolyse acide-HS/SPME, trois échantillons de trois biomasses différentes d'*A. latus* ont été analysés par GC/FID et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par la méthode classique. Les approches utilisant le couplage avec la technologie par micro-ondes (MO-GC/FID et MO-HS/SPME-GC/FID) ont été également validées mais en utilisant trois échantillons d'un seul type de biomasse. Tous les résultats sont apparus en excellent accord avec la méthode classique (méthanolyse-GC/FID) et ce quelque soit l'approche utilisée : hydrolyse acide-HS/SPME-GC/FID, méthanolyse-HS/SPME-GC/FID, méthanolyse-MO-GC/FID et méthanolyse-MO-HS/SPME-GC/FID.

Le deuxième objectif de ce travail était de trouver une méthode efficace pour la récupération du PHB intracellulaire, tout en réduisant son impact économique et écologique. En étudiant les méthodes d'extraction par solvants, il a été constaté que l'utilisation des micro-ondes favorise le transfert du PHB depuis l'intérieur des cellules vers la solution, en permettant ainsi une amélioration notable de la performance de l'extraction. Ceci se traduit en une réduction significative du temps d'extraction et de la quantité de solvant requise. Ainsi les échantillons extraits sous assistance micro-ondes ont nécessité 3 mL de solvant et 5 min d'irradiation à 440 W pour obtenir des résultats assez proches de ceux observés par la technique conventionnelle avec 10 mL de chloroforme pendant 24 et 48 heures de contact (EAM_{440 W, 5 min, 3 mL} = 86 ± 10 %, EC_{24 h, 10 mL} = 93 ± 3 %; EC_{48 h, 10 mL} = 96 ± 3 %). L'augmentation de la température et l'application de l'agitation vigoureuse ou des ultrasons est favorable au procédé de transfert de masse mais cette opération reste contrôlée par la diffusion du soluté intracellulaire vers la surface, donc par le gradient de concentration. En opérant en mode « batch », avec un contact unique de la biomasse avec 10 mL de chloroforme pendant 30 min, les mêmes résultats ont été observés par l'EC à 50 °C et après sonication (trois pulsations de 5 min avec arrêt de 5 min entre chaque pulsation) dans un bain ultrasons chauffé à la même température. Devant ce constat, la pertinence de la sonication pour lyser les cellules d'*Alcaligenes latus*, dans les conditions utilisées, n'a pas pu être mise en évidence. L'autre stratégie utilisée pour la séparation du PHB du reste de la biomasse a été la lyse induite par des enzymes lytiques. L'utilisation des préparations enzymatiques d'origine bactérienne pour lyser les parois cellulaires, semble une option à l'extraction par solvant. La présence d'un solide blanc légèrement jaune après le traitement avec la kitalase, indique que les cellules ont été lysées. Cet *a priori* favorable a été confirmé par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse. En perspectives, il reste à déterminer les conditions optimales de lyse ainsi que le temps de digestion. Mais, l'effort majeur devrait porter sur le développement de stratégies de purification plus efficaces.

APPENDICE A

ANALYSE DES POLYHYDROXYALCANOATES MICROBIENS PAR
DIFFÉRENTES TECHNIQUES INSTRUMENTALES

Tableau A.1 Méthodes d'analyse des PHA revues par De Rijk et al. (2002).

3HA monomers	Analytical technique	Reference
Propionic acid	¹ H NMR, ¹³ C NMR	1
Butyric acid	GC(MS), ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹³ C-COSY NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR, ¹ H- ¹³ C-HSQC-TOCSY, NMR	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Valeric acid	HPLC GC, ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹³ C-COSY NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR	10,11 2, 4, 6, 8
Hexanoic acid	HPLC GC(MS), ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹³ C-COSY NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR, ¹ H- ¹³ C-HSQC-TOCSY NMR	11, 12 2, 4, 13, 6, 14, 15, 7, 8, 9
Heptanoic acid	GC, ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹³ C-COSY NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR	2, 4, 13, 6, 8
Octanoic acid	GC(MS), ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹³ C-COSY NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR, ¹ H- ¹³ C-HSQC-TOCSY NMR	16, 4, 13, 6, 14, 15, 7, 8
Nonanoic acid	GC, ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹³ C-COSY NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR	17, 13, 6, 8
Decanoic acid	GC(MS), ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹³ C-COSY NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR	17, 13, 6, 14, 15, 7, 8
Undecanoic acid	GC, ¹ H-NMR	17, 13, 6, 18
Dodecanoic acid	GC(MS), ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR	17, 13, 6, 14, 15, 7
Tetradecanoic acid	GC(MS), ¹³ C-NMR, ¹ H- ¹ H-COSY NMR	14, 15, 19, 20
Hexadecanoic acid	GC(MS)	21, 22

1: Doi et al. (1990b); 2: Wallen and Rohwedder (1974); 3: Braunegg et al. (1978); 4: Findlay and White (1983); 5: Riis and Mai (1988); 6: Gross et al. (1989); 7: Abe et al. (1994); 8: Choi and Yoon (1994); 9: Jung et al. (2000); 10: Karr et al. (1983); 11: Hesselman et al. (1999); 12: Del Don et al. (1994); 13: Lageveen et al. (1988); 14: Huijberts et al. (1992); 15: Huijberts et al. (1994a); 16: De Smet et al. (1983); 17: Brandl et al. (1988); 18: Kim et al. (1991); 19: Cromwick et al. (1996); 20: He et al. (1998); 21: Lee et al. (1996); 22: Kellerhals et al. (2000).

APPENDICE B

RÉSUMÉ DES ENZYMES LYTIQUES D'ORIGINE MICROBIEN ET LEURS CONDITIONS OPTIMALES DE LYSE

Tableau B.1 Des enzymes lytiques d'origine microbienne et conditions optimales de digestion. (Tiré de : Andrews et Asenjo, 1987.)

Source	Optimum		Substrate	Ref.
	pH	T (°C)		
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> / <i>Arthrobacter luteus</i> <i>Arthrobacter GJM-1</i> (Zymolyase/Lyticase) glucanase	5-6.5	45-50	Saccharomyces, Candida, Hansenula, Pichia and other yeasts	13-15
protease (alkaline)	9-10	35		
whole yeast cell activity	7.5	30-35		
<i>Oerskovia</i> CK glucanase with proteolytic activity		35-40 60	<i>S. cerevisiae</i>	16
whole yeast cell activity	9.0	35-40		
<i>Rhizoctonia</i> sp. glucanase	5.5	55-60	Candida,	18
protease	6.5	40	Saccharomyces,	
whole yeast cell activity	6.0	40	Hansenula	
<i>Cytophaga</i> NCIB 9497	9.0	45-55	<i>S. cerevisiae</i> , Bacillus, Corynebacteria, <i>E. coli</i>	19
Lysozyme (hen egg-white)	6-7	35	<i>E. coli</i> <i>M. lysodecticus</i> and other bacteria	
<i>Cytophaga</i> B-30 (Lysopeptase)	9.5	50	Staphilococcus	a
<i>Staphylococcus</i> sp.	6-7	37	<i>Micrococcus luteus</i>	21
<i>Streptomyces globisporius</i> (N-acetylmuramidase) (Mutanolysin)	6.5	50	<i>M. lysodecificus</i> Streptococcus	22
<i>Micromonospora</i> sp. (lytic protease)	11	60	<i>E. coli</i> <i>S. marcescens</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i>	23
<i>Bacillus subtilis</i> (lytic protease)	7.8-8.5	30	<i>E. coli</i>	24

a: Miles Technical Information (1984) lysopeptidase.

13: Scott and Schekman, (1980); 15: Vrsanska et al. (1977); 16: Obata et al. (1977); 18: Kobayashi et al. (1982); 19: Andrews and Asenjo, 1986; 21: Valisena et al. (1982); 22: Hayashi et al. (1981); 23: Suzuki et al. (1985); 24: Borovikova et al. (1980).

APPENDICE C

CHROMATOGRAMMES DES PRODUITS DÉRIVÉS DES PHA, OBTENUS PAR LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES UTILISÉES

Chromatogramme méthanolyse acide-GC/FID, PHB (étalon), colonne capillaire SPB-1

Chromatogramme méthanolyse acide-GC/FID, PHB dans la biomasse, colonne SPB-1

Chromatogramme méthanolyse acide-GC/FID, PHB dans la biomasse, colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme méthanolyse acide- HS/SPME-GC/FID, PHB (étalon), colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme méthanolyse acide- HS/SPME-GC/FID, PHB dans la biomasse, colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme méthanolyse acide-MO- HS/SPME-GC/FID, PHB (étalon), colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme méthanolyse acide-MO- HS/SPME-GC/FID, copolymère P(3HB-co-3HV), colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme méthanolyse acide - MO- HS/SPME-GC/FID, PHB dans la biomasse, colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme hydrolyse alcaline – HPLC/UV, PHB (étalon)

Chromatogramme hydrolyse alcaline – HS/SPME-GC/FID, PHB (étalon), colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme hydrolyse alcaline - MO - HS/SPME-GC/FID, PHB (étalon), colonne capillaire DB-WAXetr

Chromatogramme hydrolyse acide – HPLC/UV, PHB (étalon)

Chromatogramme hydrolyse acide – HS/SPME-GC/FID, PHB (étalon), colonne capillaire DB-WAXetr

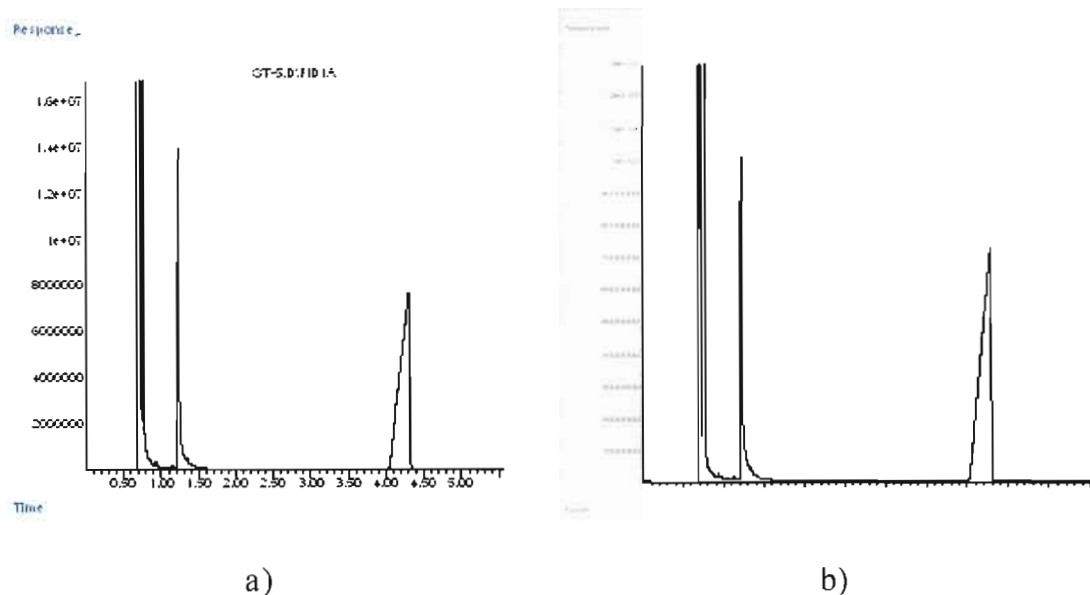


Figure C.1 Méthanolyse acide de 20 mg PHB avec 2 mL de MeOH acidifié (10 % (v/v) H_2SO_4), contenant 8 g L^{-1} d'acide benzoïque (AB) comme étalon interne et 2 mL CHCl_3 , a) chauffage classique (3 h, 100°C), b) chauffage par micro-ondes (MO) 4 min, $P_{\text{MO}} = 110 \text{ W}$. Injecteur split, volume d'injection $1 \mu\text{L}$. Colonne capillaire SPB-1 connectée à un détecteur FID.

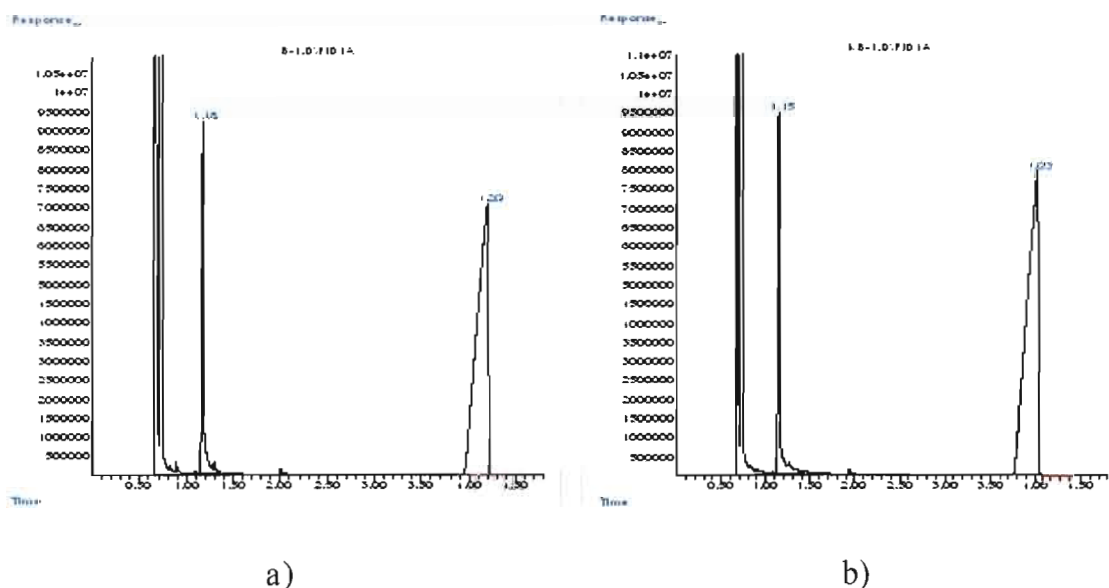


Figure C.2 Méthanolyse acide de 20 mg de biomasse renfermant 60 % en PHB (mg PHB/mg biomasse sèche), a) méthode classique, b) chauffage par MO. Injecteur split, volume d'injection $1 \mu\text{L}$. Colonne capillaire SPB-1 connectée à un détecteur FID.

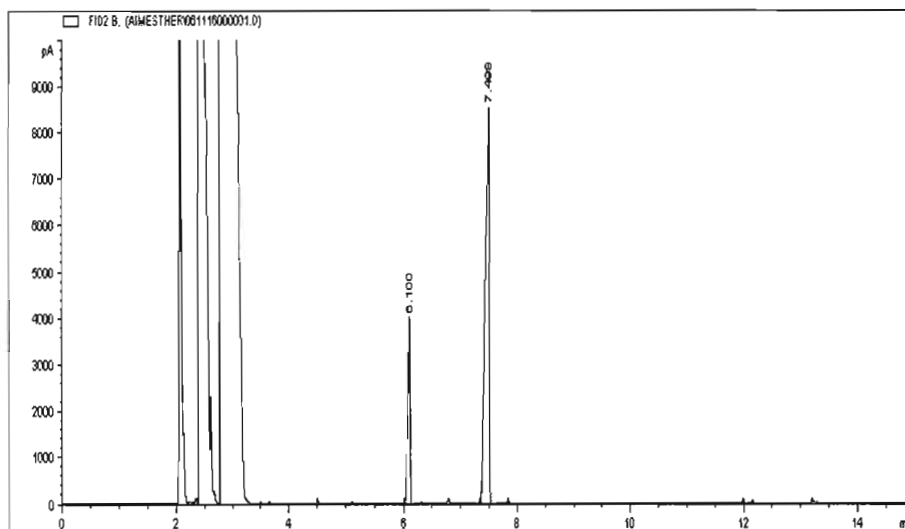


Figure C.3 Méthanolyse acide de 10 mg PHB avec du MeOH acidifié (10 % (v/v) H_2SO_4), contenant 8 g L^{-1} d'AB et 2 mL CHCl_3 (méthode classique). Injection directe de la phase organique ($1 \mu\text{L}$). Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID.

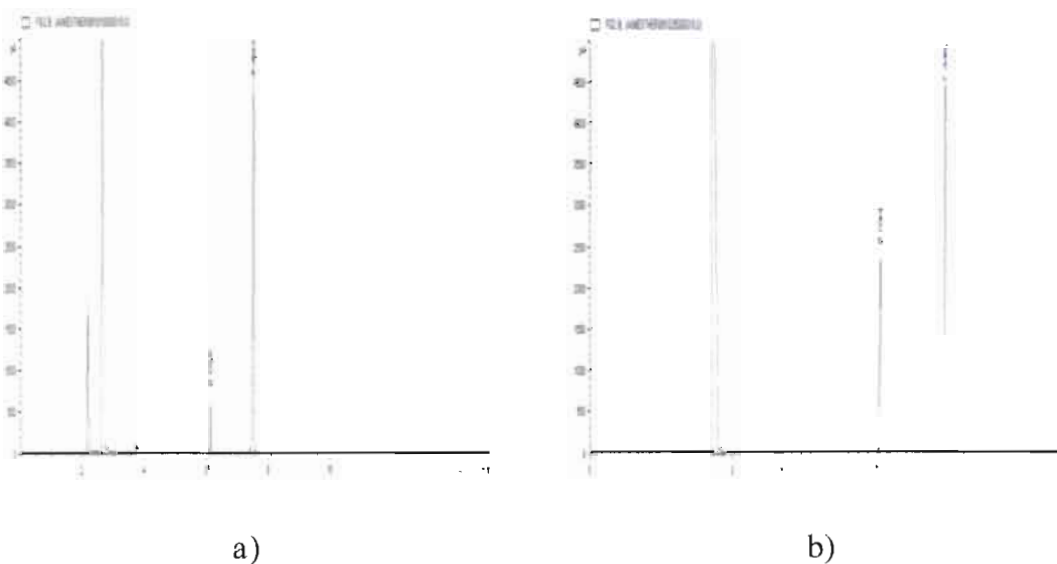


Figure C.4 Méthanolyse acide de 10 mg PHB avec du MeOH acidifié (10 % (v/v) H_2SO_4) et :
 a) 8 g L^{-1} ; b) 1 g L^{-1} d'AB. SPME sur une fibre 50-30 μm *Stable Flex* (23-Gauge) Divinylbenzene/Carboxen/Polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID.

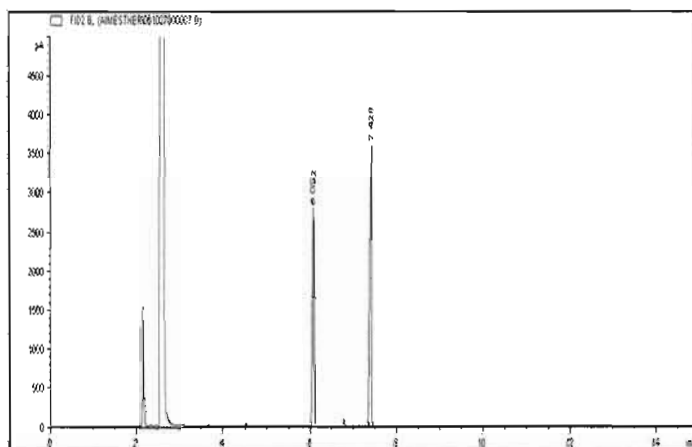


Figure C.5 Méthanolise acide-HS/SPME-GC/FID de 20 mg d'une biomasse renfermant 60 % en PHB avec MeOH/H₂SO₄ (10 % (v/v)/AB (1 g L⁻¹)). Fibre : 50-30 μm DVB/ CAR/PDMS Stable Flex (23-Gauge). Colonne DB-WAXetr/détecteur FID.

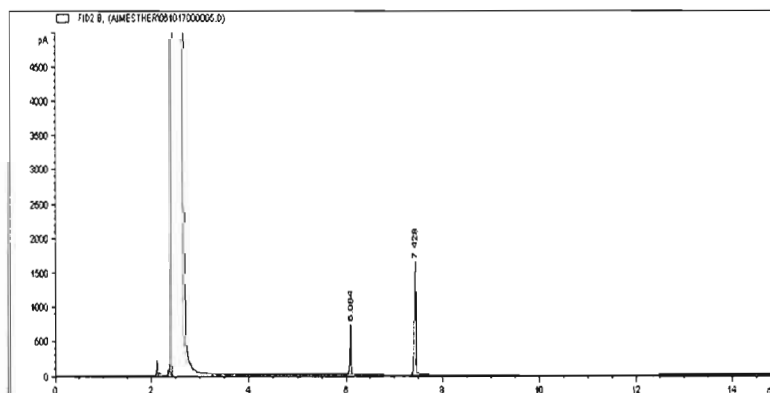


Figure C.6 Méthanolise acide-MO-HS/SPME-GC/FID. PHB= 2 mg, P_{MO}=110 W, t_R= 4 min. Séparation et analyse par GC sur une colonne DB-WAXetr/détecteur FID.

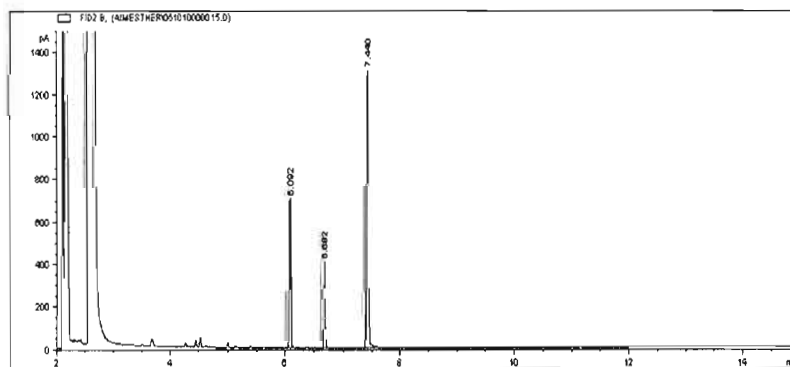


Figure C.7 Méthanolise acide de 10 mg du copolymère P(3HB-co-3HV) (70 : 30 % mol). Chauffage par MO (P_{MO}=110 W, t_R=5 min) et SPME sur une fibre 50-30 μm DVB/CAR/PDMS *Stable Flex* (23-Gauge). Séparation et analyse par GC sur une colonne DB-WAXetr/détecteur FID.

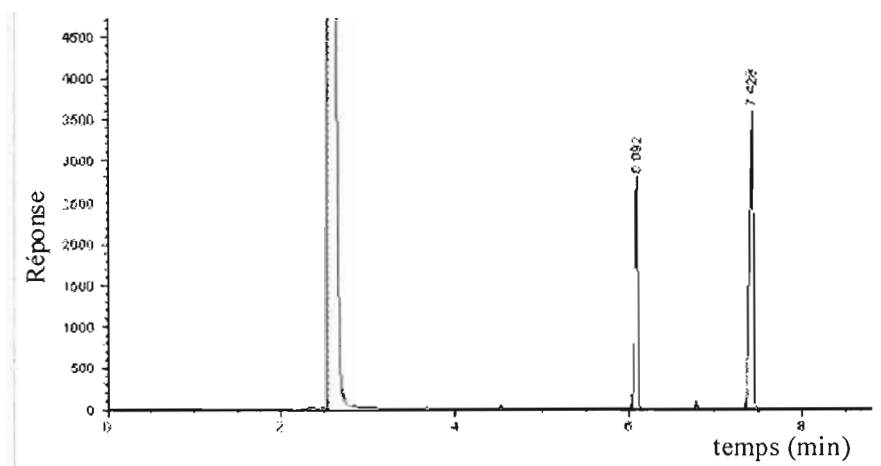


Figure C.8 Méthanolyse acide-MO-HS/SPME-GC/FID. Biomasse (20 mg) renfermant 60% en PHB. Chauffage par MO ($P_{MO}=110$ W et $t_R=4$ min). Séparation et analyse par GC sur une colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID.

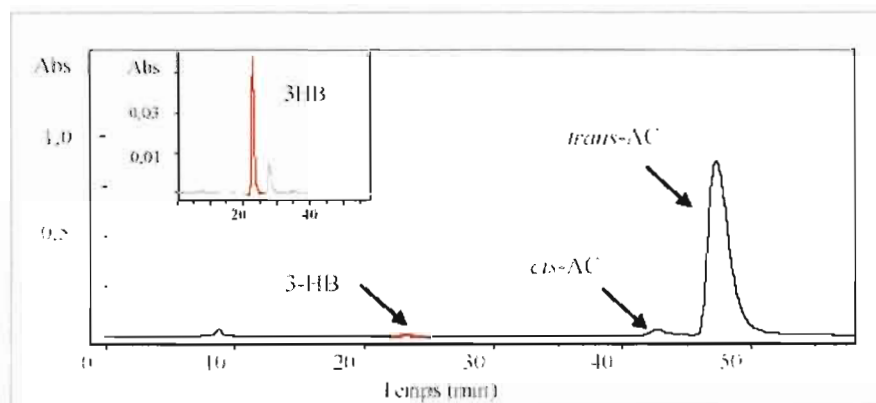


Figure C.9 Hydrolyse alcaline (10 mg de PHB + 1 mL NaOH 4 M, 4 h à 70 °C). Séparation et analyse par HPLC-UV à 210 nm. PHB exprimé par l'acide crotonique (AC) à 43 min le *cis*-AC et à 47min le *trans*-AC. Et à 23 min par l'acide hydroxybutyrique (3HB).

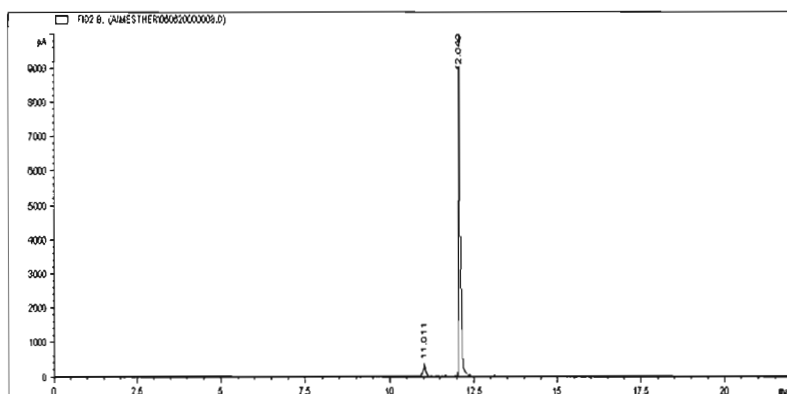


Figure C.10 Hydrolyse alcaline-HS/SPME-GC/FID. Fibre : 50-30 μ m DVB/CAR/PDMS *Stable Flex* (23-Gauge). Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID.

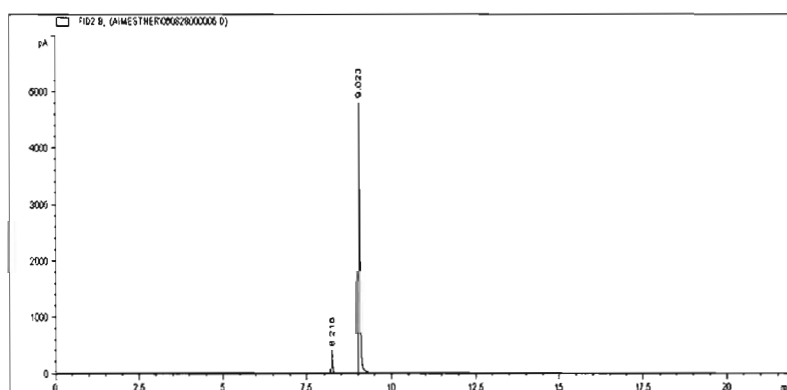


Figure C.11 Hydrolyse alcaline-MO-HS/SPME-GC/FID. Fibre : 50-30 μ m DVB/CAR/PDMS *Stable Flex* (23-Gauge). Colonne capillaire DB-WAXetr/détecteur FID.

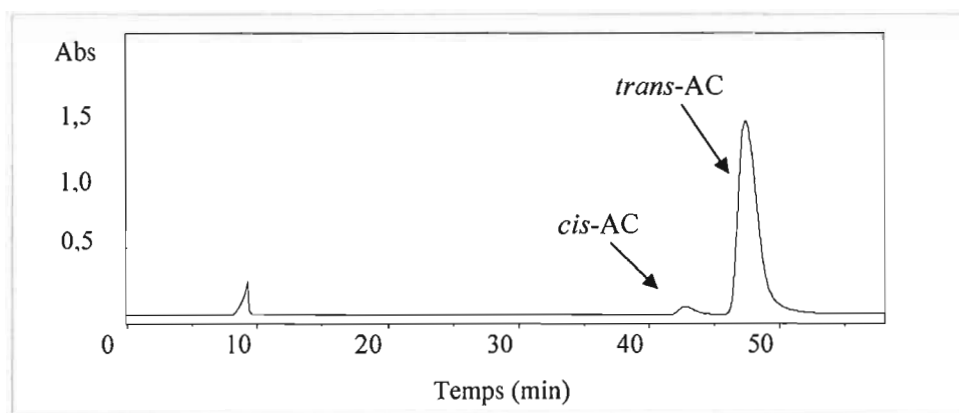


Figure C.12 Hydrolyse acide (10 mg de PHB + 1 mL H₂SO₄ (95-98 % v/v), 4h à 70°C). Séparation et analyse par HPLC-UV à 210 nm. PHB exprimé par les isomères *cis* et *trans* de l'acide crotonique à 43 min et 47 min respectivement.

RÉFÉRENCES

- ADEME. 2006. « Matériaux polymères biodégradables et applications, Note de Synthèse II ». [en ligne], www2.ademe.fr.
- AAC. 2003. « Les bioplastiques ». [en ligne], www.agr.gc.ca.
- Aguilar, C., S. Penalver, E. Pocurull, F. Borrull et R.M. Marce. 1998. « Solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection for the determination of pesticides in aqueous samples ». *J Chromatogr A*, vol. 795, p. 105-115.
- Amat, A. M., G. Asensio, M. J. Castell, M. A. Miranda et A. Simon-Fuentes. 1987. « C[4]H[7]O[2][+] ions Thermochemistry in Sulfuric Acid Solution and CIMS Relationships ». *J Org Chem*, vol. 52, no. 4790-4792.
- Anderson, A. J. et E. A. Dawes. 1990. « Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates ». *Microbiol Mol Biol Rev*, vol.54, no. 4, p. 450-472.
- Andrews, B. A. et J. A. Asenjo. 1987. « Enzymatic lysis and disruption of microbial cells ». *Trends in Biotechnol*, vol. 5, p. 273-277.
- Auras, R., B. Harte et S. Selke. 2004. « An overview of polylactides as Packaging Materials ». *Macromol Biosci*, vol. 4, p. 835-864.
- Bastard, J. P., S. Chambert, F. Ceppa, M. Coude, E. Grapez, S. Loric, F. Muzeau, F. Spyrtos, K. Poirier, V. Copois, C. Tse et T. Bienvenu. 2002. « Les méthodes d'extraction et de purification des ARN. Revues générales ». *Annales de Biologie Clinique*, vol. 60, no. 5, p. 513-523.
- Becue, A. et R. Nguyen. 2005. « Étude de l'analyse des Alkylphénols ». Rapport final du Ministère de l'Écologie et du Développement Durable Direction de l'Eau. Convention DE no. CV04000107 – Thème no.1.
- Belem, Marcio A.F. et Byong H. Lee. 1998. « Oligosaccharides extracted from cell walls of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey ». *Biotechnol Tech*, vol.12, no. 3, p. 229-233.
- Berger, E., B. A. Ramsay, J. A. Ramsay, C. Chavarie et G. Braunegg. 1989. « PBH Recovery by Hypochlorite Digestion of non-PHB Biomass ». *Biotechnol Tech*, vol. 3, no. 4, p. 227-232.
- Bertrand, M.J., A.W. Ahmed, B. Sarrasin et V.N. Mallet. 1987. « Gas chromatographic and mass spectrometric determination of chlorophenoxy acids and related herbicides as their (cyanoethyl)dimethylsilyl derivatives ». *Anal Chem*, vol. 59, p. 1302-1306.
- Brandl, H., E. J. Knee, Jr., R. C. Fuller, R. A. Gross, et R. W. Lenz. 1989. « Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters ». *Int J Biol Macromol*, vol. 11, p.49-55.

- Bertrand, M.J., A.W. Ahmed, B. Sarrasin et V.N. Mallet. 1987. « Gas chromatographic and mass spectrometric determination of chlorophenoxy acids and related herbicides as their (cyanoethyl)dimethylsilyl derivatives ». *Anal Chem*, vol. 59, p. 1302-1306.
- Brandl, H., E. J. Knee, Jr., R. C. Fuller, R. A. Gross, et R. W. Lenz. 1989. « Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters ». *Int J Biol Macromol*, vol. 11, p.49-55.
- Brandl, H., R. Bachofen, J. Mayer et E. Wintermantel. 1995. « Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates ». *Can J Microbiol*, vol. 41, p. 143-153.
- Braunegg, G., B. Sonnleitner et R. M. Lafferty. 1978. « A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly- β -hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass ». *European J Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 6, p. 29-37.
- Bruzaud, S., J.F. Carpentier et Y. Grohens. 2004. « Elaboration of poly(ϵ -caprolactone)-g-TiNbO₅ nanocomposites via in situ metal complex initiated intercalative polymerization ». *Macromol Mater Eng*, vol. 289, p. 531-538.
- Buchholz, K.D. et J. Pawliszyn. 1994. « Optimization of Solid-Phase Microextraction (SPME) Conditions for Phenol Analysis ». *Anal Chem*, vol. 66, p. 160-167.
- Camel, Valérie. 2000. « Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples ». *Trends Anal Chem*, vol. 19, no. 4, p. 229-248.
- Çetin, Demet , Ufuk Gündüz, Inci Eroğlu, Meral Yücel et Lemi Türker. 2006. « Poly- β -hydroxybutyrate accumulation and releasing by hydrogen producing bacteria, *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. A transmission electron microscopic study ». *Afr J Biotechnol*, vol. 5, no. 22, p. 2069-2072.
- CHANVRE-INFO. 2004. «Un moulage par injection de qualité avec des matières premières renouvelables ». [en ligne], www.chanvre-info.ch/info/fr.
- Charlier de Chily, Pierre et Mikaële Raynard. « Transesterification, Esterification and Interesterification Methods Using Dielectric Heating ». *The World Intellectual Property Organization*. Numéro de publication: WO/2003/090669, date de dépôt: 24/04/2003, date de publication: 06/11/2003.
- Chemat, S., A. Lagha, H. Aït-Amar, P.V. Bartels et F. Chemat. 2004. « Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds ». *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 19, p. 188-195.
- Chemat, S., H. Aït-Amar, A. Lagha et D.C. Esveld. 2005. « Microwave-assisted extraction kinetic of terpenes from caraway seeds ». *Chem eng process*, vol. 44, p. 1320-1326.

- Chen, Yinguang, Haizhen Yang, Qi Zhou, Jian Chen et Guowei Gu. 2001. « Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* ». *Process Biochem*, vol. 36, no. 6, p. 501-506.
- Chikh, Linda, Martine Tessier et Alain Fradet. 2007. « NMR and MALDI-TOF MS study of side reactions in hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(hydroxymethyl)propanoic acid ». *Polymer*, vol. 48, no. 7, p.1884-1892.
- Chisti, Y. et M. Moo-Young. 1986. « Disruption of microbial cells for intracellular products ». *Enzyme Microb Technol*, vol. 8, p. 194-204.
- Choi, Jong-il et Sang Yup Lee. 1997. « Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation ». *Bioproc Biosystems Eng*, vol. 17, no. 6, p. 335-342.
- Choi, Jong-il et Sang Yup Lee. 1998. « Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals ». *Biotechnol and Bioeng*, vol. 62, no. 5, p. 546-553.
- Colin, Bruno, Philippe Cleuziat, Patrick Broyer, Claude Mabilat et Sandra Incardona. « Apparatus and process of lysis by biological ultrasounds of cells ». *European Patent* EP1466966. Date de dépôt: 04/03/2000, date de publication: 10/13/2004.
- Comeau, Y., K. Hall et W. K. Oldham. 1988. « Determination of Poly- β -hydroxybutyrate and Poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge ». *Appl Environ Microbiol*, vol. 54, p. 2325-2327.
- Costes, Sandrine. « Sinaptec ». In *Génie des procédés et environnement*. Atelier destiné aux membres de l'ASRC, (Bordeaux 18 et 19 mars 2004). [en ligne], lasrc.net.
- Dabiri, Mínoo, Shabnam Salimi, Alireza Ghassempour, Ali Rassouli et Mohammad Talebi. 2005. « Optimization of microwave-assisted extraction for alizarin and purpurin in *Rubiaceae* plants and its comparison with conventional extraction methods ». *J Sep Sci*, vol. 28, no. 4, p. 387-396.
- De Koning, G. J. M. et B. Witholt. 1997. « A process for the Recovery of poly (hydroxyalkanoates) from *Pseudomonads* Part 1: Solubilization ». *Bioprocess Engineering*, vol. 17, no. 1, p. 7-13.
- De Rijk, Theo C., Pieter van de Meer, Gerrit Eggink et Ruud A. Weusthuis. 2002. « Methods for Analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) Composition ». In *Biopolymers, Volume 3b, Polyesters II - Properties and Chemical Synthesis*. Sous la dir. de Yoshiharu Doi et Alexander Steinbüchel, p. 1-17. Weinheim :Wiley-VCH éditeur.
- De Wilde, Bruno. 2003. Science et Emballage, Plastiques biodégradables – Emballages compostables : point de la situation. *Pack News*, vol. 154.

- Dennis, D., M. McCoy, A. Stangl, H. E. Valentin et Z. Wu. 1998. « Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha* ». *J Biotechnol*, vol. 64, no. 2, 3, p. 177-186.
- Doi, Yoshiharu. 1990. « Microbial Polyesters ». New York: VCH éditeur, 166 p.
- Dong, Z. et X. Sun. 2000. « A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter* ». *Chinese Science Bulletin*, vol. 45, no.3, p. 252-256.
- Environnement Canada. 1998. « Mise au point de méthodes analytiques et d'instruments pour les MAP ». Rapport Biennal [en ligne], www.etc-cte.ec.gc.ca.
- Environnement Canada. 2002. « Dosage des toxiques ». Rapport Biennal. [en ligne], www.etc-cte.ec.gc.ca.
- Feliu, Jordi X. et Antonio Villaverde. 1994. « An Optimized Ultrasonication Protocol for Bacterial Cell Disruption and Recovery of β -galactosidase Fusion Proteins ». *Biochnol Tech*, vol. 8, no. 7, p 509-514.
- Feuilloy, P., G. Cesar, L. Benguigui, Y. Grohens, I. Pillin, H. Bewa, S. Lefaux et M. Jamal. 2005. « Degradation of polyethylene used for agricultural purposes ». *J Polym and Environ*, vol. 13, p. 349-355.
- Fidler, S. et D. Dennis. 1992. « Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli* ». *FEMS Microbiol Rev*, vol. 9, no. 2-4, p. 231-235.
- Foragen. 2001. « Transformation plus efficace de produits naturels ». Bulletin «Visions » de Foragen, vol. 2, Éd. 2, Publié par: Gestion Foragen Technologies Inc.. [en ligne], www.foragen.com.
- Galema, Saskia. 1997. « Microwave chemistry ». *Chemical Society Reviews*, vol. 26, p. 233-238.
- Gedye, Richard, Frank Smith, Kenneth Westaway, Humera Ali, Lorraine Baldisera, Lena Laberge et John Rousell. 1986. « The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis ». *Tetrahedron Lett*, vol. 27, no. 3, p. 279-282.
- Gedye, Richard, W. Rank et K. C. Westaway. 1991. « The rapid synthesis of organic compounds in microwave ovens. II ». *Can J Chem*, vol. 69, no. 4, p. 706-711.
- Gelo-Pujic, M., E. Guibé-Jampel, A. Loupy, S.A. Galema et D. Mathé. 1996. « Lipase – Catalysed Esterification of some Alpha – D- Glucopyranosides in Dry Media Under Focused Microwave Irradiation ». *J Chem Soc, Perkin Trans I*, vol. 23, p. 2777-2780.
- Ghatnekar, M. S., J. S. Pai et M. Ganesh. 2001. « Production and recovering of poly 3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp. V49 ». *J chem technol biotechnol*, vol. 77, p 444-448.

- Giguere, R. J., T. L. Bray, S. M. Duncan et G. Majetich. 1986. « Application of commercial microwave ovens to organic synthesis ». *Tetrahedron Lett*, vol. 27, p. 4945-4948.
- Gillis, M., V. Tran van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin et M. Fernandez. 1995. « Polyphasic taxonomy in the genus Burkholderia leading to an emended description of the genus and proposition of Burkholderia vietnamiensis sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam ». *Int J Syst Bacteriol*, vol. 45, p. 274-289.
- Gracida, Rodríguez Jorge N., Alba Flores Joel, Fermín Pérez-Guevara et Judith Cardoso Martínez. 2002. « Synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) Copolymère produced in sequential Feeding Fed Batch Cultures of *Ralstonia eutropha* ». *International Journal of Polymeric Materials*, vol. 51, p 607-617.
- Gu, Ji-Dong. 2003. « Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances ». *Int Biodeter Biodegr*, vol. 52, p. 69-91.
- Guillard, Jérôme. 2007. « Synthèse par activation micro-onde ». *Biotechnocentre / Lettres d'Information*, Lettre no. 48. [en ligne], www.biotechnocentre.fr.
- Hahn, Sei K., Yong K. Chang et Sang Y. Lee. 1995. « Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli* ». *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, no. 1, p. 34-39.
- Hahn, Sei K., H. W. Ryu et Y. K. Change. 1998. « Comparison and Optimization of Poly(3-Hydroxybutyrate) Recovery from *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli* ». *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 15, no. 1, p. 51-55.
- Harrison, Susan T., John S. Dennis et Howard A. Chase. 1991a. « Combined chemical and mechanical processes for the disruption of bacteria ». *Bioseparation*, vol. 2, no. 2, p. 95-105.
- Harrison, Susan T., Howard A. Chase et John S. Dennis. 1991b. « The lysis of Gram-negative *Alcaligenes eutrophus* by enzymes from *Cytophaga* ». *Biotechnol Tech*, vol. 5, no. 2, p. 115-120.
- Haywood, G. W., A. J. Anderson et E. A. Dawes. 1989. « The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus* ». *FEMS Microbiol Lett*, vol. 57, p. 1-6.
- Haywood, G. W., A. J. Anderson, D. R. Williams, E. A. Dawes et D. F. Ewing. 1991. « Accumulation of poly(hydroxyalkanoates) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate by *Rhodococcus sp.* NCIMB 40126 ». *Int J Biol Macromol*, vol. 13, p. 83-88.

- Hejazi, Parisa, Ebrahim Vasheghani-Farahani et Yamini Yadollah. 2003. « Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery ». *Biotechnol Prog.*, vol. 19, no. 5, p 1519-1523.
- Henriksen, T., B. Svensmark, B. Lindhardt et R. K. Juhler. 2001. « Analysis of acidic pesticides using in situ derivatization with alkylchloroformate and solid-phase microextraction (SPME) for GC-MS ». *Chemosphere*, vol. 44, no. 7, p. 1531-1539.
- Hesselmann, R. P., T. Fleischmann, R. Hany et A. J. Zehnder. 1999. « Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods ». *J Microbiol Methods*, vol. 35, no. 2, p. 111-119.
- Holmes, Paul A.. 1982. *Eur Patent Appl* : EP-A-0046335.
- Holmes, Paul A. et Guan B. Lim. 1989. « Separation process ». *United States Patent* 4910145. Date de dépôt : 06/30/1989 date de publication: 03/20/1990.
- Hurlbert, Ronald E.. 1996. « Architecture bactérienne, bactérie virtuelle ». In *Microbiology 101 Internet text*. (Trad. de l'anglais par A. Garnier (version française modifiée avec la permission de l'auteur). [en ligne], www.gch.ulaval.ca.
- Jan, S., C. Roblot, J. Courtois, B. Courtois, J. N. Barbotin et J. P. Seguin. 1995. « ^1H -NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass ». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 225, p. 258-263.
- John, Maliyakal E. et Greg Keller. 1996. « Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells ». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 93, no. 23, p.12768-12773.
- Joly, Nicolas. 2003. « Synthèse et caractérisation de nouveaux films plastiques obtenus par acylation et réticulation de la cellulose ». Thèse de doctorat, Limoges, Université de Limoges, 166 p.
- Kang, Choong-Kyung, Satoshi Kusaka et Yoshiharu Doi. 1995. « Structure and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes latus* ». *Biotechnology Lett*, vol. 17, no. 6, p. 583-588.
- Kappe, Oliver. 2004. « Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis ». *Angew Chem Int Ed*, vol. 43, p. 6250-6284.
- Khosravi-Darani, K., E. Vasheghani-Farahani, Seyed Abbas Shojaosadati et Yadollah Yamini. 2004. « Effect of Process Variables on Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* Cells for Poly (R-hydroxybutyrate) Recovery ». *Biotechnol Prog*, vol. 20, no.6, p 1757-1765.
- Kingston, Skip H. M., P. J. Walter, Gary W. Engelhart et Patrick J. Parsons. 1997. « Chemical Laboratory Microwave Safety », In *Microwave Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and Applications* (Chapitre 16). ACS

- Professional Reference Book Series, American Chemical Society, Washington, DC. [en ligne], www.sampleprep.duq.edu.*
- Kolb, Bruno et Leslie S. Ettre. 2006. « Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice ». 2^e éd. New York: John Wiley & Sons, 350 p.
- Kshama, Lakshman et T. Ramachandriah Shamala. 2006. « Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes ». *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, no. 7, p. 1471-1475.
- Lagalante, Anthony F. et Matthew A. Felter. 2004. « Silylation of Acrylamide for Analysis by Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography/Ion-Trap Mass Spectrometry ». *Agric Food Chem*, vol. 52, no. 12, p. 3744-3748.
- Lee, Kyung M., Ho N. Chang, Yong K. Chang, Beom S. Kim et Sei K. Han. 1993. « The Lysis of Gram-negative *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligenes latus* by Palmitoyl Carnitine ». *Biotechnol Tech*, vol. 7, no. 4, p. 295-300.
- Lee, Maw-Rong, Ren-Jye Lee, Yih-Wen Lin, Ching-Ming Chen et Bao-Huey Hwang. 1998. « Gas-Phase Postderivatization following Solid-Phase microextraction for determining acidic herbicides in water ». *Anal Chem*, vol. 70, no. 9, p. 1963-1968.
- Lee, Sang Y.. 1996. «Bacterial Polyhydroxyalkanoates». *Biotechnol Bioeng*, vol. 49, no.1, p.1-14.
- Lemoigne, Maurice. 1926. « Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique ». *Bull Soc Chem Biol*, vol.8, p.770-782.
- Liu, J. W., Q. Zhao et C. X. Wan. 2001. « Research progresses on degradation mechanism *in vivo* and medical applications of polylactic acid ». *Space Med Eng*, vol. 14, no. 4, p. 308-312.
- Lord, H. et J. Pawliszyn. 2000. « Evolution of solid-phase microextraction technology ». *J Chromatogr A*, vol. 885, p. 153-193.
- Loupy, A., A. Haudrechy. 1996. « Effets de milieu en synthèse organique. Des effets de solvants aux méthodes d'activation non classiques ». Paris: Masson éditeur, p. 277-305.
- Lucchesi, Marie E., Farid Chemat et Jacqueline Smadja. 2004. « Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation ». *J Chromatogr A*, vol. 1043, no. 2, p. 323-327.
- Luzier, William. 1992. « Material derived from biomass/biodegradable materials ». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 89, no. 3, p. 839-842.

- Madison Lara L. et Gjalt W. Huisman. 1999 « Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic ». *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 63, no. 1 p. 21-53.
- Maia, J. L., M. H. A. Santana et M. I. Ré. 2004. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 21, no. 1, p. 1-12.
- Maxence, Layet. 2005. « Le sac plastique biodégradable est-il une solution environnementale? » [en ligne], www.novethic.fr.
- MBLX-G (Metabolix, Inc. et ADM). 2007. « Metabolix and ADM to Produce Mirel(TM), the World's First Biobased and Fully Biodegradable Plastic ». [en ligne], www.metabolix.com.
- Meyers, Jodi E. et José R. Almirall. 2005. « Analysis of gamma-hydroxybutyric acid (GHB) in spiked water and beverage samples using solid phase microextraction (SPME) on fiber derivatization/gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) ». *J Forensic Sci*, vol. 50, no. 1, p. 31-36.
- Ojumu, T.V., J. Yu et B.O. Solomon. 2004. « Minireview. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer ». *Afr J Biotechnol*, vol. 3, no.1, p. 18-24.
- Omar, S., A. Rayes, A. Eqaab, I. Voss et A. Steinbüchel. 2001. « Optimization of cell growth and poly (3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus magnetarium* strain ». *Biotechnol Lett*, vol. 23, no. 14, p 1119-1123.
- Ostle, A. G. et J. G. Holt. 1982. « Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate ». *Appl Environ Microbiol*, vol. 44, no. 1, p. 238-241.
- Page, William J. et Christopher J. Tenove. 1996. « Quantitation of poly- β -hydroxybutyrate by fluorescence of bacteria and granules stained with Nile blue A ». *Biotechnol Tech*, vol. 10, no. 4, p. 215-220.
- Pal, Soma et Amal K. Paul. 2002. « Physico-chemical characteristics of poly(3-hydroxybutyric acid) isolated from *Azotobacter chroococcum* MAL-201 ». *Curr Sci*, vol. 83, no.12, p. 1565-1568.
- Pan, L., J. M. Chong et J. Pawliszyn. 1997. « Determination of amines and water using derivatization combined with solid-phase microextraction ». *J Chromatogr*, vol. 773, p. 249-260.
- Pasch H. et W. Schrepp. 2003. « MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers ». Berlin: Springer, 298 p.
- Pawliszyn Janusz. 1997. Solid Phase Microextraction. Theory and Practice. New York: Wiley - VCH, 264 p.

- PHB *Industrial S.A.*. 2006. « Process for the isolation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from a cell mass by solvent extraction involving a step of treating the PHA solution with water and/or steam for evaporation of the PHA solvent and precipitation of the PHA ». *The World Intellectual Property Organization*. Numéro de publication : WO/2006/092033), date de dépôt : 06/03/2006, date de publication : 08/09/2006.
- Poirier, Y., C. Nawrath et C. Somerville. 1995. « Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant ». *Biotechnol*, vol.13, p. 142-150.
- Rabetafika, H. N., M. Paquot et P. Dubois. 2006. « Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique ». *Biotechnol Agron Soc Environ*, vol. 10, no. 3, p. 185-196.
- Radio-Canada, 2007. « Plastique biodégradable. BioMatera est prête à lancer sa fabrication ». [en ligne], www.radio-canada.ca.
- Ramsay, J. A., E. Berger, B. A. Ramsay et C. Chavarie. 1990. « Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment ». *Biotechnol Tech*, vol. 4, no. 4, p. 221-226.
- Ramsay, J. A., E. Berger, R. Voyer, C. Chavarie et B. A. Ramsay. 1994. « Extraction of Poly-3-hydroxybutyrate using Chlorinated Solvents ». *Biotechnol Tech*, vol. 8, no. 8, p. 589-594.
- Resch, S., K. Gruber, G. Wanner, S. Slater, D. Dennis et W. Lubitz. 1998. « Aqueous release and purification of poly(β -hydroxybutyrate) from *Escherichia coli* ». *J Biotechnol*, vol. 65, p. 173-182.
- Rutot, Delphine et Philippe Dubois. 2004. « Les (bio)polymères biodégradables : l'enjeu de demain ? ». *Chimie nouvelle*, vol. 22, no. 86, p. 66-75, Éditeur : Société royale de chimie.
- Satgé, Céline. 2002. « Étude de nouvelles stratégies de valorisation de mono et polysaccharides ». Thèse de doctorat, Limoges, Université de Limoges, 211 p.
- SFC. 2007. « Matières plastiques ». [en ligne] www.sfc.fr.
- Shimao, Masayuki. 2001. « Biodegradation of plastics ». *Biotechnology*, vol.12, no.3, p. 242-247.
- Sigma-Aldrich. 2006. « Enzymatic Cell Lysis and Protoplast Preparation ». *BioFiles-Life Science Research Product Resource Guide*. [en ligne], www.sigma-aldrich.com.
- Slepecky, Ralph et John H. Law. 1960. « A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids ». *Anal Chem*, vol. 32, p. 1697-1699.

- Stashenko, Elena E. et Jairo R. Martínez. 2004. « Derivatization and solid-phase microextraction ». *Trends Anal Chem*, vol. 23, no. 8, p. 553-561.
- Steinbüchel, A. et P. Schubert. 1989. « Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly(β -hydroxybutyric acid)-synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. ». *Arch microbiol*, vol. 153, no. 1, p. 101-104.
- Steinbüchel, Alexander. 1991. « Polyhydroxyalkanoic acids ». In: *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Sous la dir. de D. Byrom. New York: Stockton, p. 124-213.
- Steinbüchel, A., E. Hustede, M. Liebergesell, U. Pieper, A. Timm et H. Valentin. 1992. « Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acid in bacteria ». *FEMS Microbiol Rev*, vol. 9, no. 2-4, p. 217-230.
- Steinbüchel, A., E. M. Debzi, R. H. Marchessault et A. Timm. 1993. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolymer by *Chromobacterium violaceum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 39, no. 4-5, p. 443-449.
- Stockburger, David. 1996. « Introductory Statistics: Concepts, Models, and Applications ». [en ligne], www.psychstat.missouristate.edu.
- Su, P. G. et S. D. Huang. 1999. « Determination of organophosphorus pesticides in water by solid-phase micro-extraction ». *Talanta*, vol. 49, no. 2, p. 393-402.
- Sulo, Pavol, Daniela Hudecová, Antónia Propperová et Ivan Bašník. 1996. « Rapid and simple analysis of poly- β -hydroxybutyrate content by capillary isotachopheresis ». *Biotechnol Tech*, vol. 10, no. 6, p. 413-418.
- SUPELCO / Sigma-Aldrich. 2001. « Solid Phase Microextraction Troubleshooting Guide ». Bulletin 928. [en ligne] www.sigmaaldrich.com.
- Tamer, I M, M. Moo-Young et Y. Chisti. 1998b. « Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly(β -hydroxybutyric acid): comparison of high-pressure homogenization, bead milling and chemically induced lysis ». *Ind Eng Chem Res*, vol. 37, no. 5, p. 1807-1814.
- Tamer, I. M., M. Moo-Young et Y. Chisti. 1998a. « Optimization of poly (β -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments ». *Bioproc Eng*, vol. 19, p 459-468.
- Toma, M., M. Vinatoru, L. Paniwnyk et T.J Mason. 2001. « Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction ». *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 8, no. 2, p.137-142.
- USCOTA. 1993. « Biopolymers: Making Materials Nature's Way-Background Paper. Chapter 2-Technical Overview of Biopolymer Field ». *OTA-BP-E-102* (Washington, DC: U.S. Government Printing Office).

- Wallen, L. L. et W. K. Rohwedder. 1974. « Poly- β -hydroxyalkanoate from Activated Sludge ». *Environ Sci Technol*, vol. 8, no. 6, pp. 576-579.
- Wang, Z., L. Ding, T. Li, X. Zhou, L. Wang, H. Zhang, L. Liu, Y. Li, Z. Liu, H. Wang, H. Zeng et H. He. 2006. « Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. et *Zanthoxylum bungeanum* Maxim ». *J Chromatogr*, vol. 1102, no. 1-2, p. 11-17.
- Williams, D. R., A. J. Anderson, E. A. Dawes et D. F. Ewing. 1994. « Production of a co-polyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from succinic acid by *Rhodococcus ruber*: biosynthetic considerations ». *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 40, no. 5, p. 717-723.
- Williamson, D. H. et J. F. Wilkinson. 1958. « The isolation and estimation of the poly-3-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species ». *J Gen Microbiol*, vol. 19:198-209.
- Wikipédia. 2007 (Dernière modification de cette page le 13 août 2007). « Polymère ». *Wikimedia Foundation, Inc.*. [en ligne], fr.wikipedia.org/wiki/Polymère.
- Wong, H. H. et S. Y. Lee. 1998. « Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. ». *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 50, no. 1, p. 30-33.
- Yezza, A. et J. Hawari. 2006. « Bioconversion of Maple Sap into Polyhydroxyalkanoates (PHA) by *Alcaligenes latus* ». (*US Provisional Patent Application # 60-784,482*).
- Yu, J., D. Plackett et L. X. L. Chen. 2005. « Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions ». *Polymer Degrad Stabil*, vol. 89, p. 289-299.
- Yu, Peter Hoifu, Kin-ho Law, Yun-chung Leung, Hugh Lawford, Hong Chua et Wai-Hung Lo. 2001. « Production of Polyhydroxybutyrate by *Bacillus* Species Isolated from Municipal Activate Sludge ». *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 93, no. 1-3, p 515-525.