

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

RAPPORT PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES ET GÉNIE  
DES MATÉRIAUX LIGNOCELLULOSSIQUES

PAR  
Sanae El Harche

Développement des méthodes d'extraction des bioplastiques issues des boues papetières  
par les liquides ioniques

JUILLET 2015

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

## **Avant-propos**

De nos jours, le secteur papetier et forestier est menacé à cause de la naissance des nouvelles technologies. L'industrie papetière se voit dans l'obligation de trouver de nouveaux concepts afin de garantir sa survie.

De plus, le développement de plastiques biodégradables présente un grand intérêt compte tenu des problèmes et des effets nocifs que présentent les plastiques conventionnels vis-à-vis de l'environnement.

Lors du traitement ou de l'extraction des bioplastiques, les solvants employés sont toxiques et nocifs pour l'environnement. On note également une forte consommation de ces solvants et d'énergie lors de l'étape d'extraction.

Pour ce faire à ces problèmes, ce sujet a pour but de remplacer les plastiques d'origine pétrochimique par les bioplastiques extraits à partir des boues secondaires papetières. Il s'agit d'une nouvelle façon de valoriser les déchets industriels papetiers.

Enfin, ce travail vise à substituer les solvants traditionnels par les liquides ioniques qui présentent plusieurs avantages environnementaux comparativement au solvant organique traditionnel.

## **Remerciements**

Je saisirai cette opportunité pour exprimer mes chaleureux remerciements à mon directeur de recherche, le Professeur Daniel Montplaisir qui m'a accueilli dans son laboratoire, pour tous ses conseils structuraux et son suivi permanent durant toute la période de réalisation de ce travail de même que pour toute sa patience.

Un merci, tout spécial, à mes mentors durant ma formation, mon codirecteur de mémoire, le Professeur Simon Barnabé, pour le temps qu'il m'a consacré et pour son évaluation de mon mémoire. Monsieur Kokou Adjalé. Madame Ha Thanh Pham. Monsieur Benjamin Boëns pour leurs conseils et leurs aides techniques au laboratoire.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui m'ont soutenu et aidé de près ou de loin lors de mon travail, je nomme ici Zineb ELachhab.

Je ne manquerai pas d'exprimer ma grande gratitude envers le groupe Kruger qui m'a aidé financièrement tout au long de mon travail et la direction du CRML (le Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques) qui m'a donné l'opportunité de compléter ma formation, au sein de ses laboratoires.

Je dois aussi remercier le programme de Bourses d'excellence de l'UQTR pour les cycles supérieurs et aussi le programme de Bourse de mérite et au recrutement du CRMR pour leurs aides financières durant ma maîtrise.

Finalement, je remercie tous mes amis et tous ceux qui m'ont aidé.

## Résumé

Depuis longtemps, les bioplastiques biodégradables et le remplacement des plastiques de sources pétrolières présentent un grand intérêt pour le public, les gouvernements et l'industrie. Ce projet de recherche a pour principal objectif de diminuer l'empreinte écologique de ces plastiques en développant une technique d'extraction d'un type particulier de produit thermoplastique biodégradable sous le nom de polyhydroxyalcanoate (PHA) existant dans les eaux usées papetières. Ces dernières contiennent le PHA emprisonné sous forme d'énergie par les microorganismes utilisés lors du traitement secondaire des eaux usées. Le « PHA » est un polyester linéaire d'hydroxyalcanoate d'origine bactérienne. Comme les lipides de type acide gras, il est issu directement des ressources végétales : polysaccharides, protéines et lipides. Le polymère s'accumule dans le cytoplasme de certaines bactéries, après fermentation avec une source de carbone. Les objectifs de ce travail de recherche consistaient à extraire ce biopolymère des boues des usines de pâtes à papier et de produire ce même polymère dans des cultures de fermentation de *Cupriavidus nector* afin de s'en servir comme point de comparaison. Les résultats obtenus se sont avérés très prometteurs : les boues secondaires papetières contiennent environ 50 % de PHB comparativement à 70 % pour la culture par *Cupriavidus nector*. L'extraction des biopolymères, par les techniques conventionnelles, se révèle être une étape délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant d'où la nécessité d'extraire les PHAs par les liquides ioniques (LI). Dans ce travail, les PHAs ont été extraits dans un mélange LI :eau de façon efficace.

## Mots Clés

Biodégradables; polyhydroxyalcanoates; PHA; *Cupriavidus nector*; boues secondaires papetières; liquides ioniques; extraction; pureté.

## Table des Matières

Avant-propos .....	i
Remerciements .....	ii
Résumé .....	iii
Table des Matières .....	iv
Liste des Figures .....	vii
Liste des Tableaux.....	ix
Liste des Abréviations.....	x
Chapitre 1 - Introduction .....	1
Chapitre 2 - Revue de littérature .....	3
2.1 Les bioplastiques .....	3
2.1.1 Structure et biodégradabilité.....	3
2.1.2 Intérêts industriels.....	6
2.1.3 Coût de production des bioplastiques .....	6
2.2 Effluents papetiers .....	8
2.2.1 Caractéristiques des effluents papetiers.....	8
2.2.2 Le traitement des effluents.....	10
2.2.2.1 Le traitement primaire .....	10
2.2.2.2 Le prétraitement.....	11
2.2.2.3 Le traitement secondaire.....	11
2.2.2.4 Le traitement des boues .....	12
2.2.3 Caractéristiques physico-chimiques des boues papetières .....	12
2.2.4 Valorisation des boues papetières.....	13
2.2.4.1 Enfouissement.....	13

2.2.4.2	Valorisation énergétique .....	14
2.2.4.3	Valorisation agricole.....	15
2.2.4.4	Autres voies de valorisation.....	15
2.3	Bactéries productrices de PHA .....	15
2.4	Critères généraux .....	16
2.4.1	Conditions de fermentation.....	16
2.4.1.1	Contrôle du carbone et de l'azote .....	16
2.4.1.2	Contrôle de pH et agitation.....	17
2.5	Liquide ionique .....	17
2.5.1	Généralités et Structures .....	17
2.5.2	Propriétés physico-chimiques .....	19
2.5.2.1	Point de fusion .....	20
2.5.2.2	Stabilité thermique.....	20
2.5.2.3	Conductivité.....	22
2.5.2.4	Densité et viscosité .....	22
2.5.3	Solubilité dans les solvants.....	24
2.5.3.1	Solubilité dans les solvants organiques et l'eau .....	24
2.5.4	Toxicité .....	25
2.5.5	Application des liquides ioniques dans les procédés de séparation .....	26
2.5.6	Extraction liquide-liquide .....	26
Chapitre 3 - Hypothèses et objectifs .....	27	
3.1	Hypothèses.....	27
3.2	But.....	27
3.3	Objectifs spécifiques.....	27
Chapitre 4 - Matériels et méthodes .....	28	
4.1	Méthodes de production et récupération du PHA.....	28
4.1.1	Microorganismes producteurs de PHA.....	28
4.1.2	Paramètres de fermentation en erlenmeyers .....	28

4.1.3	Méthodes d'identification des souches bactérienne accumulant le PHA .....	30
4.1.3.1	Coloration avec le bleu de Nil .....	30
4.2	Méthode de récupération et traitement des boues secondaire papetière.....	31
4.2.1	Préparation des échantillons de boues papetières.....	31
4.2.2	Méthodes d'extraction et de purification du PHA .....	32
4.2.2.1	Extraction et purification par solvant .....	32
4.3	Synthèse du liquide ionique.....	33
4.4	Extraction par un liquide ionique .....	34
4.5	Méthodes d'analyses du PHA .....	34
4.5.1	Analyses du PHA par FTIR .....	34
4.5.2	Analyses du PHA par RMN <sup>1</sup> H .....	35
4.5.3	Analyses du PHA par ATG .....	35
4.5.4	Analyses du PHA par GPC.....	35
	Chapitre 5 - Résultats et discussions.....	36
5.1	Culture de <i>Cupriavidus necator</i> et identification du bioplastique produit.....	36
5.1.1	Croissance de <i>Cupriavidus necator</i> .....	36
5.1.2	Résultats de production des PHAs.....	36
5.2	Solubilisation et extraction dans les liquides ioniques .....	39
5.2.1	Analyse RMN et FTIR.....	40
5.2.2	Analyse thermogravimétrique .....	44
5.2.3	Analyse par CPG .....	49
5.2.4	Extraction dans des mélanges eau-LI .....	50
	Conclusions et recommandations.....	56
	Bibliographie.....	58

## Liste des Figures

Figure 2.1	Les homopolymères. PHB et PHV et leur copolymère, le PHBV [8].....	4
Figure 2.2	Classification de polymères biodégradables (Modifié de Legros et al., 2011, p, 7)[9].....	5
Figure 2.3	Matrice des bioplastiques [10].....	6
Figure 2.4	Matériaux impliqués dans la fabrication du papier et matières rejetées [16].....	9
Figure 2.5	Schéma des principales étapes du traitement des effluents papetiers [19] .....	11
Figure 2.6	Les différentes méthodes de gestion des déchets organiques au Québec en 2010 [24] .....	14
Figure 2.8	Nomenclature des cations Imidazolium [37] .....	19
Figure 2.9	États des LI (tous les liquides ioniques) vs H <sub>2</sub> O.....	22
Figure 4.1	Synthèse du Li [C4C1Im][Cl] par substitution nucléophile[54] .....	34
Figure 5.1	Croissance de <i>Cuprividus necator</i> en fonction du temps dans le milieu synthétique (milieu 1).....	37
Figure 5.2	Croissance de <i>Cuprividus necator</i> en fonction du temps dans le milieu TSB (milieu 2) .....	37
Figure 5.3	Quantité maximale de cellules viables de <i>Cuprividus necator</i> observée dans les deux milieux .....	38
Figure 5.4	Souche bactérienne sans coloration avec le bleu de Nil .....	39
Figure 5.5	Souche bactérienne avec coloration avec le bleu de Nil.....	39
Figure 5.6	Essai de solubilisation dans le liquide ionique [C4C1Im][Cl] .....	40
Figure 5.7	FTIR comparatif du PHB standard et des extraits au chloroforme de la biomasse bactérienne ainsi que des boues papetières. ....	41
Figure 5.8	FTIR comparatif de la composition des boues papetières extraites au Li et du PHB standard.....	42
Figure 5.9	RMN <sup>1</sup> Hdu Polyhydroxybutyrate (PHB) standard .....	45
Figure 5.10	RMN <sup>1</sup> H comparatif de la composition de la biomasse bactérienne et les boues papetières après extraction au chloroforme.....	45
Figure 5.11	ATG du PHB standard .....	46
Figure 5.12	ATG de la biomasse microbienne <i>Cupriavidus necator</i> extraite au Li .....	47

Figure 5.13 ATG de la boue papetière extraite au Li.....	48
Figure 5.14 Schéma du procédé d'extraction des PHB par le Li.....	50
Figure 5.15 Bioplastique extrait avec 90% Li et 10% d'eau.....	51
Figure 5.16 Bioplastique extrait avec 80% Li et 20% d'eau.....	52
Figure 5.17 Bioplastique extrait avec 70% Li et 30% d'eau.....	52
Figure 5.18 Bioplastique extrait avec 60% Li et 40% d'eau.....	53
Figure 5.19 Bioplastique extrait avec 50% Li et 50% d'eau.....	53
Figure 5.20 Bioplastique extrait avec 40% Li et 60% d'eau.....	54

## Liste des Tableaux

Tableau 2.1 Capacité mondiale de production de bioplastiques (en tonnes) European Bioplastics (2011) [15] .....	8
Tableau 2.2 Composition chimique des boues selon différentes sources de fabrication [20] .....	13
Tableau 2.3 Quelques anions des liquides ioniques [37].....	18
Tableau 2.4 Point de fusion de divers sels d'ammonium [37] .....	21
Tableau 2.5 : Viscosité et densité de divers composés [40].....	23
Tableau 2.6 Solubilité des solvants organiques dans les LI [37].....	25
Tableau 2.7 Solubilité des LI dans l'eau [37].....	25
Tableau 4.3 Synthèse du LI [C4C1Im][Cl] .....	33
Tableau 5.1 Principales bandes du PHB en FTIR .....	41
Tableau 5.2 Principaux pics du PHB en RMN <sup>1</sup> H .....	43
Tableau 5.3 Résultats d'analyse CPG des bioplastiques .....	49

## Liste des Abréviations

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie

ASTM: American Society for Testing and Materials

PHA: Polyhydroxyalcanoate

PLA: Acide polylactique

PHB: Polyhydroxybutyrate

PHV : Polyhydroxyvalérate

PHBV: Polyhydroxy-butyrat-valérate

EPA : Environnementale Protection Agency

TMP: Pâtes thermomécaniques

CTMP: Pâtes chimico-thermomécaniques

LI : Liquide ionique

## Chapitre 1 - Introduction

On remarque une accumulation, de plus en plus importante, des plastiques dans l'environnement ce qui cause de l'encombrement des dépotoirs et la pollution des sols et des milieux maritimes. Des chercheurs ont évalué la durée de vie d'un sac de plastique à environ 200 ans [1]. Sa dégradation produit du CO<sub>2</sub>, ce qui contribue à l'augmentation de l'effet de serre.

Aux États-Unis, en 2010, les plastiques représentaient 31 millions de tonnes de tous les déchets municipaux totaux générés (EPA Environmental Protection Agency, 2011) [2]. La majeure partie de ces déchets, 13,7 millions de tonnes, provenaient des emballages. Pour cette même année, au Québec, 32,6 % des matières plastiques avaient été récupérées par les ménages québécois via la collecte sélective municipale [3]. Le potentiel de valorisation des matières plastiques éliminées dans les lieux d'enfouissement technique (LET) est toujours très élevé.

Une solution serait de remplacer la production de matière plastique conventionnelle (non dégradable) par des substituts biodégradables. Le développement des plastiques biodégradables a soulevé l'intérêt durant les dernières décennies. Plus particulièrement, le polyhydroxyalcanoate (PHA) a été identifié comme un biopolymère par Ojumu et al, en 2004 [4]. Il est produit par une grande variété d'êtres vivants dont des végétaux, des animaux et des microorganismes (bactéries, champignons, algues). Il est doté de nombreuses propriétés thermoplastiques et biodégradables. Les bactéries emmagasinent le PHA sous forme de réserve énergétique intracellulaire.

Plus de 120 PHAs ont été caractérisés [5]. Parmi eux, le polyhydroxybutyrate (PHB) qui est produit par un grand nombre de bactéries. Généralement, il est produit dans des conditions de limitation des éléments nutritifs et en présence d'excès de source de carbone.

Selon leurs propriétés, les PHAs peuvent être utilisés dans des applications très variées notamment dans les secteurs de l'emballage, de la pharmacie, l'agriculture, l'électronique, la médecine, du textile, de l'automobile.

Dans ce dernier domaine d'application, les polyhydroxyalcanoates (PHA) ayant des propriétés thermoplastiques et étant biodégradables, ils apparaissent comme un des meilleurs candidats pour remplacer les polymères issus de la pétrochimie.

L'extraction des PHAs par les techniques conventionnelles présentes plusieurs désavantages comme l'utilisation de solvants volatils, toxiques et inflammables alors que d'importants volumes de solvants peuvent être consommés, ce qui devient très coûteux à l'échelle industrielle.

Le présent projet a comme premier objectif la mise au point d'une méthode verte d'extraction du PHA renfermé dans la biomasse bactérienne produite dans des boues papetières et de les récupérer à un niveau élevé de pureté.

## **Chapitre 2 - Revue de littérature**

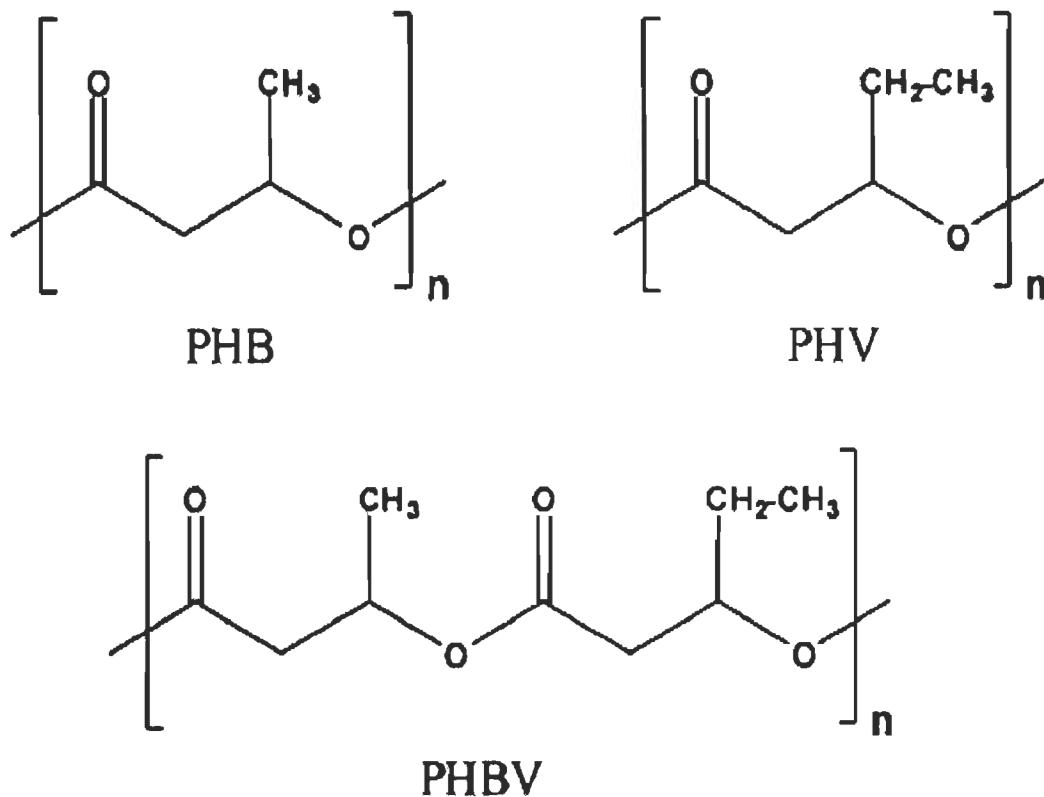
### **2.1 Les bioplastiques**

Entre 1990 et 2005, le terme bioplastique a été utilisé pour définir les plastiques ayant la capacité de se biodégrader. On nomme un polymère biodégradable celui que les microorganismes (bactéries, champignons ou microalgues) seront capables de dégrader entièrement. Lors d'une activité biologique, les enzymes sécrétées par les microorganismes décomposent le matériel.

#### **2.1.1 Structure et biodégradabilité**

La biodégradabilité des plastiques est définie selon la norme ASTM D6400. Un plastique biodégradable « Se dit d'un plastique dégradable dont la dégradation résulte de l'action des microorganismes naturellement présents dans le milieu tels que les bactéries, les mycètes ou les algues » [6]. En présence d'oxygène, les résidus de la biodégradation sont du gaz carbonique, de l'eau, des composés inorganiques et de la biomasse [7]. Le PHA est produit par plus de 200 bactéries, qui l'utilisent comme source de carbone et d'énergie. Le polyhydroxybutyrate (PHB) est un polymère cristallin (80 %), possédant une température de fusion (173-180 °C) ce qui lui donne un avantage par rapport aux autres polyesters biodégradables.

La grande famille du PHA a plusieurs homopolymères tels que le polyhydroxybutyrate (PHB) et le polyhydroxyvalerate (PHV) et aussi des copolymères comme le polyhydroxybutyratevalerate (PHBV). (figure 2.1)



**Figure 2.1 Les homopolymères. PHB et PHV et leur copolymère, le PHBV [8]**

La classification par procédé de fabrication est définie comme suit afin de présenter et expliquer les différents types de bioplastiques (figure 2.2).

- Groupe 1 : Les bioplastiques naturels issus directement de la biomasse;
- Groupe 2 : Les bioplastiques issus des microorganismes par fermentation microbienne;
- Groupe 3 : Les bioplastiques obtenus par synthèse à partir de monomères renouvelables;
- Groupe 4 : Les bioplastiques pétrochimiques biodégradables.

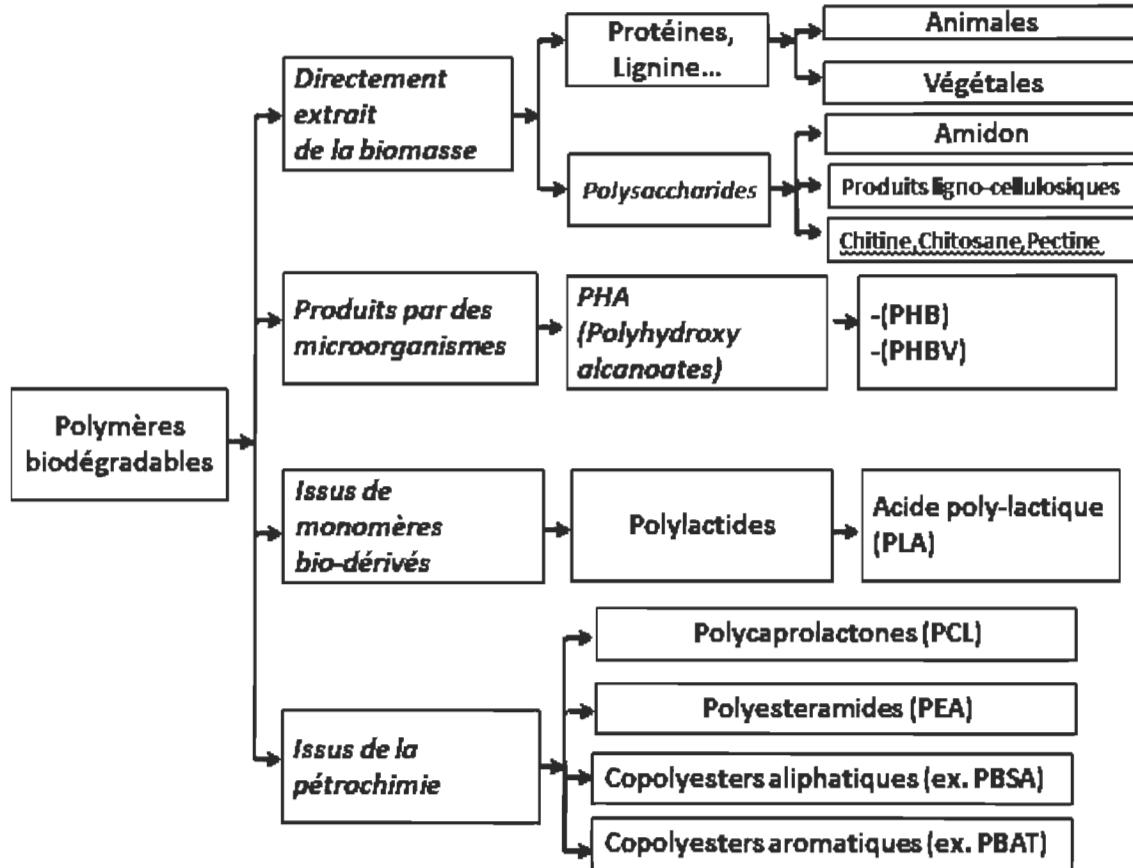


Figure 2.2 Classification de polymères biodégradables (Modifié de Legros et al., 2011, p, 7)[9]

Le terme bioplastique englobe les plastiques de trois des quatre catégories représentées à la figure 2-3:

- Biodégradables issus de ressources renouvelables;
- Biodégradables issus de ressources non renouvelables d'origine fossile;
- Non biodégradables issus de ressources renouvelables.

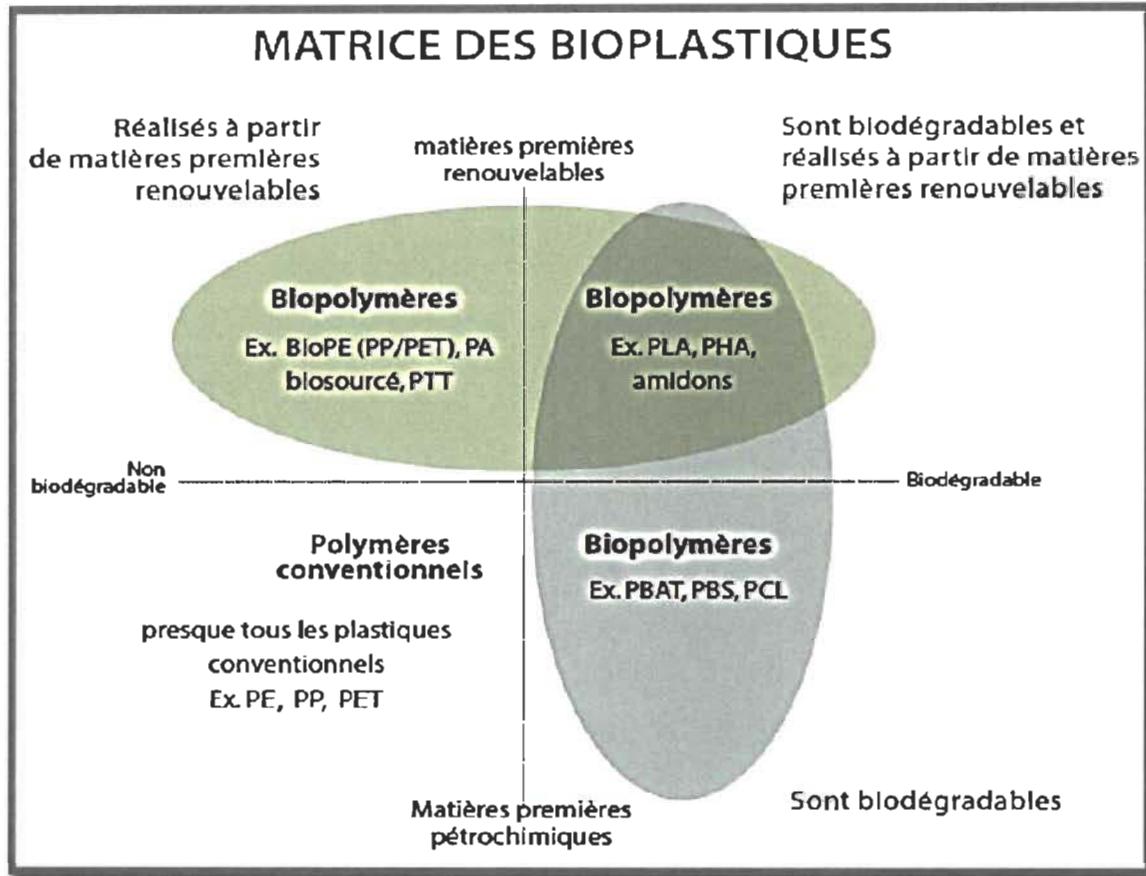


Figure 2.3 Matrice des bioplastiques [10]

### 2.1.2 Intérêts industriels

En plus de résoudre les problèmes liés aux traitements des déchets, les plastiques biodégradables ont d'autres avantages. Les propriétés des PHAs permettent son application dans des secteurs tels que : l'emballage, les textiles, l'agriculture, l'industrie pharmaceutique l'électronique, la médecine, l'automobile (Seebatch et al, 1987) [11].

Il serait donc souhaitable de développer un produit biodégradable issu des déchets des usines papetières afin de remplacer les plastiques de source non renouvelable utilisée actuellement.

### 2.1.3 Coût de production des bioplastiques

Afin de réduire les coûts de production du PHA, des efforts ont été consacrés pour optimiser le développement des souches, les paramètres de fermentation, les méthodes de

bris cellulaire et d'extraction et l'utilisation de nouvelles sources de carbone moins dispendieuses.

En 2010, les bioplastiques représentaient 0,10 % du marché mondial des plastiques, on estime que leur production annuelle pourra atteindre 1,5 million de tonnes en France.

Selon Forissier [12], les bioplastiques devraient représenter 80 000 T voire même 500 000 T[12]. Pour les plus optimistes [13], en 2007, 905 000 T de bioplastiques sont attendus avec un taux de pénétration au marché des plastiques traditionnels de 11,8 % au lieu de 0,16 %.

Le coût actuel des matériaux biodégradables est supérieur à celui des plastiques d'origine pétrochimique. Cela est particulièrement le cas pour les produits biodégradables à base d'amidon et de céréales qui sont de 1,5 à 4 fois plus chers que les polyéthylènes. En 2005, le prix du PLA était 2 fois plus élevé que le polystyrène et 1,5 plus cher que le PET. En effet, le recours aux biomatériaux et la formulation des composites complexes pour de petits tonnages influencent les coûts [14]. La recherche actuelle vise à diminuer les coûts de production des bioplastiques grâce à de nouvelles technologies et à des procédés permettant d'obtenir les mêmes produits avec moins de matière, moins de temps et de manière plus économique.

L'accent doit être mis sur les connaissances, les procédés d'obtention et les applications des biopolymères. Cependant, les quantités produites restent très faibles. La production des bioplastiques à partir des déchets industriels est une façon de diminuer la pression sur le plan économique, qui se complique au fur et à mesure de l'augmentation de la demande et par conséquent, l'augmentation des quantités produites.

Au tableau 2.1, On remarque que l'offre et la demande augmentent simultanément, notant bien que la demande reste faible par rapport à l'offre, ceci pourra être expliqué par le prix des bioplastiques qui reste plus élevé que les plastiques conventionnelles, aussi la conscience des gens vis-à-vis les inconvénients de ces derniers pourra jouer sur la demande aussi.

**Tableau 2.1 Capacité mondiale de production de bioplastiques (en tonnes)  
European Bioplastics (2011) [15]**

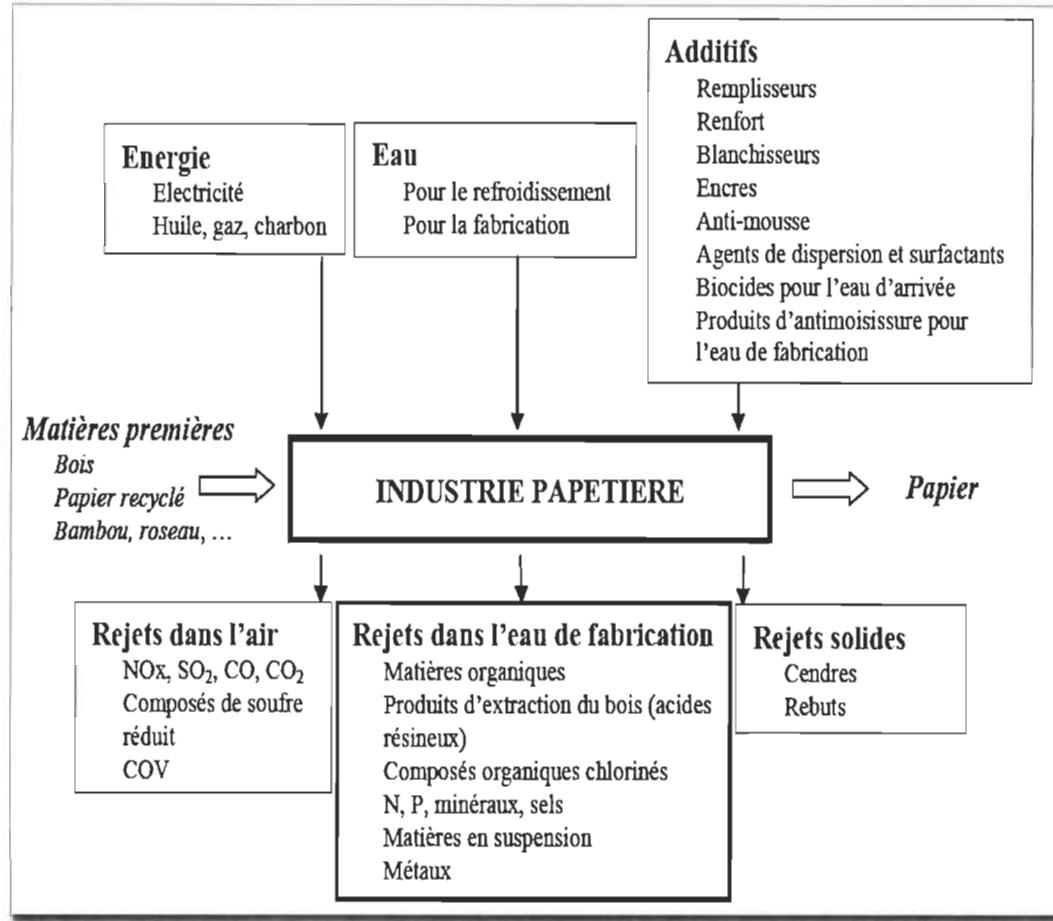
	1990	1995	2000	2002	2005	2008
<b>Offre</b>	0	30 000	70 000	260 000	360 000	590 000
<b>Demande</b>	0	10 000	30 000	100 000	175 000	400 000

## 2.2 Effluents papetiers

Aujourd’hui, l’utilisation des PHAs reste limitée par les coûts de production élevés de ces bioplastiques malgré leurs avantages par rapport aux matières plastiques conventionnelles. Pour ce faire, et pour réduire les coûts de production, une nouvelle approche est apparue, impliquant l’emploi de boues activées comme sources de microorganismes et/ou les déchets industriels comme les effluents papetiers comme substrats pour la production du PHA. D’un point de vue économique, le coût du substrat et surtout la source du carbone contribueront à diminuer le prix d’obtention du PHA qui atteint 40% du total des coûts de production.

### 2.2.1 Caractéristiques des effluents papetiers

Durant le procédé de fabrication du papier, différents matériaux sont impliqués ainsi que les types de matières rejetées. La figure 2.4 montre que la nature de l’effluent dépend toujours des matières premières (bois, papier recyclé, etc.) ainsi que du procédé de fabrication (Kraft, pâte mécanique, etc.) et des produits chimiques utilisés.



**Figure 2.4 Matériaux impliqués dans la fabrication du papier et matières rejetées [16].**

On peut trouver dans les effluents papetiers les matières suivantes (B.A.C.E, 2005) :

- Matières en suspension, telles que des fibres, des copeaux de bois, des écorces, des cendres et d'additifs (argile, carbonate de calcium, etc.) ;
- Matières organiques, provenant du bois et des additifs, généralement dissoutes ;
- Composés inorganiques tel que les métaux et les sels, qui proviennent du bois ou des additifs ;
- Hydrocarbures, qui proviennent surtout des pertes de lubrifiants ;
- Composés phénoliques provenant de la lignine du bois ;
- Acides gras et résiniques provenant du bois;
- Composés organochlorés, tels que les dioxines et les furanes chlorés, qui proviennent des produits chlorés utilisés pour le blanchiment des pâtes;

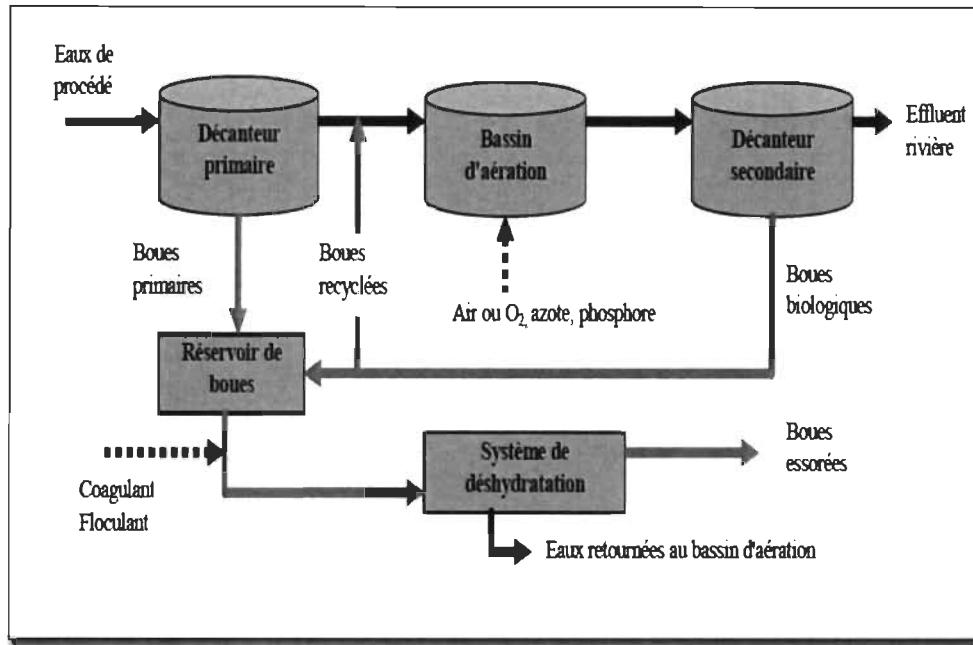
- Composés organiques volatiles ou semi-volatiles, telles que le formaldéhyde et l'acétaldéhyde ;
- Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

### 2.2.2 Le traitement des effluents

Comme le montre la figure 2.5, lors du traitement des effluents les petites fibres qui sont issues de la fabrication passent par deux systèmes de traitement des eaux usées à la sortie de l'usine. Le premier décanteur est appelé, le décanteur primaire, les matières solides formées de fibre de bois sont récupérés sous forme de boues appelées boues primaires. Par la suite, les eaux qui contiennent encore des matières en suspension sont acheminées vers des bassins d'aération, où s'effectue le traitement secondaire qui consiste en la dégradation de ces matières à l'aide des micro-organismes [17]. Les boues primaires et les boues secondaires sont ensuite mélangées à des floculants et des coagulants pour faciliter la décantation des boues. Ce mélange est déshydraté à l'aide d'une presse.

#### 2.2.2.1 Le traitement primaire

Dans ce genre de traitement, le processus se fait par sédimentation ou flottation. Le traitement primaire au sens strict est un traitement physico-chimique qui se base essentiellement sur l'ajout d'agents coagulants et floculants dans l'eau, le but est de récupérer un grand nombre de particules en suspension par décantation ou flottation qu'on appelle boues physico-chimiques ou primaires. Le traitement primaire élimine 90 % des particules et objets en suspension. Néanmoins, il reste dans l'eau toutes les particules fines qui ne sont pas dissoutes ainsi que la matière soluble telle que les éléments azotés, phosphatés. Ces derniers seront éliminés par la suite par les traitements secondaires et tertiaires [18].



**Figure 2.5 Schéma des principales étapes du traitement des effluents papetiers**

[19]

### 2.2.2.2 Le prétraitement

Cette étape a pour but d'éliminer les éléments susceptibles de gêner dans les autres étapes du traitement. Il comprend :

- le dégrillage : pour prélever les déchets volumineux;
- le dessablage : pour prévenir le dépôt des déchets de haute densité dans les canalisations.
- le dégraissage-déshuileage : pour éviter l'enrassement des bassins par des corps gras.

### 2.2.2.3 Le traitement secondaire

Le traitement secondaire a pour rôle d'éliminer les composés solubles d'origine organique. Le principe de ce traitement est d'introduire une population bactérienne dans les eaux usées. Pour leur propre développement, les bactéries assimilent la matière organique dans les eaux.

Plusieurs techniques de traitement peuvent être utilisées :

- le lagunage : L'activité des bactéries se fait naturellement à des concentrations faibles en organismes épurateurs, d'une dimension d'un étang, utilisé lorsque de grands espaces sont disponibles.
- Les boues activées : les bactéries dans des bassins sont sélectionnées selon ce que l'on souhaite éliminer : carbone, azote, phosphore. Les boues issues de ce traitement sont appelées boues secondaires et peuvent être utilisées pour la fertilisation des sols par la suite comme plan de valorisation. Une partie de ces boues retourne dans les bassins pour éviter une trop grande perte en bactéries[18].

#### **2.2.2.4 Le traitement des boues**

Il existe plusieurs techniques d'épuration des eaux usées industrielles. Plus la production est grande, plus la production de boues est grande. Les boues peuvent contenir 95 % à 98 % d'eau. Les différentes techniques de traitement des boues passent par différentes étapes : l'épaississement, la digestion anaérobie, la déshydratation, le séchage et la valorisation. La valorisation est soit agricole dans le cas du compostage ou énergétique par incinération pour produire de la chaleur ou de l'électricité [18].

#### **2.2.3 Caractéristiques physico-chimiques des boues papetières**

Il est difficile de déterminer la composition des boues papetières, car ceci dépend de plusieurs paramètres tels que : la matière première, du type de produits de papier fabriqués, le processus suivi lors de la fabrication de la pâte, soit une pâte thermomécanique (TMP) chimico-thermomécanique (CTMP) ou Kraft. Les boues papetières contiennent beaucoup d'éléments, tels que l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca) et le magnésium (Mg). Les teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine présentes sont aussi une des principales propriétés chimiques des boues papetières. Le tableau 2.2 nous montre la composition de ces boues.

**Tableau 2.2 Composition chimique des boues selon différentes sources de fabrication [20]**

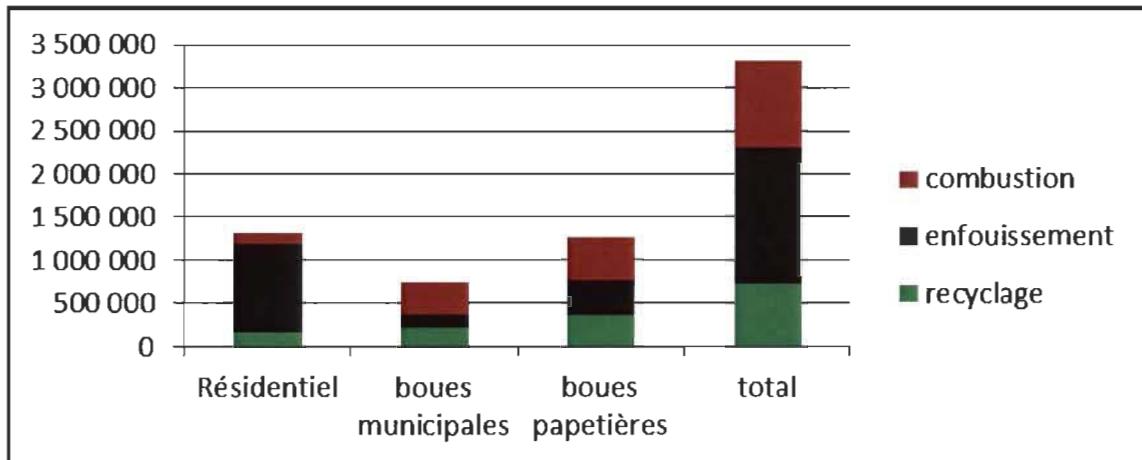
composition chimique	Fibre de bois (résineux)	Boues TMP	Boues CTMP	Boues Kraft
Cellulose %	44,4	34,8	42,8	39,2
Pentosane (partie de l'hémicellulose) %	12,3	5	6,3	7,6
Lignine%	28,5	26,3	25,3	21,9
Extractible%	6,3	16,1	2,78	1,15

#### 2.2.4 Valorisation des boues papetières

Depuis longtemps, la technique la plus utilisée pour éliminer les effluents était la mise en décharge car c'est le moyen le moins coûteux [21]. De nos jours, les industriels se voient dans l'obligation de respecter les normes et la législation en matière d'environnement.

##### 2.2.4.1 Enfouissement

Selon la figure 2.6 l'enfouissement est la méthode la plus répandue [22], l'enfouissement est coûteux et de plus en plus difficile à cause de la diminution du nombre des sites. Ces boues enfouies sont considérées comme étant une source importante d'émissions de gaz à effet de serre, tel que le gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et le méthane ( $\text{CH}_3$ ) [23].



**Figure 2.6 Les différentes méthodes de gestion des déchets organiques au Québec en 2010 [24]**

#### 2.2.4.2 Valorisation énergétique

Il existe plusieurs techniques de valorisation énergétique des boues papetières :

- Incinération : En effet, c'est la méthode la plus populaire pour réduire les grands volumes des boues, ceci permet la récupération de l'énergie. L'incinération reste la méthode la plus utilisée même si l'industrie penche plus sur la valorisation agricole [25]
- L'oxydation humide : Le principe est de réduire les volumes des boues tout en chauffant dans des conditions de température d'eau critique qui peut atteindre 374° C[21]
- La gazéification : Le but de cette méthode est de récupérer l'énergie à partir des matières organiques existantes dans les boues secondaires, ceci permet de convertir les boues en gaz et en huile, À nos jours, même si la gazéification est une technique très prometteuse, elle reste peu utilisée [21]
- Biocarburant : c'est une autre technique de valorisation des boues. Le but est de générer du biométhane à partir des boues par le principe de biométhanisation [26].

#### **2.2.4.3 Valorisation agricole**

Plusieurs possibilités de valorisation passent par voie agricole :

- Épandage agricole : C'est une méthode très ancienne de valorisation des propriétés fertilisantes des boues [27] [28]. En effet, les boues contiennent de fortes teneurs en minéraux par la présence d'éléments fertilisants ce qui modifie le rapport Carbone/azote. L'ajout des boues papetières au sol permet aussi d'augmenter sa capacité à retenir les métaux. Au Canada (1995) 7% des boues papetières ont été utilisées pour amender les sols [29]
- Compostage : c'est une technique mise en œuvre par la nature, qui consiste à convertir et valoriser les boues papetières par dégradation aérobique en un produit riche en composés humiques, utilisés par la suite comme fertilisant pour les terres agricoles.

#### **2.2.4.4 Autres voies de valorisation**

Il existe d'autres voies de valorisation des boues papetières que les voies déjà citées, elles peuvent :

- Entrer dans le procédé de fabrication du ciment [30];
- Être à la base de la fabrication des produits de rembourrage et la construction des barrières hydrauliques sur les sites d'enfouissement[31];
- Être utilisées pour la fabrication de nourriture et de litières d'animaux domestiques (chats, chiens) et de bovins [32].

### **2.3 Bactéries productrices de PHA**

L'accumulation du PHA a été observée à forte concentration chez certaines variétés de micro-organismes tels que : *Clostridium*, *Syntrophomonas*, *Pseudomonas* et *Alcaligene* [33].

## 2.4 Critères généraux

Le PHA est produit par une grande variété de bactéries, le type le plus commun de PHA produit est le polyhydroxybutyrate (PHB). Il a été observé pour la première fois en 1925 dans la souche *Bacillus megaterium* qui produisait de minuscules granules [34]. Ces granules contenaient des polymères identifiés par la suite comme étant du PHB. Pour produire du PHA, les bactéries doivent être capables de croître à un pH optimal ainsi que dans des conditions de manque ou de limitation d'azote ou d'oxygène.

Dans le présent projet, les premiers travaux ont été réalisés sur des cultures et des souches capables de produire du PHA en utilisant les sucres de la biomasse lignocellulosique. La bactérie sélectionnée doit être en mesure de produire du PHA en quantités relativement importantes. La bactérie qui satisfait ces critères est *Cupriavidus nector*. C'est une bactérie Gram- qui produit les deux polymères PHB et PHV.

### 2.4.1 Conditions de fermentation

La bactérie *Cupriavidus nector* requiert des conditions de fermentation particulières afin d'obtenir un rendement optimal de production de bioplastiques. Plusieurs paramètres doivent être contrôlés.

#### 2.4.1.1 Contrôle du carbone et de l'azote

Les deux composantes indispensables pour la production du PHB au sein des bactéries sont les quantités de carbone et d'azote au sein du milieu de culture. Des quantités assez élevées de carbone et de faibles quantités d'azote stimulent les bactéries afin de produire du PHB [35]. Il fut démontré qu'en présence d'un apport en azote limité et d'une source de carbone suffisamment abondante, certaines bactéries Gram- tel que *Cupriavidus nector* peuvent accumuler entre 60 et 80 % de leur poids en PHB [35].

Les bactéries ont besoin de nutriments (carbone, azote, phosphore, etc.) et lorsqu'un nutriment important comme le carbone est en excès dans la culture et l'azote est limité, la bactérie met en place des mécanismes de survie, dont le stockage de carbone, sous forme de PHB.

#### 2.4.1.2 Contrôle de pH et agitation

La plupart des bactéries produisant du PHA ne peuvent pas tolérer dans les boues des niveaux de pH de (4,7 à 5,5). *Cupriavidus nector* exige un pH compris entre 6 et 8. La meilleure solution est d'utiliser un système tampon de basique. Le pH de la solution est ajusté en utilisant un tampon phosphate. L'agitation joue aussi un rôle primordial pour une meilleure production du PHA, elle favorise la circulation de l'oxygène et le mélange des nutriments.

### 2.5 Liquide ionique

Depuis le début des années 2000, les liquides ioniques (LI) ont connu un engouement dans de nombreux domaines de la chimie [36]. Au 19e siècle, le premier LI fût identifié lors de la réaction de Friedel et Craft entre le benzène et le chlorométhane catalysé par un acide de Lewis,  $\text{AlCl}_3$  [37]. En 1914, Walden à découvert le nitrate d'éthylammonium dont le point de fusion est de  $12^\circ\text{C}$  [37].

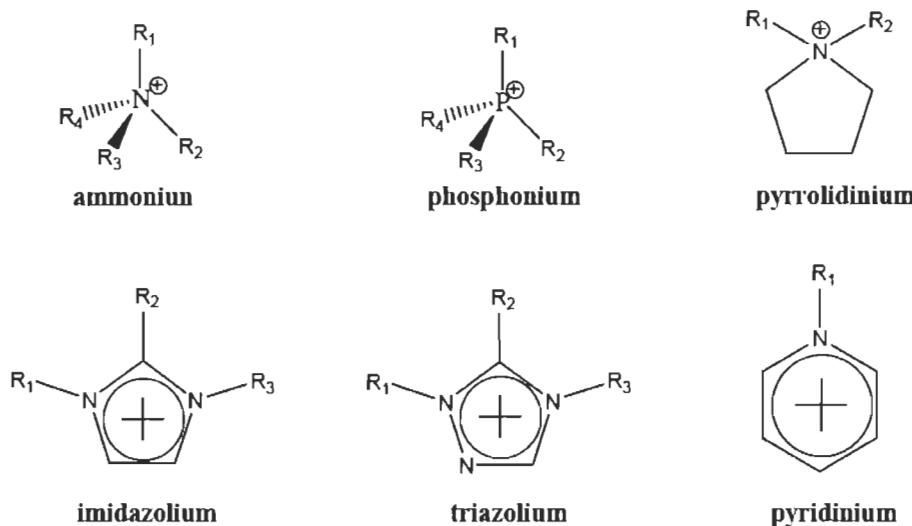
Au début des années 1990, les LI ont été utilisés comme solvants dans diverses applications. On nomme ainsi : la synthèse organique, la spectroscopie, l'électrochimie, l'extraction, la séparation [37].

#### 2.5.1 Généralités et Structures

Les liquides ioniques sont des composés totalement ioniques possédant un point de fusion inférieur à  $100^\circ\text{C}$ . Ils ont une tension de vapeur très faible, on peut même les considérer comme étant non volatile. Cette propriété rend l'utilisation des LI plus sécuritaires et peut-être un avantage indéniable afin d'extraire et de récupérer des produits volatils par distillation.

Les liquides ioniques sont formés par l'association d'un anion et d'un cation, dont au moins l'un des deux est organique (Figure 2.7). On les appelle « sels fondus » ou « liquides ioniques à température ambiante », entre autres. Les LI peuvent être utilisés comme solvant à température ambiante ou modérée, ils ont une forte interaction intermoléculaire inexisteante pour les autres sels fondus à haute température. Les liquides io-

niques ont une stabilité thermique élevée et sont relativement peu coûteux. Puisque c'est un milieu non coordonnant dans lequel un certain nombre de solutés organiques et inorganiques peuvent être dissous, les LI sont un bon choix pour le développement de la chimie verte. Les principaux cations sont montrés à la figure 2.7 et les anions au tableau 2.3.



**Figure 2.7** Principaux cations des liquides ioniques[37]

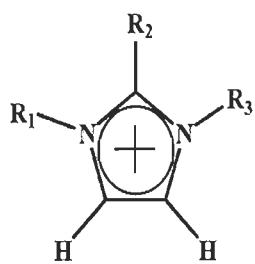
**Tableau 2.3** Quelques anions des liquides ioniques [37]

Anions inorganiques	Anions organiques
$\text{F}^-$ . $\text{Cl}^-$ . $\text{Br}^-$ . $\text{I}^-$ $\text{BF}_4^-$ . $\text{BF}_6^-$ . $\text{SbF}_6^-$ . $\text{AsF}_6^-$ $\text{NO}_3^-$ . $\text{ClO}_4^-$	$\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ . $\text{CH}_3\text{SO}_4^-$ , $\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3^-$ $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ . $\text{C}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_3^-$ . $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ $\text{N}(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2^-$

La pureté des liquides ioniques est un paramètre important. Un LI pur est un meilleur solvant. Comme les LI sont très peu volatils, la purification par distillation n'est pas envisageable excepté dans des conditions sévères.

Un grand soin doit être apporté lors de la synthèse des LI afin de limiter tant que possible les impuretés présentes dans le produit final tel que les traces d'eau, d'halogénures et d'imidazole.

Le nom du LI dépend toujours de la nature des radicaux qui le forment comme le montre la Figure 2.8.



Nom du cation	acronyme	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1-éthyl-3-méthylimidazolium	EMIM	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
1-butyl-3-méthylimidazolium	BMIM	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
1-hexyl-3-méthylimidazolium	HMIM	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>
1-octyl-3-méthylimidazolium	OMIM	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>
1-décyl-3-méthylimidazolium	DMIM	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>
1,3-dibutylimidazolium	BBIM	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
1-butyl-2,3-diméthylimidazolium	BMMIM	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>

Figure 2.8 Nomenclature des cations Imidazolium [37]

### 2.5.2 Propriétés physico-chimiques

Les LI intéressent les chercheurs grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulières. Ils présentent des avantages évidents. En effet, ils ont une grande stabilité thermique et chimique et une conductivité élevée. Par conséquent, il est pratiquement impossible de les évaporer. Ils peuvent dissoudre un grand nombre de composés organiques ou inorganiques. Les liquides ioniques sont des composés polaires. Il est assez difficile de tirer une règle générale de l'influence du cation et de l'anion sur la polarité du solvant. Certains liquides ioniques sont aussi polaires que l'eau [37].

On peut dire que la particularité des LI est la possibilité de modifier les propriétés physico-chimiques et obtenir les propriétés désirées tout simplement en utilisant la bonne combinaison de cation et d'anion [38]. On peut ainsi déterminer la température de fusion et la solubilité puisqu'elles dépendent fortement de la nature du cation et l'anion employé dans la synthèse du LI [39].

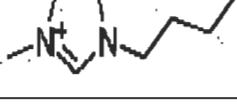
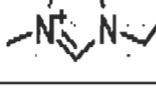
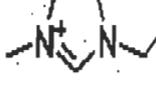
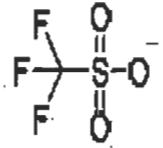
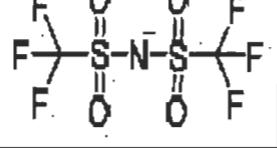
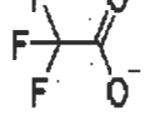
### 2.5.2.1 Point de fusion

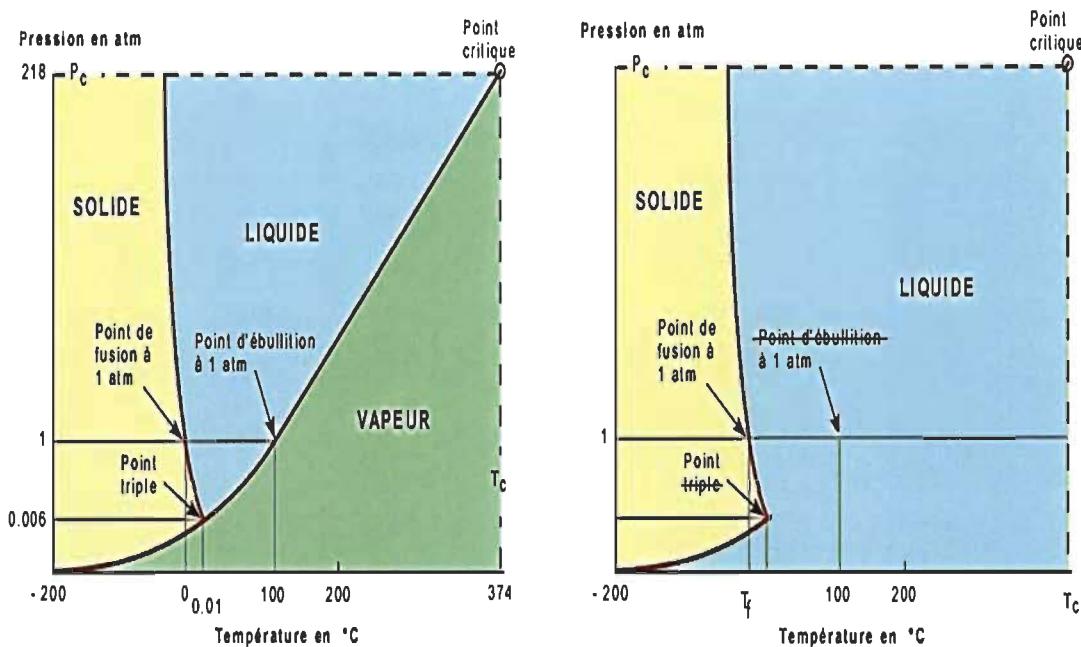
Un point de fusion inférieur à 100 °C est le critère clé pour définir un liquide ionique. Il est influencé par la distribution de charge sur les ions, la possibilité de liaisons hydrogène, et la symétrie des ions et les interactions de Van der Waals. La température de fusion des LI dépend de la nature du cation et de l'anion. Plus l'anion est volumineux, plus le point de fusion du LI est bas. Généralement, les LI qui sont constitués de cations à courte chaîne alkyle sont des solides cristallins dans lesquels les interactions sont fortes à l'état solide. Les LI ayant de longues chaînes alkyles se comportent comme des composés amphiphiles et conduisent à la formation de mésophases et de cristallisation en feuillets. On déduit donc que les liquides ioniques présentent un point de fusion variable en fonction des ions choisis. Le tableau 2.4 montre que le facteur primordial qui influence les propriétés physico-chimiques, c'est la taille des ions et leurs interactions. Plus ils sont petits, symétriques et coordonnants, plus le point de fusion sera élevé. Par contre, si les ions sont volumineux, non symétriques et peu coordonnants, les points de fusion et la viscosité seront faibles. Les points de fusion de différents LI sont présentés au tableau 2.4.

### 2.5.2.2 Stabilité thermique

Les sels qui montrent une stabilité thermique ont généralement un anion faiblement nucléophile ce qui permettent leur utilisation à de hautes températures qui pourrait atteindre 250 °C dans l'air. Dans une atmosphère inerte, les températures peuvent être supérieures à 400 °C. La nature des anions joue un rôle important dans la stabilité thermique des liquides ioniques. La température de décomposition diminue quand le caractère hygroscopique de l'anion augmente ( $\text{PF}_6^- > \text{NTf}_2^- \approx \text{BF}_4^- >$  ion halogénure). Les liquides ioniques n'ont pas d'état vapeur, mais plutôt une température de décomposition à l'état liquide, comme le démontre la figure 2.9.

Tableau 2.4 Point de fusion de divers sels d'ammonium [37]

Cation	Anion	Point de fusion (°C)
	Cl <sup>-</sup>	125
	Cl <sup>-</sup>	87
	Cl <sup>-</sup>	65
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	38
		-9
	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	6
		-3
		-14



**Figure 2.9 États des LI (tous les liquides ioniques) vs  $H_2O$**

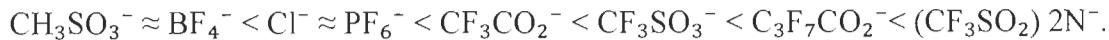
#### 2.5.2.3 Conductivité

Les liquides ioniques possèdent une excellente conductivité parmi les liquides en général, elle est généralement de l'ordre de  $10^{-1}, S.m^{-1}$ . La conductivité d'une espèce dépend non seulement du nombre d'ions porteurs de charges, mais aussi de leurs mobilités. Les liquides ioniques qui possèdent des ions volumineux sont moins mobiles. En effet, ceci amène à la diminution de la conductivité. L'augmentation de la température augmente la conductivité et diminue la viscosité. La conductivité des liquides ioniques est inversement proportionnelle à leur viscosité. Cela explique la diminution de la conductivité lorsqu'il y a une formation des paires d'ions et/ou l'agrégation des ions.

#### 2.5.2.4 Densité et viscosité

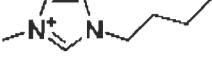
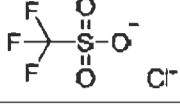
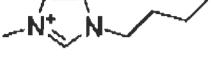
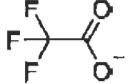
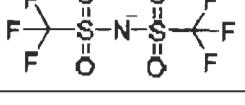
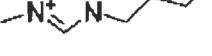
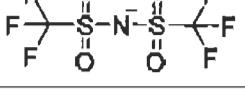
Les liquides ioniques sont généralement plus denses à température ambiante que l'eau avec des valeurs de 1 à  $1,6 \text{ g.cm}^{-3}$ . Leurs densités diminuent en augmentant la longueur de la chaîne alkyle du cation. La masse molaire des ions associés affecte la densité des liquides ioniques hydrophiles tandis que pour les LI hydrophobes, la masse molaire diminue aussi avec la longueur de la chaîne alkyle du cation.

L'ordre croissant de l'effet des anions sur la densité :



À noter aussi que l'augmentation de la teneur en eau provoque une diminution de la densité. La densité et la viscosité de différents LI sont présentées au tableau 2.5.

**Tableau 2.5 : Viscosité et densité de divers composés [40]**

Cation	Anion	Densité (g.mL <sup>-1</sup> )	Viscosité (cP)
Miel		1,36 (20°C)	2000 (20°C)
	$\text{PF}_6^-$	1,37 (30°C)	330 (20°C)
	$\text{BF}_4^-$	1,24 (30°C)	154 (20°C)
		1,29 (20°C)	90 (20°C)
Huile d'Olive		0,92 (20°C)	84 (20°C)
		1,21 (20°C)	73 (20°C)
		1,44 (20°C)	72 (20°C)
		1,43 (20°C)	52 (20°C)
H <sub>2</sub> O		0,99 (20°C)	1 (20°C)

Les LI présentent généralement une viscosité importante, dix fois supérieure aux solvants organiques usuels, cette viscosité diminue avec la température. Les LI possédant l'anion  $\text{NTf}_2^-$  sont moins visqueux que ceux avec  $\text{PF}_6^-$ . Ils sont plus denses que l'eau. La densité des LI diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyle portée par le cation imidazolium augmente, par contre lorsque la température diminue, la densité augmente linéairement.

Pour assurer une mobilité ionique élevée, il faut que la viscosité soit la plus faible possible. Les mesures de viscosité sont réalisées à des températures allant du point de fusion jusqu'à 150 °C. Les faibles valeurs de viscosités sont attribuées aux faibles forces de cohésion et d'interactions électrostatiques (Van der Waals et liaisons hydrogène). Ces interactions sont plus faibles dans les sels contenant des atomes de fluor et aussi chez les ammoniums à courte chaîne alkyle.

### 2.5.3 Solubilité dans les solvants

La solubilité des LI dans l'eau et les solvants organiques est un paramètre essentiel pour le développement des LI en tant que solvants de réaction. La miscibilité des substrats dans les LI dépend de la nature du cation et de l'anion.

#### 2.5.3.1 Solubilité dans les solvants organiques et l'eau

Les LI sont miscibles avec les alcools à courtes chaînes et les cétones, le dichlorométhane, l'acétonitrile et le tétrahydrofurane (THF), dont la constante diélectrique est supérieure à 7, selon la nature du cation et/ou de l'anion, ils peuvent être non miscible avec les alcanes, le dioxane, le toluène et l'éther ( $\epsilon_r = 6$ ), on les nomme les solvants frontière.

Tableau 2.6 .

Dans le but d'étudier les propriétés de solvatation des Li, le caractère hydrophile ou hydrophobe est avéré un paramètre important. La solubilité des liquides ioniques à base de N, N'- dialkylimidazolium dans l'eau dépend de la nature de l'anion et de la longueur de la chaîne alkyle porté par le cation imidazolium, ce qui rend quelques liquides ioniques solubles dans l'eau et certains solvants organiques. Les liquides ioniques ont la propriété d'absorber de l'eau contenue dans l'atmosphère ou les noms aussi (hygroscopiques). La force des interactions hydrogène entre l'anion du liquide ionique et l'eau augmente selon l'ordre  $\text{PF}_6^- < \text{SbF}_6^- < \text{BF}_4^- < \text{NTf}_2^- < \text{ClO}_4^- < \text{Tf}^- < \text{NO}_3^-$ . Le tableau 2.7 présente la solubilité de différents LI dans l'eau.

**Tableau 2.6 Solubilité des solvants organiques dans les LI [37]**

% Poids	<b>BMIMBF<sub>4</sub></b>	<b>BMIMPF<sub>6</sub></b>	<b>EMIMNTf<sub>2</sub></b>	<b>BMIMNTf<sub>2</sub></b>
<b>Benzène</b>	29,3	29-35,5	37,4	39,5
<b>Toluène</b>	7,5	1,5	28,6	33,6
<b>Cyclohexane</b>	X	1,7-5,6	X	X
<b>1-Hexane</b>	0,9	1,6	X	3,9
<b>Hexane</b>	X	1,8	X	X

**Tableau 2.7 Solubilité des LI dans l'eau [37]**

	<b>Solubilité dans l'eau (%poids)</b>
<b>BMIMPF<sub>6</sub></b>	2,12±0,02
<b>BMMIMPF<sub>6</sub></b>	1,6±0,2
<b>BMIMNTf<sub>2</sub></b>	0,77±0,05
<b>BMMIMNTf<sub>2</sub></b>	0,61±0,03

#### 2.5.4 Toxicité

L'estimation de la toxicité des liquides ioniques dans les différents systèmes d'essai biologiques (micro-organismes, enzymes, algues, plantes, crustacés, cellules, animaux mammifères) a démontré que la toxicité dépend de la structure chimique du LI. Les études ont pu démontrer que l'écotoxicité des sels imidazolium augmente avec la longueur de la chaîne alkyle associée, malgré les avantages de ces liquides, leurs propriétés toxiques restent encore à être mieux évaluées [41].

### 2.5.5 Application des liquides ioniques dans les procédés de séparation

Depuis 20 ans, plusieurs applications des liquides ioniques ont été développées dans différents domaines, dont l'électrochimie, la chimie organique et les sciences environnementales. Actuellement, une grande attention est donnée aux applications du domaine des sciences séparatives, dont l'extraction liquide–liquide, la chromatographie en phase liquide et gazeuse ainsi que l'électrophorèse capillaire.

Malheureusement, il y a peu de recherches concernant l'extraction de composés contenus dans des biomasses bactériennes par les liquides ioniques. Dans le cadre de cette recherche, nous allons comparer nos résultats à ceux obtenus par des solvants organiques. Le premier objectif de ce travail est de substituer les solvants organiques par les liquides ioniques et le deuxième est de comparer les rendements d'extraction des boues papetières par rapport au rendement des biomasses bactériennes obtenues au laboratoire du CRML par des souches spécifiques.

### 2.5.6 Extraction liquide-liquide

De nombreuses études ont été portées sur l'utilisation des liquides ioniques afin de remplacer les solvants organiques classiques. En effet, ces recherches ont surtout étudié l'influence de la longueur de la chaîne alkyle et la nature de l'anion du liquide ionique.

Par la suite. Wei et coll ont montré que l'extraction des cations métalliques  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  dans du  $[\text{BMIM},\text{PF}_6]$  avec de la dithizone comme agent chélatant était plus efficace dans le liquide ionique que dans le chloroforme, avec la possibilité de recycler le liquide ionique par des extractions des ions métalliques en faisant varier le pH.[42]

Les liquides ioniques ont aussi été appliqués à de nombreuses extractions de composés organiques comme les dérivés de benzène substitués ou les hydrocarbures poliaromatiques (HAP).[43].

## **Chapitre 3 - Hypothèses et objectifs**

### **3.1 Hypothèses**

Cette recherche est basée sur les hypothèses suivantes :

1. La production des PHAs peut être réalisée à partir des boues secondaires papetières. Les nutriments et polluants organiques des boues peuvent être convertis en plastiques biodégradables.
2. Il est possible d'extraire avec les liquides ioniques le PHA contenu dans les boues secondaires papetières et d'obtenir du PHA à un niveau élevé de pureté.
3. Après l'extraction du PHA, plus de 90 % du liquide ionique utilisé pourra être récupéré sans distillation.

### **3.2 But**

Le but de ce projet est de développer une méthode d'extraction des bioplastiques bactériens contenus dans les boues biologiques papetières, fermentées ou non, en utilisant des liquides ioniques facilement récupérables.

### **3.3 Objectifs spécifiques**

Les objectifs de ce projet sont :

1. Cultiver une bactérie productrice du PHA dans les boues secondaires d'une papetière et déterminer les paramètres de fermentation tels que: le pH, l'agitation, la température et les nutriments.
2. Extraire le PHA à partir des boues secondaires papetières, fermentées ou non avec une bactérie productrice de PHA, avec un liquide ionique et
3. évaluer la capacité de récupération des PHAs et leurs puretés avec des mélanges LI / H<sub>2</sub>O et LI / EtOH.

## **Chapitre 4 - Matériels et méthodes**

### **4.1 Méthodes de production et récupération du PHA**

Plus de 90 microorganismes sont capables d'accumuler dans leurs cellules des réserves de carbone et d'énergie sous forme de polyhydroxyalcanoates (PHA) [44]. Ces derniers s'accumulent dans les cellules bactériennes dans des conditions d'excès de carbone et un apport limité d'autres substances nutritives. Lorsque les microorganismes cessent de se multiplier, ils commencent à produire du PHA. Nous avons utilisé une souche spécifique bactérienne nommée *Cupriavidus necator*, capable de produire des PHA, afin de comparer son rendement avec celui des bactéries accumulatrices de PHA qui sont présentes dans les boues secondaires papetières.

#### **4.1.1 Microorganismes producteurs de PHA**

La souche sélectionnée pour ce travail est *Cupriavidus necator* (ATCC 17699). Il a été démontré, dans la littérature, que cette souche est la meilleure bactérie productrice de PHA [45]. C'est une bactérie Gram négative qui produit les deux polymères PHB et PHV à un pH optimum de 7. Elle produit les PHA dans des conditions d'excès de carbone et un apport limité d'autres substances nutritives[46].

#### **4.1.2 Paramètres de fermentation en erlenmeyers**

Les fermentations sont réalisées en fioles Erlenmeyer dans un incubateur à 35°C pendant 30 heures. La souche est d'abord cultivée dans un milieu d'enrichissement (bouillon trypsique soja). Ensuite, un aliquot de la culture d'enrichissement est utilisé pour inoculer le milieu de culture destiné à la production des PHA (milieu synthétique contenant du citrate). La nouvelle culture est ensuite utilisé comme inoculum pour les fermentations à l'étude. Cette étape permet de réduire la période d'adaptation qui est l'une des phases de croissance des bactéries. La croissance cinétique d'une bactérie se fait en quatre phases successives : la phase de latence où les bactéries commencent à s'adapter aux conditions de croissance; la phase exponentielle ou phase logarithmique qui est caractérisée par le dédoublement des cellules; la phase stationnaire où le taux de croissance bactérienne

ralentit à cause de l'épuisement des nutriments et l'accumulation des produits toxiques ; et la phase de déclin où commence la mortalité des bactéries [47].

Dans le milieu synthétique de production des PHA, une source de carbone était introduite (le citrate). Lorsque l'approvisionnement en nutriment et en carbone dans le milieu est épuisé la bactérie commence à produire des PHB et PHV et les conservent sous forme de réserve pour une consommation ultérieure c'est-à-dire après 30 heures de fermentation. C'est à ce moment que l'on doit arrêter la fermentation avant la consommation de ce produit.

Dans les erlenmeyers, la croissance est mise à son optimum grâce au maintien de l'agitation et de l'aération qui permettent un contact entre la phase biotique et la phase abiotique du système. Cette opération favorise la distribution homogène des micro-organismes, les substrats, les produits et le transfert de chaleur [48].

La plupart des bactéries produisant du PHA ne peuvent pas tolérer des niveaux de pH minimal. *Cupriavidus necator*, exige un pH de 6,0 à 8, donc l'adaptation peut être nécessaire pour un meilleur rendement [49]. Il a été démontré que, si le pH de l'hydrolysat enzymatique est ajusté légèrement à l'aide de NaOH ou un tampon de phosphate, la souche sera capable de produire le bioplastique. Pour comparer l'efficacité de production de *Cupridivus necator* dans le milieu de production de PHA, le milieu TSB (Tryptic Soy Broth) est utilisé comme un milieu témoin. La composition des deux milieux de culture utilisés est décrite dans les tableaux 4.1 et 4.2.

Il existe plusieurs méthodes d'identification du PHA. La première est qualitative, utilisée pour des résultats rapides afin de s'assurer de la présence du PHA dans la bactérie. Il existe également une grande variété de techniques qui fournissent des informations préliminaires sur la présence de PHA. Après viens la méthode quantitative. L'utilisation d'une méthode de test quantitative permet de confirmer non seulement la présence de PHA, mais aussi indiquer la quantité exacte ainsi que le type exact du PHA.

**Tableau 4.1 Composition du milieu synthétique [50]**

Ingrédients	Quantité (g/L)
MgSO <sub>4</sub>	1,2
Citrate	1,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,3
Élément en trace (10 ml) :	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2,25
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,1

**Tableau 4.2 Composition du milieu TSB [51]**

Ingrédients	Quantité (g/L)
Bacto Tryptone (digestion pancréatique de caséine)	17,0
Bacto Soytone (digestion peptique de semoule de soja)	3,0
Glucose (dextrose)	2,5
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate bipotassique d'hydrogène	2,5

#### 4.1.3 Méthodes d'identification des souches bactérienne accumulant le PHA

##### 4.1.3.1 Coloration avec le bleu de Nil

Comme méthode qualitative de détection du PHA, nous avons utilisé le Bleu de Nil. Nous l'avons préféré au Noir de Soudan en raison de sa capacité supérieure à se lier à des dépôts d'énergie de surface élevée tels que le PHA. Il est également préférable au noir de Soudan en raison de sa fluorescence orange vif à 360/460nm. La technique du Bleu de Nil a permis de détecter la présence du PHA et de donner un aperçu approximatif de la quantité présente.

Le principe de la coloration par le Bleu de Nil repose sur le fait que les granules de PHA colorés présentent alors une forte fluorescence. Pour se faire nous avons préparés 0,5 g de Bleu de Nil et ajouter 50 ml d'eau déminéralisée dans un bêcher et le mettre dans l'incubateur à 55°C pendant 1 h, par la suite nous avons préparé 4 ml d'acide acétique

auquel 50 ml d'eau déminéralisée ont été ajoutés. Après avoir déposé les colonies de la culture de notre souche bactérienne *Cuprividus necator* sur une lame avec une goutte d'eau, nous l'avons chauffé légèrement et par la suite trempé la lame dans le bêcher de Nile Blue (1 %) pendant 20 min dans un incubateur à 55°C. Après la lame est mise dans un bêcher d'acide acétique pendant 1 min. La lame est rincée avec de l'eau déminéralisée et séchée L'observation des cellules et des granules du PHA se fait par microscopie à fluorescence (Microscopes, composés debout; Fisher Scientific MICROMASTER II; Objectifs: 4X, 10X, 40X, 100X immersion dans l'huile; Corps: binoculaire; Oculaire: 10X grand champ, norme DIN; Dimensions: 9,5L x 7W x 14 in,h (24 x 18 x 35,5 cm); pour 110V 50/60 Hz).

La croissance bactérienne réalisée au laboratoire atteignait son maximum à 30 heures. Ce temps définit la phase exponentielle de la croissance de *Cuprividus necator* et il s'agit du moment idéal pour arrêter la fermentation et collecter le PHA.

#### **4.2 Méthode de récupération et traitement des boues secondaire papetière**

L'industrie papetière utilise environ de 5 à 20 m<sup>3</sup> d'eau par tonne de papier produit, ce qui fait d'elle l'industrie rejetant la plus grande quantité d'effluents [52].

Les échantillons de boues sont recueillis au bassin secondaire à l'usine Kruger de Trois-Rivières (Québec. Canada). Cette usine produit du papier journal de pâte thermomécanique. Les échantillons ont été prélevés dans des contenants de 20 litres et conservés à une température de 4 °C jusqu'à leur utilisation.

##### **4.2.1 Préparation des échantillons de boues papetières**

Deux étapes sont essentielles afin de préparer les boues industrielles à l'extraction du PHA soit la centrifugation et la lyophilisation.

La première est une technique qui permet d'exposer les échantillons à de fortes accélérations ce qui permet par la suite la séparation des constituants. Le but de passer par cette étape est d'éliminer l'excès de l'eau existant dans les boues secondaires, pour qu'ensuite l'étape de lyophilisation soit plus facile. L'échantillon liquide (Boue secondaire) de

300 ml est centrifugé dans la centrifugeuse : Heraeus Megafuge 40 Centrifuge by Thermo Fisher Scientific Capacity 3L) sous conditions suivantes : 10,000 rpm pendant 10 min à une température de 5 °C. Après cette procédure, l'échantillon est congelé et prêt à être analysé.

Le principe de la lyophilisation consiste à éliminer progressive de l'eau du produit préalablement congelé. Le but est le passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. La raison pour laquelle cette étape est utilisée est de rendre l'extraction plus facile et efficace, notant bien que cette étape est coûteuse à grande échelle. Ce traitement permet également de fragiliser la structure des bactéries.

#### **4.2.2 Méthodes d'extraction et de purification du PHA**

Nous devons, dans un premier temps, extraire tous le PHA et le purifier par une méthode efficace et éprouvée. Cette méthode sera la référence à laquelle nous comparerons nos nouveaux procédés d'extraction.

##### **4.2.2.1 Extraction et purification par solvant**

Le PHA est soluble dans peu de solvants, notamment dans les solvants halogénés. De plus, en raison de la forte viscosité des solutions résultantes, il nécessite de grandes quantités de solvant. Par conséquent, l'extraction par solvants est une technique consommatrice de grandes quantités de solvants toxiques et polluants [53].

Pour cette étude, nous avons utilisé le chloroforme. L'extraction liquide-solide avec du chloroforme chaud est utilisée pour l'isolation du PHA de la biomasse [53]

Le chauffage facilite l'extraction du PHA et maximise les coefficients de diffusion et donc la vitesse et le rendement d'extraction. L'extraction est réalisée en continu à l'aide d'un extracteur Soxhlet.

Plusieurs essaies au laboratoire CRML ont mené à ce que l'extraction du PHB stocké dans *Cupriavidus necator* a été réalisée sous les conditions suivantes : 60 °C avec 20 ml de CHCl<sub>3</sub> mélanger avec 1 mg de PHB, le mélange a été mis dans un incubateur avec agitation continue pendant 3 h. Le rendement de l'extraction a été 75 %. Nous avons

purifié nos échantillons par des lavages successifs à l'éthanol et/ou au méthanol afin de dissoudre les résidus des bactéries ainsi nous favorisant l'extraction ultérieure.

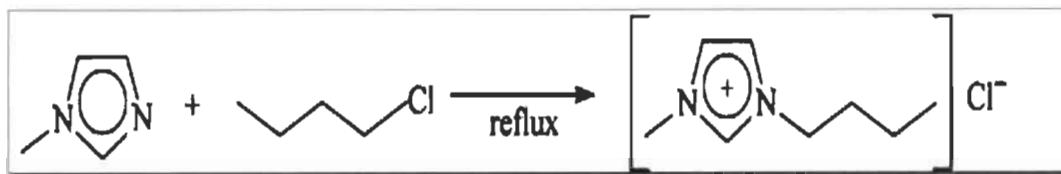
### 4.3 Synthèse du liquide ionique

Dans cette partie, on s'est basé sur LI déjà préparé au laboratoire par les agents de recherches. Le principe de la synthèse était par substitution nucléophile. Il s'agit de la quaternisation d'une amine par un halogénure d'alcane. La substitution nucléophile met en jeu les imidazoles ainsi que les halogénures d'alcanes. Le tableau 4.3 montre quelques exemples de synthèse de LI à base d'imidazole et de chloroalcanes.

**Tableau 4.3 Synthèse du LI [C4C1Im][Cl]**

1 équivalent	1.2 équivalent	LI	Nomenclature
1-méthylimidazole	chlorobutane	[BMIM][Cl]	1-Butyl-3-methylimidazolium chloride
1-méthylimidazole	chlorohexane	[BMIM][Cl]	1-Hexyl-3-methylimidazolium chloride
1-méthylimidazole	chlorooctane	[BMIM][Cl]	1-Octyl-3-methylimidazolium chloride

La synthèse du liquide ionique été réalisée dans les laboratoires du CRML par l'agent de recherche *Benjamin Boens*. Les réactifs sont placés dans un ballon de 300ml à 70°C sous agitation pendant environ 72 heures, après nous avons obtenu une solution visqueuse. L'excès de réactifs et les impuretés sont éliminés par évaporateur rotatif à 50 °C pendant environ 2 heures. La réaction est présenté à la figure 4.1.



**Figure 4.1** Synthèse du Li  $[\text{C}_4\text{C}_1\text{Im}][\text{Cl}]$  par substitution nucléophile[54]

#### 4.4 Extraction par un liquide ionique

Les extractions avec les liquides ioniques se font pendant 24 heures avec un mélange de 5 mg de boues dans 20 ml de Li. Le mélange a été mené à 100°C, dans un bloc chauffant, sous agitation.. Les échantillons ont été laissés sous la hotte pendant tous au long de la réaction d'extraction.

Après l'écoulement du temps de réaction, les échantillons à traiter ont été mélangés avec de l'éthanol et agités de 3 à 5 min afin d'éliminer toutes les impuretés et essayé de séparer le liquide ionique  $[\text{C}_4\text{C}_1\text{Im}][\text{Cl}]$  de l'extrait. La filtration est réalisée par la suite à l'aide du papier Watman n°2, cette étape est repétée plusieurs fois afin de purifier le produit final. Les échantillons sont conservés dans un dessiccateur pour analyses.

#### 4.5 Méthodes d'analyses du PHA

Plusieurs techniques sont utilisées pour l'analyse structurelle des PHAs, ces techniques sont aussi employées particulièrement pour l'identification et la caractérisation de nouveau PHA.

##### 4.5.1 Analyses du PHA par FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformer de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, ce qui permet d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Cette méthode d'analyse est simple à mettre en œuvre et non destructrice. Cette méthode permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques que les matériaux inorganiques. Les spectres IR ont été réalisés sur un appareil Perkin Elmer System 2000 FTIR Spectromètre SPECTRUM 1000.

#### 4.5.2 Analyses du PHA par RMN<sup>1</sup>H

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de détection des propriétés de certains noyaux atomiques possédant un moment magnétique donnant lieu au phénomène de résonance (par exemple <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F, <sup>31</sup>P,...). Ces noyaux atomiques absorbent l'énergie du rayonnement et la reflètent sous forme de résonance correspondant à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Ce phénomène permet donc l'observation des propriétés quantiques magnétiques des noyaux dans les phases gaz, liquide ou solide. Les échantillons de ce travail ont été dissous dans le chloroforme deutéré CDCl<sub>3</sub>. Les spectres de RMN<sup>1</sup>H ont été enregistrés sur un spectromètre Varian-NMR à 300 MHz.

#### 4.5.3 Analyses du PHA par ATG

L'analyse thermogravimétrique (TGA) est une technique qui permet la mesure du changement de masse des polymères sous une variation de température. Cette mesure permet la caractérisation de la composition du matériau ainsi que sa stabilité thermique. Les analyses ont été effectuées sur un appareil Diamond Pyris TGA/DTA de Perkin-Elmer, avec des températures allant de 105°C jusqu'à 350°C, sous condition inerte (Azote).

#### 4.5.4 Analyses du PHA par GPC

La chromatographie sur gel perméable ou GPC (GPC : Gel Permeation Chromatography) est basé sur la séparation des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique (Masse molaire). Le degré de polymérisation c'est le nombre de maillons de la chaîne ainsi formée. La polydispersité est la distribution des degrés de polymérisation autour d'une valeur moyenne du polymère [55]. Les analyses ont été réalisées avec un GPC Agilent 390-MDS avec une variété de systèmes de solvants et de détecteurs; Agilent PL-GPC 220 du système à haute température et l'unité de filtration à chaud.

## **Chapitre 5 - Résultats et discussions**

### **5.1 Culture de *Cupriavidus necator* et identification du bioplastique produit**

*Cupriavidus necator* a été choisi pour cette étude en raison de sa capacité potentielle à produire du PHA. Cette souche est capable de produire du PHB dans des conditions de fermentation particulières [56].

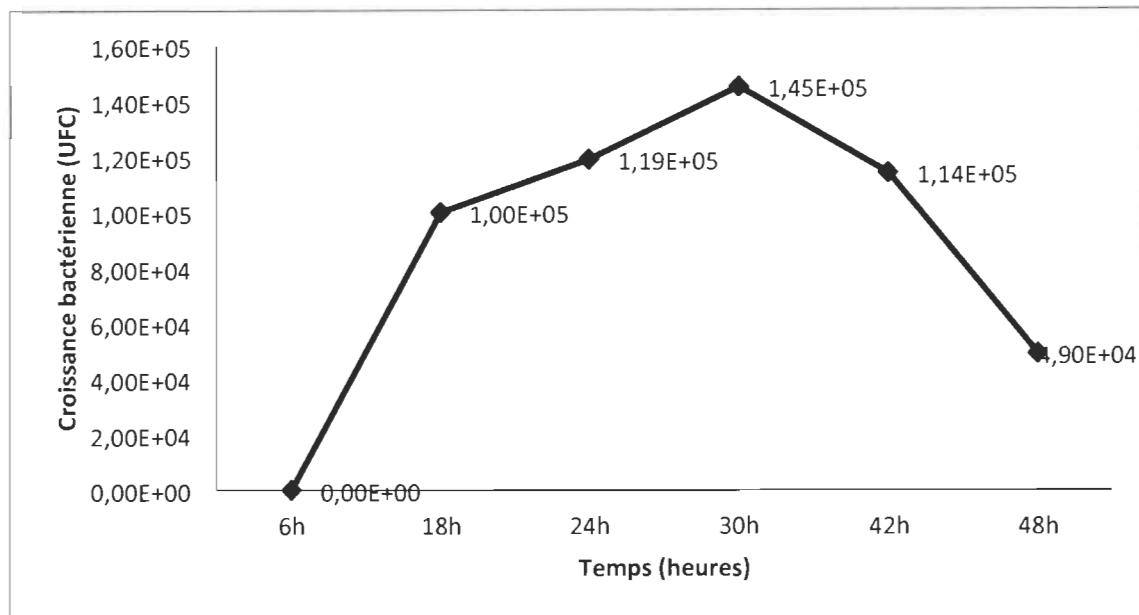
#### **5.1.1 Croissance de *Cupriavidus necator***

Selon les résultats de la Figure 5.1, on constate que la souche bactérienne atteint son maximum de production à 30 heures avec une concentration de cellules viables atteignant  $1.4 \times 10^5$  UFC/mL dans le milieu synthétique (milieu 1). Pour le milieu TSB (milieu 2), selon la Figure 5.2, la souche atteint sa croissance maximale à 24 heures, mais avec une concentration de cellules de seulement  $1.2 \times 10^4$  UFC/mL.

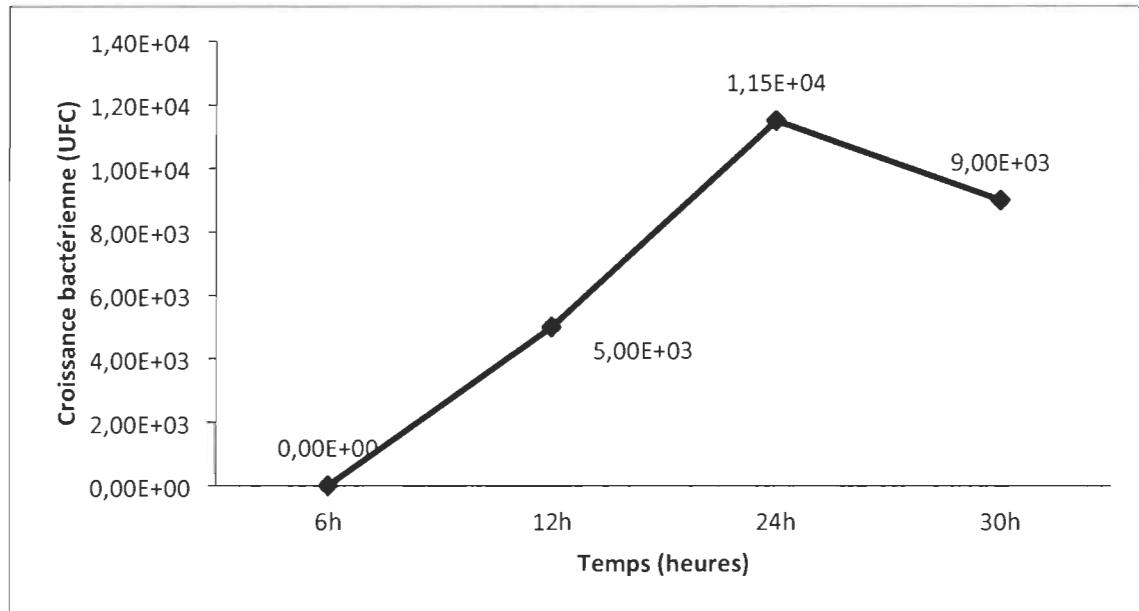
On déduit donc que le milieu le plus favorable pour la croissance de la souche *Cupriavidus necator* est le milieu synthétique. Les bouillons fermentés obtenus avec le milieu 1 ont été utilisés pour les expériences de caractérisation des bioplastiques.

#### **5.1.2 Résultats de production des PHAs**

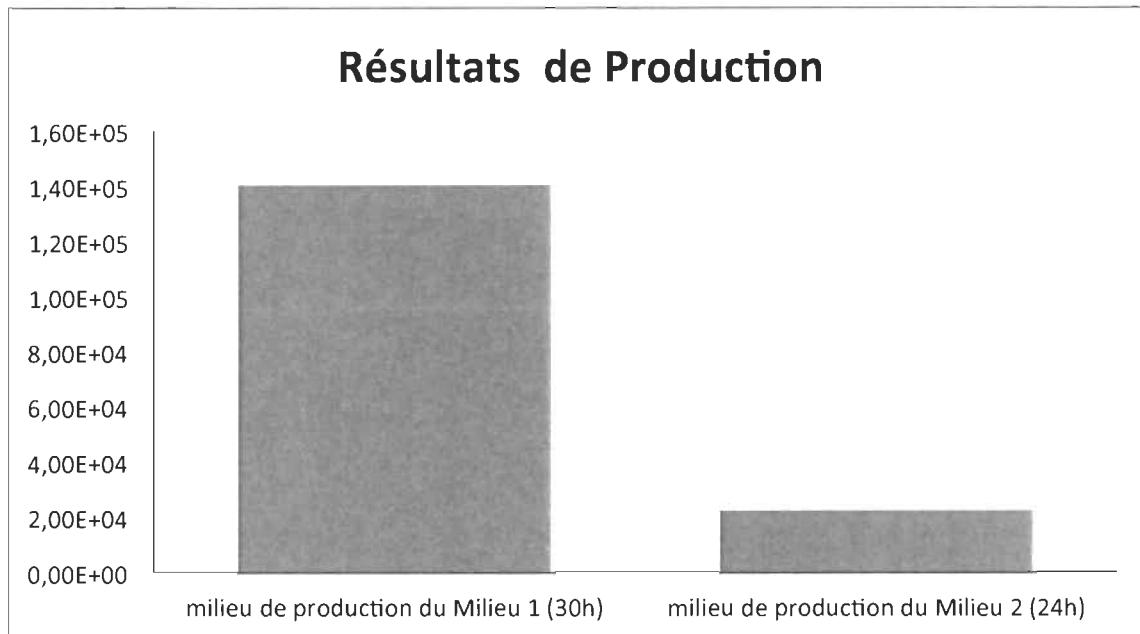
Selon les résultats, la bactérie croît mieux dans le milieu 1 et elle est plus productive dans ce même milieu après la fermentation sur le milieu synthétique. Ceci s'explique par la composition des milieux. *C. necator* est capable de produire des polymères dans des conditions de limitation en azote. Le milieu TSB est un milieu riche en azote. Il est donc un bon milieu de croissance pour la souche, mais pas pour la production des polymères. La figure 5.3 montre que la production est supérieure dans le milieu 1.



**Figure 5.1** Croissance de *Cupriavidus necator* en fonction du temps dans le milieu synthétique (milieu 1)



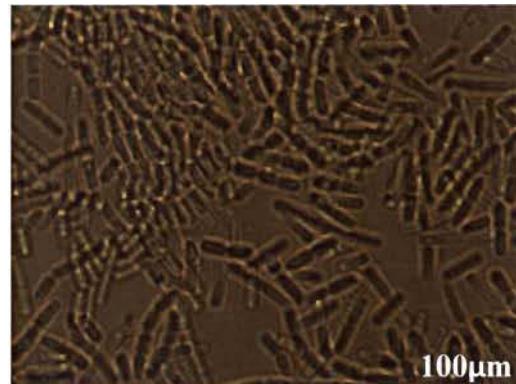
**Figure 5.2** Croissance de *Cupriavidus necator* en fonction du temps dans le milieu TSB (milieu 2)



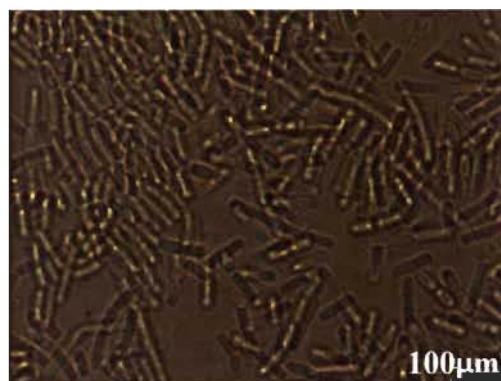
**Figure 5.3 Quantité maximale de cellules viables de *Cuprividus necator* observée dans les deux milieux**

Afin de détecter la présence du PHA dans la culture, le colorant « bleu de Nil » a été utilisé. Le colorant bleu de Nil a une capacité à se lier à des dépôts de composés hydrophobes en excès et les dépôts à haute énergie de surface telle que le PHA de fluorescence orange après la liaison. La technique du bleu de Nil a permis de détecter la présence de PHA dans les échantillons.

La figure 5.4 montre un échantillon de milieu synthétique fermenté où on ne voit pas clairement les granules de PHA dans les cellules de *C. necator*. À la figure 5.5, on peut observer le PHA avec la fluorescence jaune (orangé) des granules des PHAs après l'utilisation du bleu de Nil.



**Figure 5.4** Souche bactérienne sans coloration avec le bleu de Nil

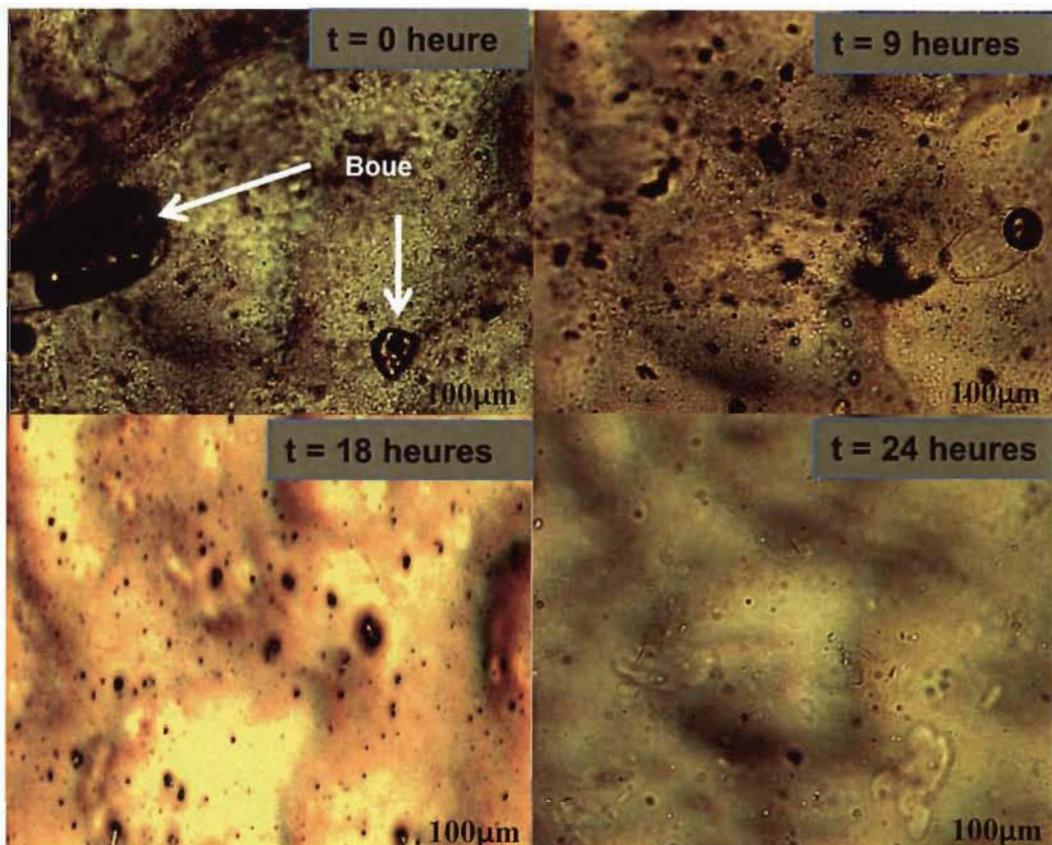


**Figure 5.5** Souche bactérienne avec coloration avec le bleu de Nil

Les bouillons fermentés obtenus ont ensuite été utilisés pour les expériences d'extraction présentées à la section suivante. Les PHBs ont été extraits et ont été comparés avec ceux trouvés dans les boues papetières.

## 5.2 Solubilisation et extraction dans les liquides ioniques

Il est important de s'assurer que le PHA est soluble dans le liquide ionique afin de l'extraire. Un essai a été fait en ajoutant du Li [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>Im][Cl] aux boues secondaires papetières et en chauffant ensuite à 100°C pendant 24h. Les photographies de la figure 5.6 montrent que la boue bactérienne est complètement soluble dans ce liquide ionique après 24 heures. Étant donné que toute la matière est soluble, il est nécessaire de séparer le PHA des autres composantes.



**Figure 5.6** Essai de solubilisation dans le liquide ionique  $[C_4C_1Im][Cl]$

### 5.2.1 Analyse RMN et FTIR

Les spectres IR et RMN de l'extrait au chloroforme du PHB commercial, de biomasse bactérienne ainsi que de boue secondaire papetière provenant de l'usine Kruger de Trois-Rivières ont été comparés. Par la suite, la même comparaison a été effectuée avec le liquide ionique.

La figure 5.7 montre la grande similitude entre le PHB standard et les extraits au chloroforme de la biomasse bactérienne et des boues papetières. Les principales bandes caractéristiques du PHB sont présentes dans tous les échantillons. Ces principales bandes sont représentées dans le tableau 5.1. Par contre, le spectre FTIR de l'extrait au Li montre plus d'impuretés (matières inorganiques non dégradées par les cellules) que ceux au chloroforme, comme on peut le constater à la figure 5.8. Les bandes caractéristiques du PHB sont encore bien présentes.

Tableau 5.1 Principales bandes du PHB en FTIR

Bandé ( $\text{cm}^{-1}$ )	Fonction
1448	$\text{CH}_2$
1371	$\text{CH}_3$
1719	$\text{C=O}$
1000-1300	$\text{C-O}$

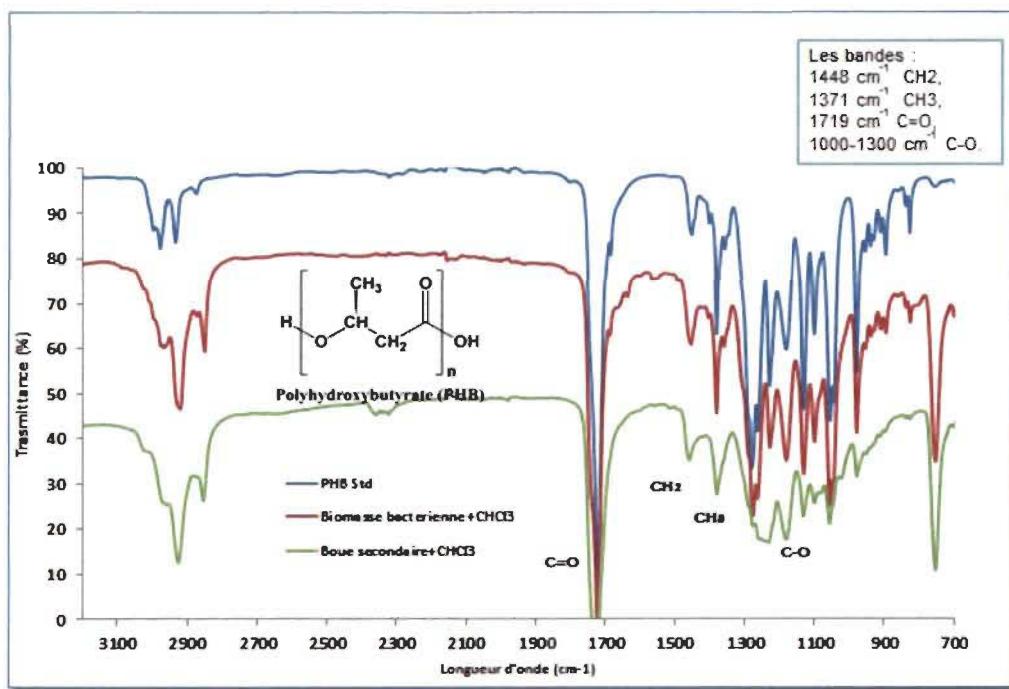
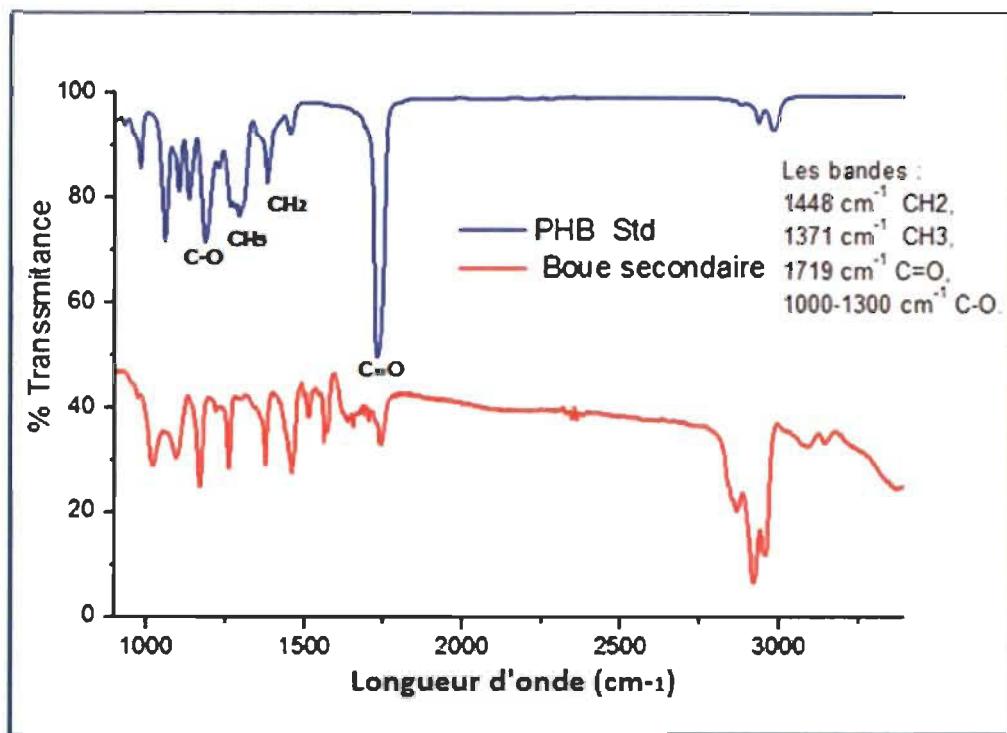


Figure 5.7 FTIR comparatif du PHB standard et des extraits au chloroforme de la biomasse bactérienne ainsi que des boues papetières.



**Figure 5.8** FTIR comparatif de la composition des boues papetières extraites au Li et du PHB standard.

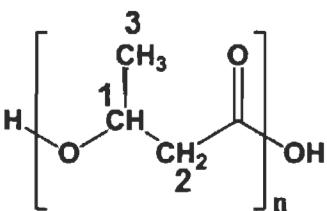
Ces analyses FTIR suggèrent que les biopolymères produits par fermentation bactérienne et ceux présents directement dans les boues papetières ont une structure pratiquement identique que le PHB standard. Cela donne une évaluation qualitative de leur composition structurelle. Les pics observés dans le spectre correspondent aux différents types d'atomes de carbone présents dans la structure de PHB (C=O, CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>).

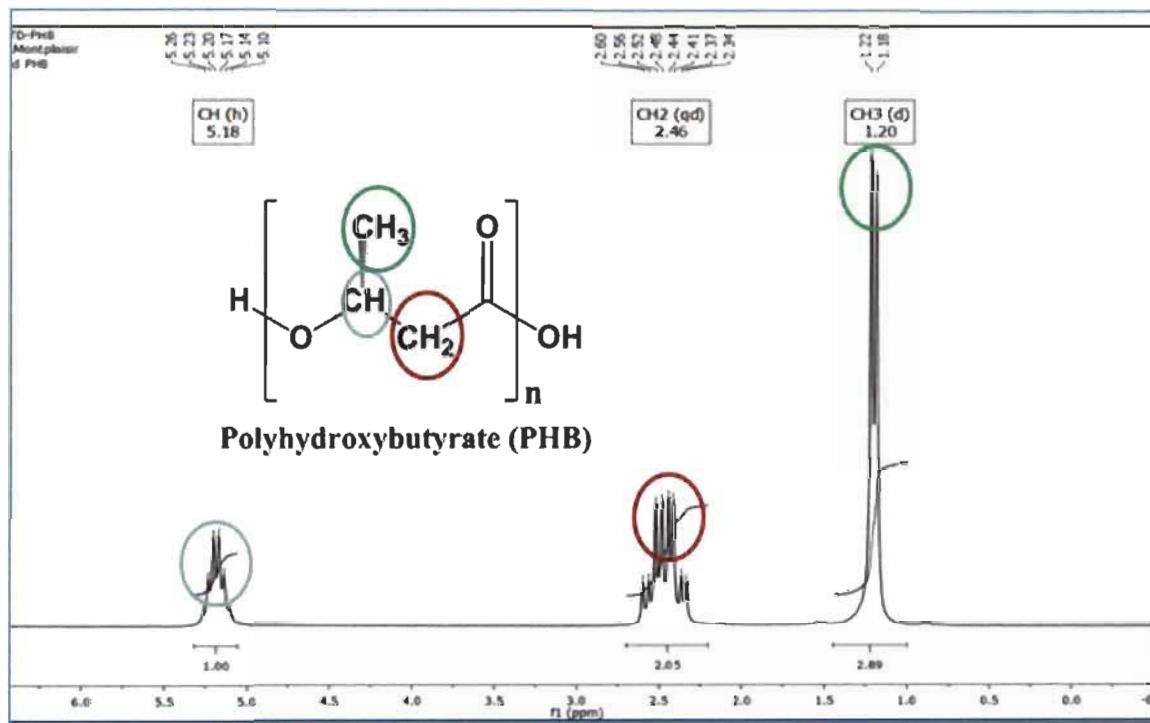
Les bandes caractéristiques de PHB ont été obtenues pour tous les échantillons. La bande à 1448 cm<sup>-1</sup> correspond à la déformation asymétrique de la liaison du groupe CH<sub>2</sub>, tandis que la bande à 1371 cm<sup>-1</sup> est l'équivalent correspondant aux groupes CH<sub>3</sub>. La bande trouvée à 1719 cm<sup>-1</sup> correspond à l'étirement de la liaison C=O, tandis qu'une série d'intenses bandes situées à 1000-1300 cm<sup>-1</sup> correspondent à l'étirement de la liaison C-O de la fonction ester. Les bandes de grande pertinence, telles que celles trouvées de 2800 à 3080 cm<sup>-1</sup>, correspondent aux groupements OH ou à l'adsorption de l'eau sur l'échantillon.

Ces résultats permettent de confirmer la présence du PHB dans les extraits de la biomasse de *C. Necator* et de boues. Le LI [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>Im][Cl] s'avère donc être efficace pour l'extraction du PHB dans les deux matrices, soit la biomasse de *C. Necator* et les boues. Le résultat le plus intéressant est que les boues secondaires papetières de l'usine Kruger de Trois-Rivières contiennent déjà des PHBs sans aucun conditionnement. Ce biopolymère déjà présent dans ces boues peut être valorisé pourvu que sa quantité et sa qualité soient appropriées.

Les analyses de spectroscopie <sup>1</sup>H RMN des biopolymères produite par fermentation bactérienne par la souche *C. Necator* et celles issus directement des boues papetières de l'usine Kruger de Trois Rivières ont permis une évaluation de leurs structures. Les pics observés dans les spectres correspondent aux différents types de protons présents dans la structure de PHB (CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>). En outre, les signaux de déplacement chimique obtenu dans le présent travail sont similaires avec ceux obtenus par le chercheur Doi [57]. La figure 5.9 présente le spectre RMN <sup>1</sup>H du PHB standard et le tableau 5.2 les principaux pics. La figure 5.10 permet de comparer le spectre du PHB standard avec celui des boues secondaires et de la culture bactérienne. Dans ces deux derniers cas, on observe les mêmes pics à plus faible intensité ainsi que quelques pics supplémentaires démontrant la présence d'impureté.

**Tableau 5.2 Principaux pics du PHB en RMN <sup>1</sup>H**

 <b>Polyhydroxybutyrate (PHB)</b>			
Position du proton	Nombre d'intégration	Déplacement chimique δ (ppm)	Multiplicité des pics
1	3	1,217	Sext triplet
2	2	2,519	Multiplet
3	1	5,232	Doublet



### 5.2.2 Analyse thermogravimétrique

La dégradation thermique du PHB a été étudiée à l'aide de l'analyse thermogravimétrique (TGA). Le biopolymère a d'abord été extrait avec le Li. Les différents échantillons ont été préchauffés à une température de 105 °C et maintenus pendant 5 minutes. Par la suite, la température a été augmentée de 5°C par minute jusqu'à 600°C pendant 15 minutes, et pour enfin être augmentée à nouveau de 5°C par minute pour atteindre 1000°C après 10 minutes.

Les résultats de l'ATG du PHB standard montrent un seul point de décomposition à une température de 260°C comme le confirme la figure 5.11. La dégradation débute à une température de 195°C et se termine à 290°C (sur une étendue de 95°C). Il s'agit ainsi d'un produit pur puisque tout le PHB s'est décomposé.

Figure 5.9 RMN  $^1\text{H}$ du Polyhydroxybutyrate (PHB) standard

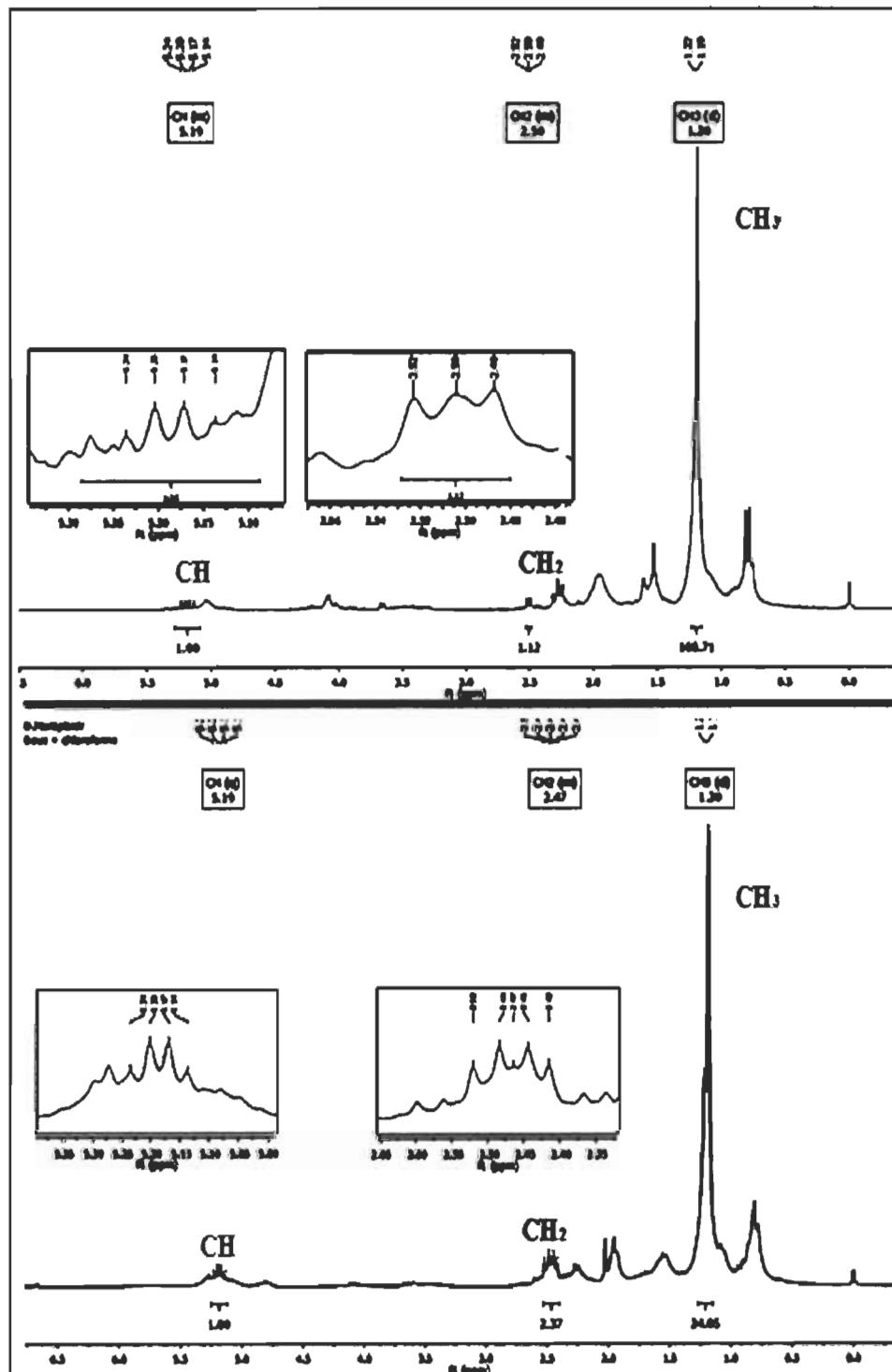
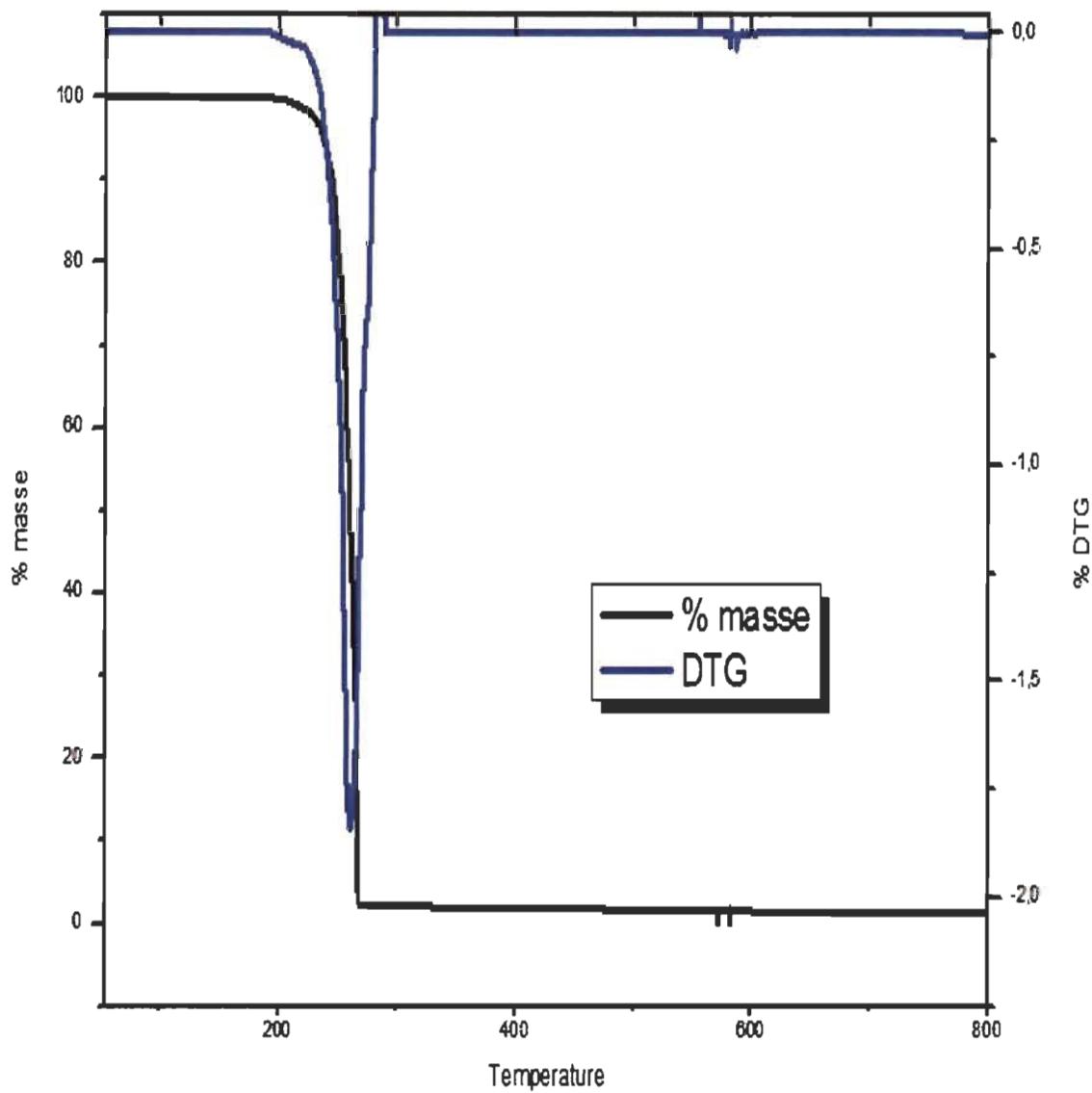
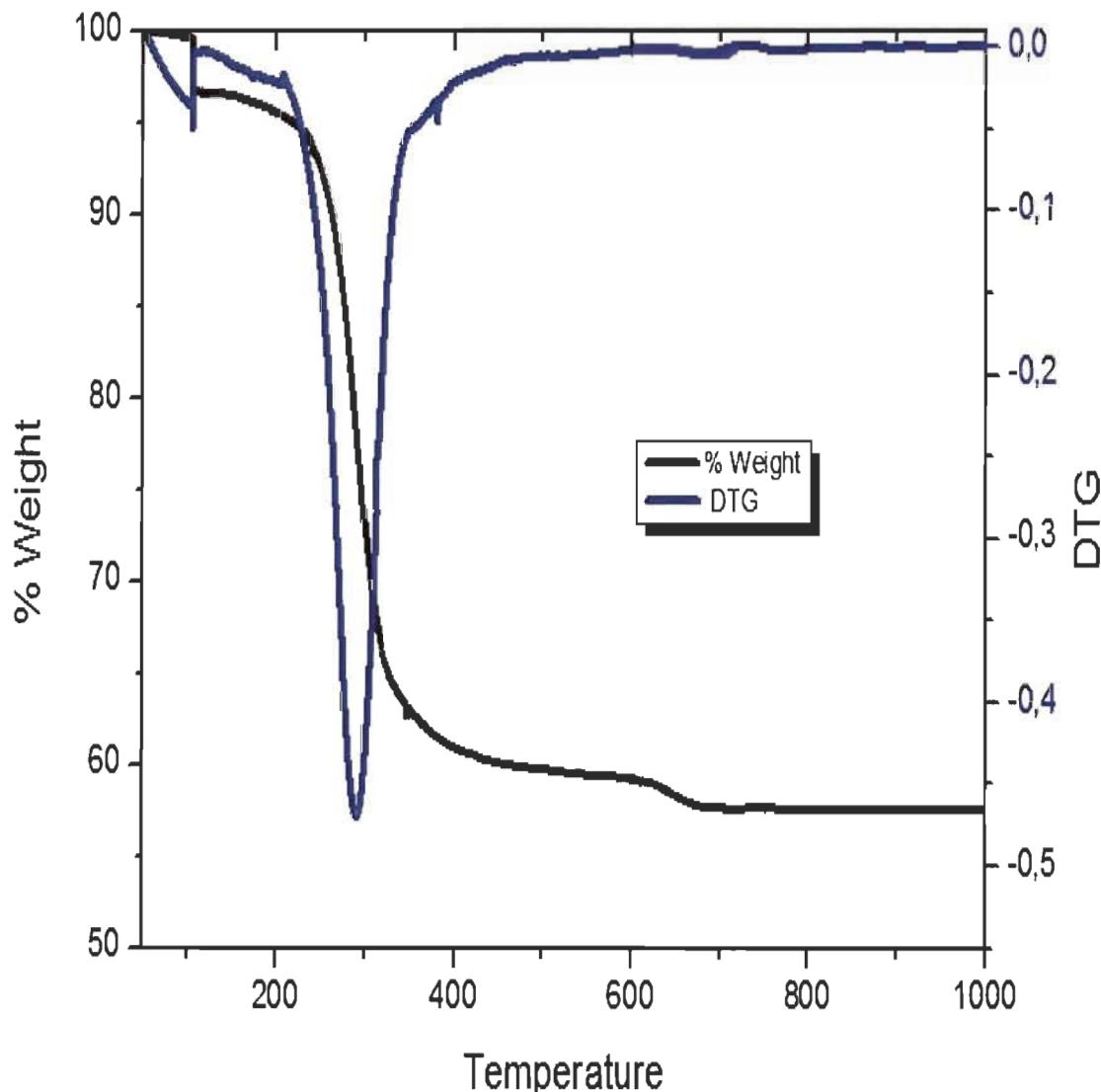


Figure 5.10 RMN  $^1\text{H}$  comparatif de la composition de la biomasse bactérienne et les boues papetières après extraction au chloroforme



**Figure 5.11 ATG du PHB standard**

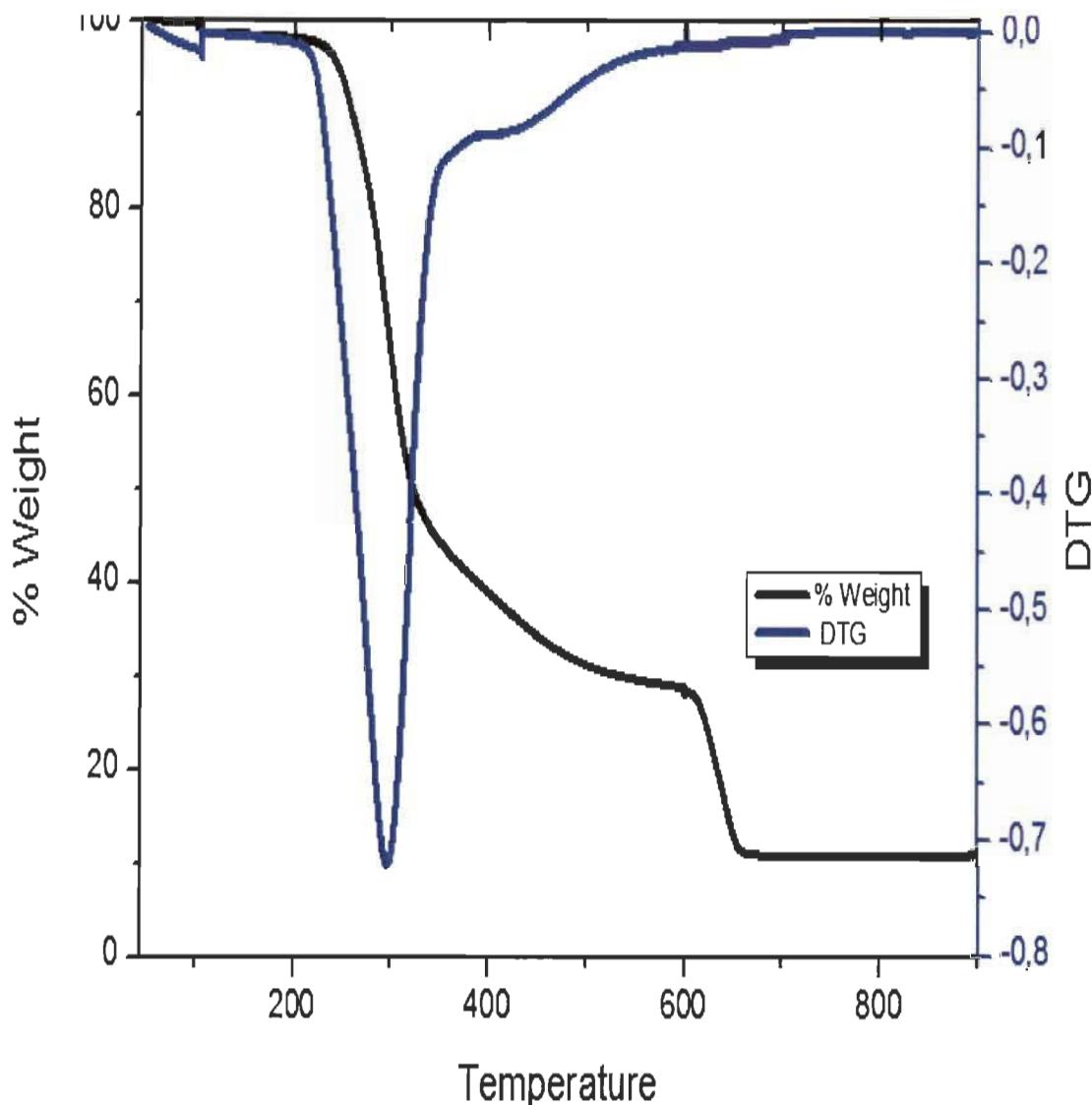
La figure 5.12 montre l'ATG de la biomasse microbienne extraite au Li. En ce qui concerne la biomasse microbienne produite par *C. necator* en milieu synthétique, une température de décomposition plus élevée que celle de notre standard, soit 292°C comparativement à 260°C, est observée. L'échantillon contient environ 35% de bioplastique si on se base sur le pourcentage décomposé autour de 290°C. La dégradation débute à 200°C et se termine à 385°C pour une étendue de 185°C.



**Figure 5.12 ATG de la biomasse microbienne *Cupriavidus necator* extraite au Li**

La figure 5.13 montre l'ATG de la boue papetière extraite au Li. En ce qui concerne cette dernière, on observe une température de décomposition plus élevée que celle du standard, soit 293°C comparativement à 260°C, qui est semblable aux bioplastiques de la biomasse bactérienne. L'échantillon contient environ 55% de bioplastic si on se base sur le pourcentage décomposé autour de 290°C. La dégradation débute à 200°C et se termine à 385°C pour une étendue de 185°C.

Notant aussi que la portion du graphique entre 550 à 1000°C n'est pas pertinente dans ce projet.



**Figure 5.13 ATG de la boue papetière extraite au Li.**

Ces résultats suggèrent que la flore microbienne des boues papetières à l'étude accumule du PHB et qu'il peut être extrait avec un liquide ionique. De plus, le bioplastique extrait de la boue papetière est similaire à celui du PHB de la biomasse de *Cupriavidus necator*. On notera aussi la présence d'un faible pic à environ 450 °C qui est dû à la présence d'impuretés. Ces impuretés sont probablement de la matière inorganique présente dans les boues papetières.

### 5.2.3 Analyse par CPG

La chromatographie par perméation de gel (CPG) a permis de déterminer la masse molaire des polymères dans les échantillons ainsi que la polydispersité. La masse molaire est un facteur important dans la détermination des propriétés physiques des polymères et elle varie selon le substrat et les conditions de culture [58].

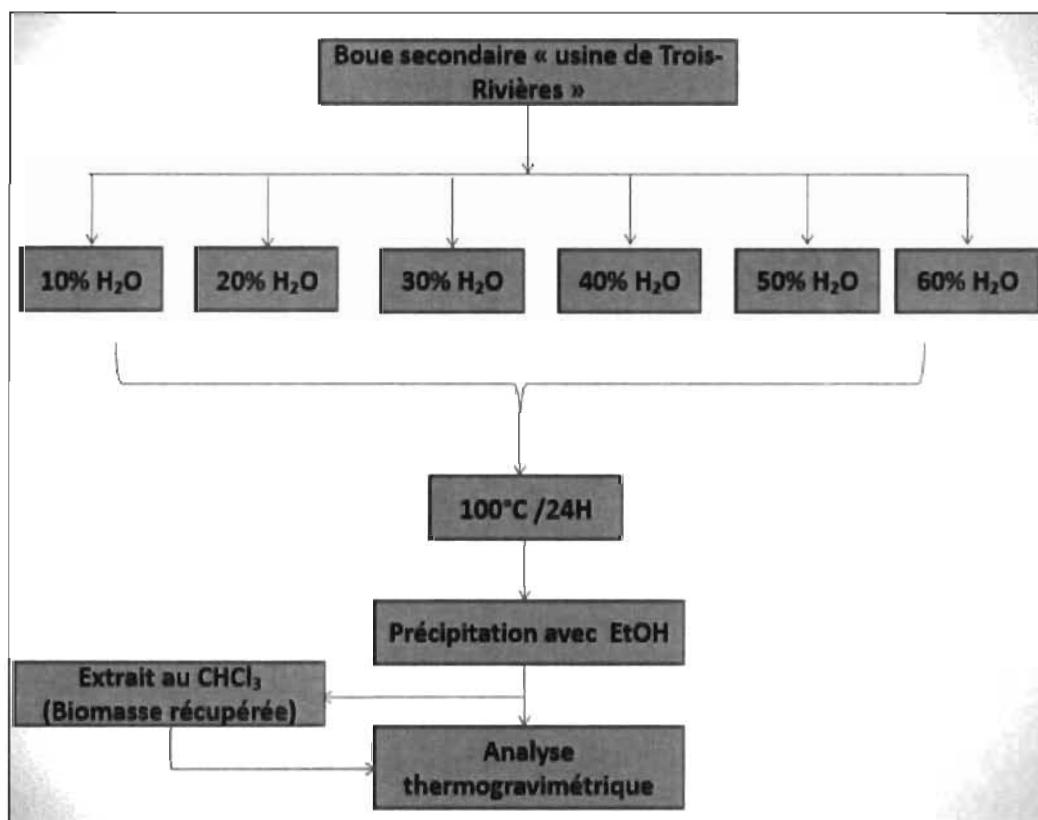
Le tableau 5.3 résume les résultats obtenus. Le PHB issu de la souche bactérienne et le PHB issu des boues papetières ont un poids moléculaire semblable. Par contre, le PHB standard est beaucoup plus polydispersé, ce qui pourrait expliquer la plus grande capacité des deux extraits à résister à la dégradation thermique, d'où leur température de décomposition plus élevée observée lors des analyses d'ATG. Comparativement à la littérature, des polymères de plus haut poids moléculaires et de meilleure polydispersité ont été obtenus.

**Tableau 5.3 Résultats d'analyse CPG des bioplastiques**

	Poids moléculaire (g/mole)	Polydispersité	Références
<b>PHB (Boue papetière)</b>	790 000	1,76	Ce travail
<b>PHB (Biomasse bactérienne)</b>	740 000	1,27	Ce travail
<b>PHB (commercial)</b>	763 288	2,77	Ce travail
<b>PHBV (commercial)</b>	128 341	1,28	Ce travail
<b>PHB</b>	177 000	1,95	Galego et al, (2000)
<b>PHBV</b>	470 000	3,70	Chun and Kim (2000)

### 5.2.4 Extraction dans des mélanges eau-LI

Le procédé d'extraction du bioplastique par le LI est illustré à la figure 5.14. La boue secondaire est d'abord solubilisée dans le LI pur ou on mélange avec de l'eau pendant 24 heures à une température de 100°C. Par la suite, le bioplastique est précipité en ajoutant de l'éthanol, le précipité est filtré et analysé par ATG. L'éthanol est distillé du mélange et le mélange eau-LI peut être réutilisé pour le procédé d'extraction à nouveau. Il est donc important d'ajouter un maximum d'eau sans affecter la solubilité du PHB. Ainsi, la quantité d'éthanol à évaporer est minimale.



**Figure 5.14 Schéma du procédé d'extraction des PHB par le Li.**

Selon les figures qui suivent, on observe que l'on peut ajouter jusqu'à 40 % d'eau dans le liquide ionique sans affecter son efficacité d'extraction. Les figures 5.15 à 5.18 sont presque identiques. On obtient environ une concentration de 55 % de bioplastique dans l'extrait, ce qui est comparable aux extractions avec le LI pur. De plus, les températures de décomposition sont également les mêmes. La température de décomposition est de 293°C. La dégradation débute à 200°C et se termine à 385°C pour une étendue de 185°C.

Les figures 5.19 et 5.20 démontrent qu'une trop grande quantité d'eau diminue l'efficacité de l'extraction. L'eau a pour effet de diminuer la viscosité du LI, ce qui pourrait augmenter son utilisation en milieu industriel et permettrait la possibilité de distiller l'éthanol. En ajoutant graduellement de l'eau, on diminue la polarité du solvant et on favorise une meilleure agitation.

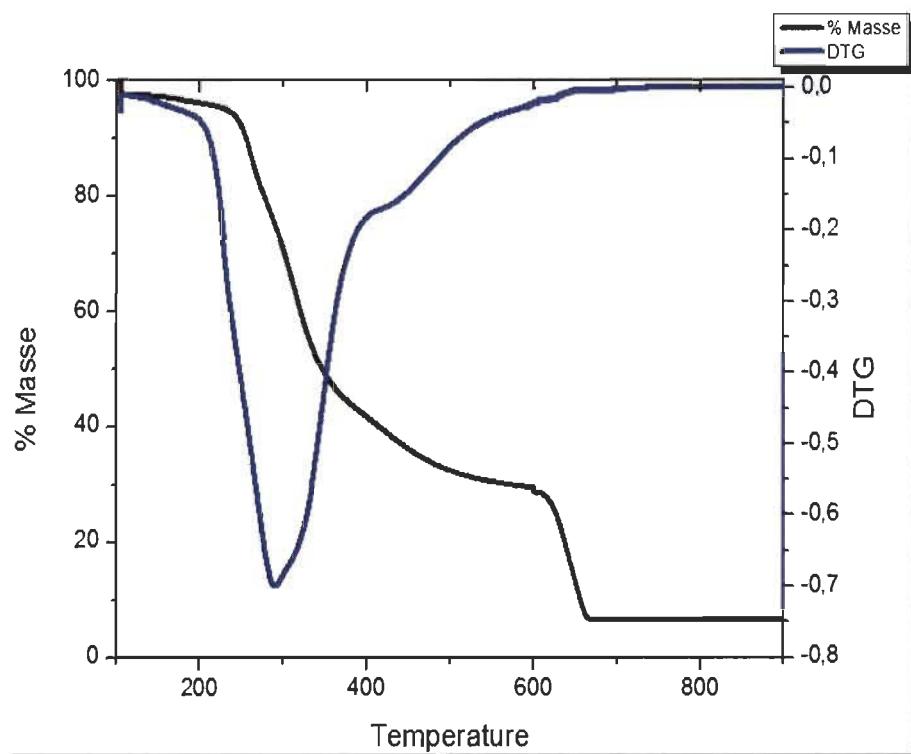
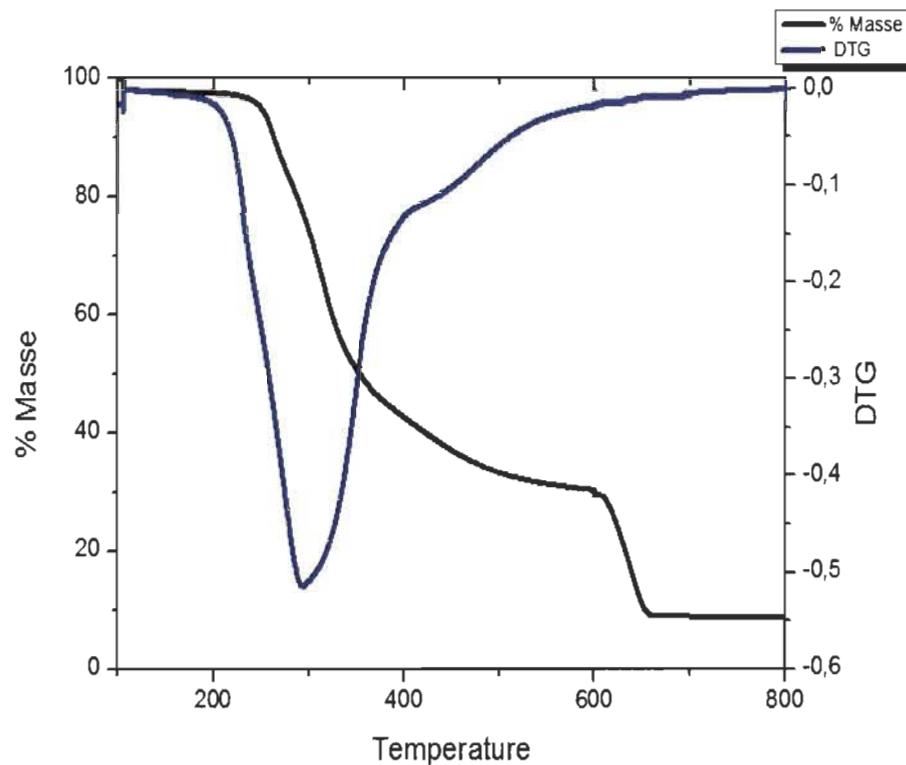
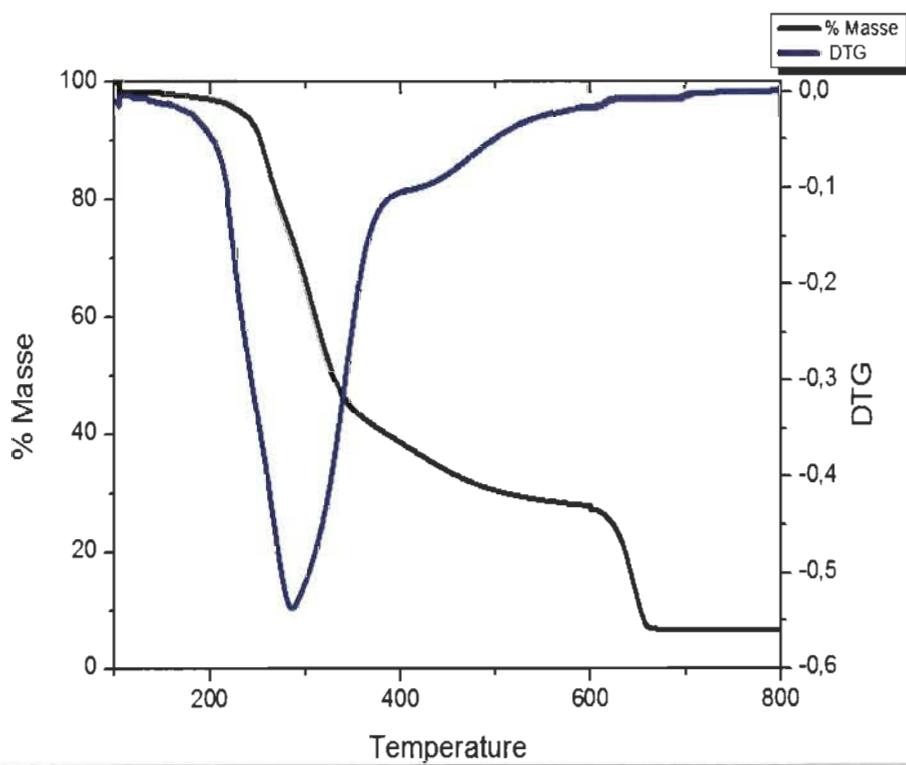


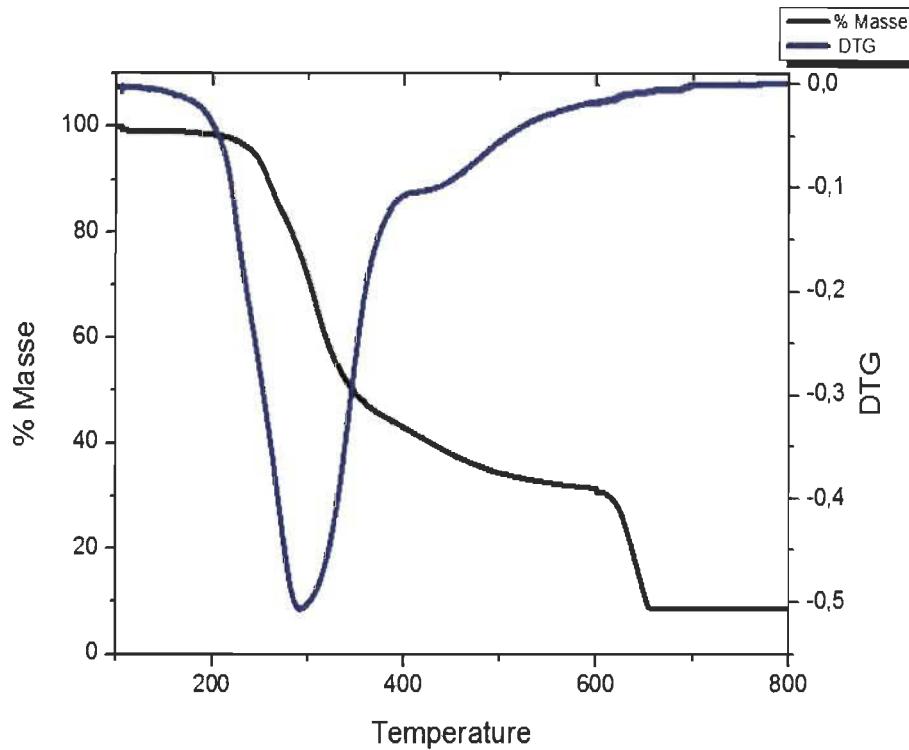
Figure 5.15 Bioplastique extrait avec 90% Li et 10% d'eau



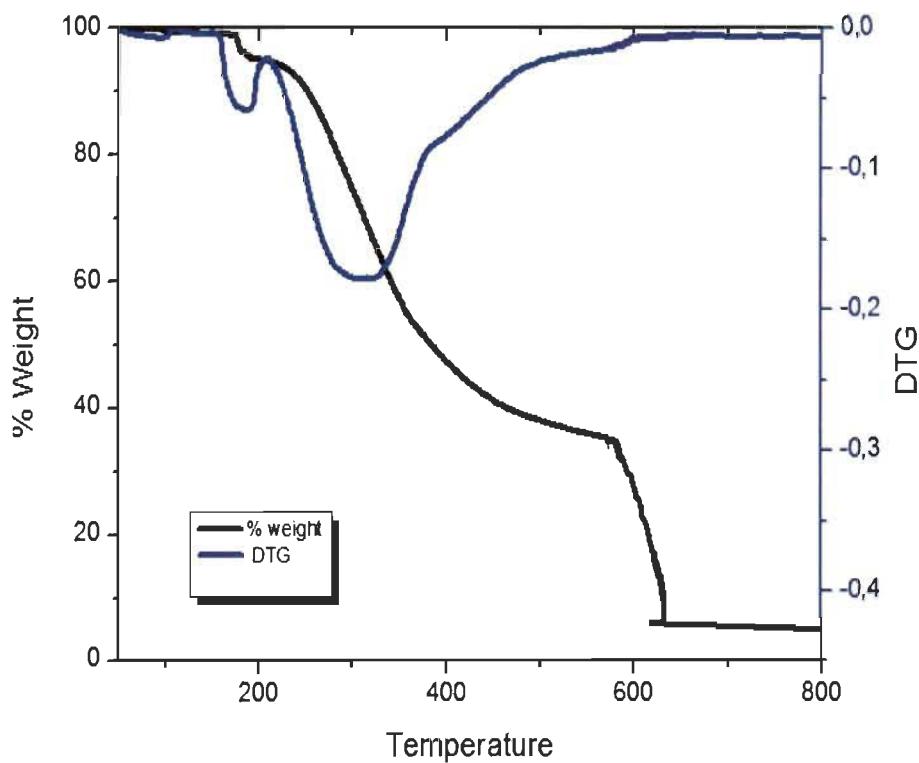
**Figure 5.16 Bioplastique extrait avec 80% Li et 20% d'eau**



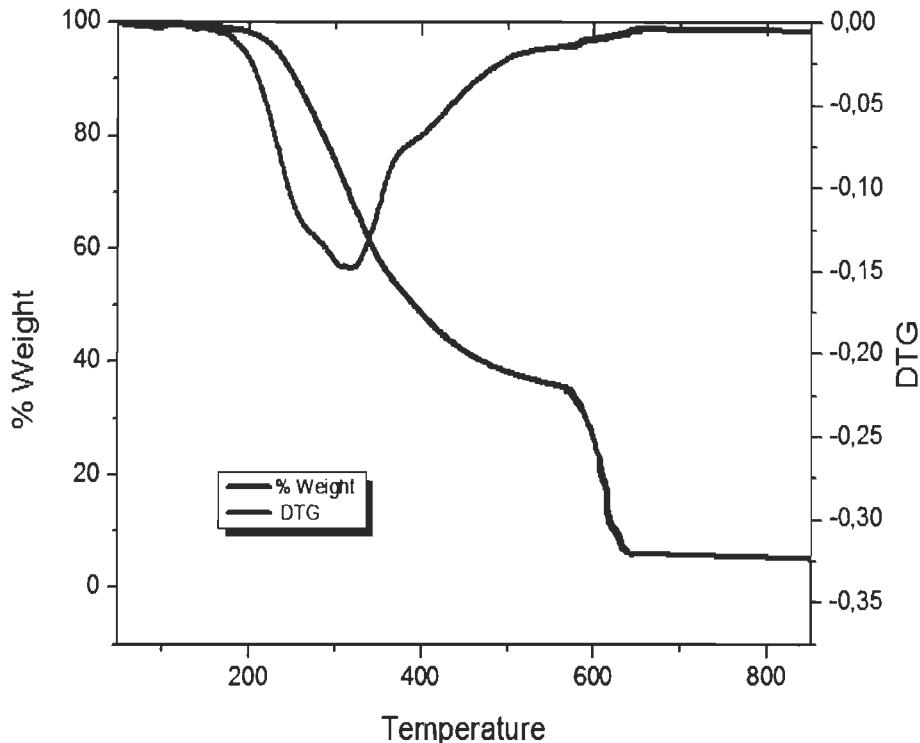
**Figure 5.17 Bioplastique extrait avec 70% Li et 30% d'eau**



**Figure 5.18 Bioplastique extrait avec 60% Li et 40% d'eau**



**Figure 5.19 Bioplastique extrait avec 50% Li et 50% d'eau**



**Figure 5.20 Bioplastique extrait avec 40% Li et 60% d'eau**

Une proportion d'eau plus élevée que 40 % n'apporte pas suffisamment d'avantage au niveau de l'agitation. À cette proportion, on extrait quand même environ 40 %. Par contre, cette extraction semble moins sélective, si on en juge par l'apparence du pic d'intégration qui est plus large et moins bien défini.

Concernant les extractions avec un mélange eau / liquide ionique, on constate que l'extrait semble moins pur que lors d'une extraction avec seulement le liquide ionique. Cela pourrait s'expliquer par la possibilité qu'un grand pourcentage d'eau nuise à l'efficacité d'extraction du liquide ionique. Ce dernier serait incapable d'extraire la quantité idéale. En regardant plus attentivement les figures, on observe qu'il n'y a pas d'autres pics d'impuretés : seulement l'intensité du pic diminue avec l'ajout des pourcentages d'eau, ce qui renforce la précédente explication..

Aussi, concernant la présence des faibles pics au niveau de 450°C, il s'agit des mêmes pics qu'on a observés lors de l'extraction avec seulement le liquide ionique. Cela peut s'expliquer avec la présence de la matière inorganique non assimilée par les bactéries présentes dans les boues papetières.

Pour conclure, à la lumière des résultats et des observations, on doit toujours travailler avec des pourcentages précis d'eau pour extraire le maximum de PHA avec des pourcentages similaires à l'extraction avec seulement le liquide ionique.

## Conclusions et recommandations

Dans ce présent travail, l'objectif était de développer une méthode d'extraction des bio-plastiques (PHA) bactériens contenus dans les boues papetières par les liquides ioniques. Pour ce faire, dans un premier temps, *Cupriavidus necator*, une bactérie connue par son excellent pouvoir de produire le PHA, a été produite par fermentation dans des milieux synthétiques alors que des conditions pour des productions plus élevées de PHA (température, vitesse d'agitation, pH et nutriments). Dans une seconde étape, l'extraction du PHA a été réalisée à un niveau élevé de pureté à partir de la biomasse bactérienne et des boues secondaires papetières par un liquide ionique pouvant facilement être recyclé. Enfin, la capacité de récupération du PHA avec des mélanges Li : H<sub>2</sub>O et Li : Li a été évaluée. Enfin, des études de caractérisation qualitative et quantitative du PHA par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisées ainsi que l'analyse thermogravimétrique (TGA). La fermentation réalisée au laboratoire a permis d'obtenir un échantillon de PHB de *C. necator* comme point de comparaison pour mieux identifier sa présence dans les boues papetières et le quantifier. La bactérie *C. necator* croît mieux dans le milieu synthétique qui contient le citrate et produit plus de PHA après la fermentation. Ceci est expliqué par les caractéristiques du milieu de croissance du *C. necator*. En effet, la croissance de la souche est optimale dans un milieu riche en azote alors qu'une bonne productivité du PHA nécessite un milieu pauvre en azote.

Les résultats d'analyse qualitative réalisés avec le FTIR et le RMN ont permis de mettre en évidence la présence du PHB dans les boues secondaires papetières ainsi que dans les extraits de la biomasse de *C. necator* grâce à l'obtention des principales bandes caractéristiques du PHB (1448 CH<sub>2</sub>; 1371 CH<sub>3</sub>; 1719 C=O; 1000-1300 C-O). Les PHB analysés montrent beaucoup de similitudes au PHB commercial.

Les résultats obtenus par l'ATG révèlent la même tendance. En plus de l'aspect qualitatif, cette méthode est quantitative. En effet, dans cette présente étude, l'analyse avec l'ATG a montré une quantité approximative de 50% du PHB contenue directement des boues papetières secondaires.

Les résultats du GPC ont permis de comparer le PHB extrait à partir de la biomasse de *C. necator* et celui extrait à partir des boues secondaires papetières, qui ont respectivement un poids moléculaire de 740 000 g/mole et 790 000 g/mole et un indice de polydispersité de 1,27 et 1,76. La masse molaire et la polydispersité sont des facteurs importants dans la détermination des propriétés physiques des polymères et elles varient selon le substrat et les conditions de culture. Ainsi, la plus faible dispersité du PHB obtenu dans la biomasse de *C.necator* démontre que ce dernier est un produit plus uniforme et donc de meilleure qualité que le PHB contenu dans les boues papetières.

Ce travail révèle aussi que l'utilisation du liquide ionique [C<sub>4</sub>C<sub>1</sub>Im][Cl] pour l'extraction du PHB de la biomasse de *Cupriavidus necator* et des boues secondaires papetières est très efficace. Une bonne extraction se fait à 100°C et pendant 24 h. Dans le cas des boues secondaires papetières, le volume de l'eau dans des boues doit être inférieur à 40 % de celui de liquide ionique pour améliorer l'extraction. Dans ces conditions, on peut extraire jusqu'à 50 % du PHB à partir des boues secondaires papetières. De plus, l'utilisation du liquide ionique a l'avantage d'extraire des quantités importantes de bioplastiques PHB avec moins d'impuretés, de façon plus sécuritaire et en consommant moins d'énergie qu'en utilisant des solvants organiques, tel que le chloroforme.

Les impuretés présentent dans les échantillons de PHB, produits par fermentation ou déjà présents dans des boues secondaires, peuvent compliquer les analyses et l'interprétation des résultats, et aussi la purification des bioplastiques pour leur commercialisation. Il est donc recommandé dans des travaux ultérieurs de procéder à une identification de ces impuretés et d'explorer des méthodes pour les retirer au besoin. En conclusion, ce travail a permis de cumuler de nouvelles connaissances sur l'extraction des PHB dans différents milieux avec des liquides ioniques. Ces solvants verts pourraient donc être utilisés et réduire potentiellement les coûts élevés d'extraction des PHB à plus grande échelle.

## Bibliographie

1. ADEME, *Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME). Introduction à l'Analyse de Cycle de Vie (ACV).* In ADEME. Site de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie, [En ligne].  
<http://www.precodd.fr/servlet/KBaseShow?sort=-1&cid=96&m=3&catid=12908>. 2005.
2. EPA, *United-States Environmental Protection Agency (EPA) Municipal Solid Waste Generation, Recycling, and Disposal in the United States: Facts and Figures for* In EPA. Site du United-States Environmental Protection Agency, [En ligne].  
[http://www.epa.gov/waste/nonhaz/municipal/pubs/msw\\_2010\\_rev\\_factsheet.pdf](http://www.epa.gov/waste/nonhaz/municipal/pubs/msw_2010_rev_factsheet.pdf). 2011.
3. Québec, R.-Q.e.É.E., *La caractérisation des matières résiduelles du secteur résidentiel au Québec 2010.* In Recyc-Québec. Site de Recyc-Québec, [En ligne].  
[http://www.recycquebec.gouv.qc.ca/Upload/publications/Carac\\_resEEQ\\_RQ.pdf](http://www.recycquebec.gouv.qc.ca/Upload/publications/Carac_resEEQ_RQ.pdf), 2010.
4. Ojumu, T.V., J. Yu, and B.O. Solomon, *Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer.* African Journal of Biotechnology, 2004.
5. Steinbüchel., A. and B. Füchtenbusch, *Bacterial and other biological systems for polyester production.* ,Elsevier Science Ltd, 1998. **16**.
6. ASTM., *Standard Specification for Labeling of Plastics Designed to be Aerobically Composted in Municipal or Industrial Facilities. West Conshohocken,* . ASTM International, , 2012. **3p:D6400-12**
7. Recyc-Québec, *Avis sur les sacs d'emplettes-Évaluation de leur impact environnemental.* In Recyc-Québec. Site de Recyc-Québec, [En ligne].  
<http://www.recycquebec.gouv.qc.ca/Upload/Publications/MICI/Avis-SacsEmplettes-RQ-2007.pdf>, 2007.
8. Verlinden, R.A., et al., *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates.* J Appl Microbiol, 2007. **102**(6): p. 1437-49.
9. Legros, N., N. chapleau, and H. Li, *La plasturgie et les matériaux biosourcés. Colloque québécois sur les bioplastiques compostables, Sherbrooke, 2 juin 2011.* 2011.
10. Biopackaging, P.D., *In Preventpack.* Site de Preventpack, [En ligne].  
<http://www.preventpack.be/tpl/publications/pdf/fr/201206-14-Dossier.pdf>, 2012.

11. D., S., R. S., and Z. J., *Biological-chemical preparation of 3- hydroxycarboxylic acids and their use in EPC-synthesis*, In : *Stereochemistry of organic and bioorganic transformation*. W. Bartmann and K. B. Sharpless (eds) .VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 1987. p85-126.
12. végétal, R.d.c.d.p.s.l.c.d., *Etude ALCIMED - janvier 2007 : Marché actuel des Bioproducts Energétiques et industriels et Evolutions prévisibles à échéance 2015/2030*. 2007.
13. Bio-plastiques, C., *Les bio-plastiques d'origine végétale : Des produit s renouvelables et biodégradables*. 2007.
14. H., B., et al., *Plastics from bacteria and for bacteria: poly(bhydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polymers*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 1990.
15. Bioplastics, E., *Position paper – Life cycle assessment of bioplastics*. In *European Bioplastics*. Site de l'European Bioplastics, [En ligne]. [http://en.europeanbioplastics.org/wpcontent/uploads/2011/04/pp/LCA\\_Positions\\_Paper.pdf](http://en.europeanbioplastics.org/wpcontent/uploads/2011/04/pp/LCA_Positions_Paper.pdf), 2008
16. S. Lacorte, A., et al., *Organic compounds in paper-mill process waters and effluen*. Trends in Analytical Chemistry,, 2003. **22, No. 10**.
17. Morin, N., *Guide d'évaluation et d'adaptation de l'utilisation des biosolides papetières. Centre d'expérimentation et de développement en forêt boréale*. [http://www.cedfob.gc.ca/documents/Guide\\_Ericacee.pdf](http://www.cedfob.gc.ca/documents/Guide_Ericacee.pdf), 2007.
18. Bassompierre, C., *Procédé à boues activées pour le traitement d'effluents papetiers : de la conception d'un pilote à la validation de modeles* . Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Grenoble, France., 2007.
19. B.A.C.E., *Bilan annuel de conformité environnementale, secteur des pâtes et papiers. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. Québec, Canada*. 2005.
20. Migneault, S., et al., *Effect of Processing Method and Fiber Size on the Structure and Properties of Wood-Plastic Composites*. Composites. Composites. Part A. , 2009. **40 : 80-85**.
21. Boisselle, F., *Évaluation des performances de l'incinération de boues de dés encrage dans un lit fluidisé circulant interne*. Thèse de doctorat de l 'école polytechnique de Montréal., 1999.
22. Scott, G.M. and S. A, *Sludge Characteristics and disposai alternatives for the pulp and paper industry*. Proc of the 1995 International environmental conference. Tappi press 1995. **269-279**.

23. Krigsttin, S.G., *Characterization of recycled paper mill sludge and evaluation of potentiel applications*. . Thèse de doctorat de l'Université de Toronto, 2008.
24. Pradel., M. and P. Roux, *L'Analyse de Cycle de Vie (ACV) comme outil d'aide à la décision pour l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées* Ecotechs'2012, Oct 2012, Montoldre, France., 2012. **11 p.**
25. Simons, H.A., *Méthodes de gestion des boues générées par les fabriques des pâtes et papiers. Rapport Synthèse*. 1994.
26. Mahmood, T. and M. Champoux, *Les boues d'effluents deviennent source d'énergie verte. La Maîtrise de l'énergie- Mars 2009*. 2009.
27. Beauchamp, C.J., M.H. Charest, and A. Gosselin, *Examination of environmental quality of raw and composting dinking paper sludge*.Chemosphere. 2002. **Nº6**: p. 887-895.
28. Gea, T., Artola.A., and A. Sanchez, *Composting of de-inking sludge from the recycled paper manufacturing industry*. . Bioresource Technology, , 2005. **96**, **Nº 10**, pp. **1161-1167**.
29. Leclere, I., et al., *Beneficial use of pulp and paper residues for soil amendement in the province of Quebec»*. . Pulp and Paper Canada 1999. **100**: (7) **68-70**.
30. Ahmadi, B. and W. Al-khaja, *Utilisation of paper waste sludge in the building construction industry*. . Ressources conservation and recycling». , 2001. **32**. pp. **105-113**.
31. Colburn, R.e.D., G. , *Beneficial use of paper mill sludge*. Biocycle (ISSN:0276-5055), , 1995. **36**: p. **69-71**.
32. Weigand, P.S. and J.P. Unwin, *Alternative management of pulp and paper industry solid wastes*. Tappi **77(4):91-97**.
33. Fiechter., *Plastics from bacteria and for bacteria: Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters*. springer-verlag .New york . 1990 pp.**77-93**.
34. Prieto, M.A., et al., *Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates*. Appl. Environ. Microbiol. , 1999. **65**, **3265-3271**.
35. A.J., A. and D. E.A., *Occurrence, metabolism, metabolic role. and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*. Microbiol. Rev, 1990. **54** : **450-472**.
36. Wasserscheid P, W.T., *Ionic liquids in Synthesis*. 2nd Edition): Wiley-VCH Verlag, 2007.

37. Gutel, T., *Les liquides ioniques, leur utilisation et leur rôle comme solvants de réaction catalytique*. 2007.
38. S.Wilkes, J., *Properties of ionic liquid solvents for catalysis*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2004. **214**: 11–17.
39. REVELLI, A.-L., *Etude thermodynamique des Liquides Ioniques : Applications à la protection de l'Environnement*. École Doctorale RP2E Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, 2010.
40. Pucheault, M., *Liquide ionique*. 2009: p. 26.
41. Lee., S.-M., et al., *Influence of Ionic Liquids on the Growth of Escherichia coli*. Korean J. Chem. Eng, 2005. **22(5)**, 687-690.
42. G-T., W., Z. Yang., and C.-J. Chen, *One-pot desulfurization of light oils by chemical oxidation and solvent extraction with room temperature ionic liquids*. Anal. Chim. 488, 183, 2003.
43. Swatloski, R.P., et al., *Dissolution of cellulose with ionic liquids»*. J. Am. Chem. Soc. , 2002. **124**: 4974–4975. .
44. Wang., J., et al., *Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by Cupriavidus necator with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation »*. Biochemical Engineering Journal 2010. **49:422-428**.
45. Du, G., Chen., L.X. L., and J. Yu, *High-efficiency production of bioplastics from biodegradable organic solids*, . Journal of Polymers and the Environment, 2004. **12(2) : 89-94**.
46. Satoh., H., T. Mino., and T. Matsuo, *PHA production by activated sludge*. International Journal of Biological Macromolecules, 1999. **25:105–109**.
47. Oliveira, F.C., et al., *Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by Cupriavidus necator in solid-state fermentation*. Bioresour Technol, 2007. **98(3)**: p. 633-8.
48. Kim, B.S., et al., *Production of poly(3- hydroxybutyric acid), by fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with glucose concentration control*. Biotechnol. Bioeng., 2004. **43:892-898**.
49. López-Cortés., A., et al., *Screening and Isolation of PHB-Producing Bacteria in a Polluted Marine Microbial Mat*. Microb Ecol, 2008. **56:112–120**.
50. Atlic, A., et al., *Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by Cupriavidus necator in a multistage bioreactor cascade*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91(2)**: p. 295-304.

51. technique, F., *mode d'emploi – milieux en flacons prêts à l'emploi*. BA, 2008. **257107.03**.
52. Thompson, D.B., *On the non-random nature of amylopectin branching.* . Carbohydrate Polymers., 2004. **43(3): p. 223-239.**
53. J.A., R., A.-H. M-C., and R.B.A. 1995., *Hemicellulose as a potential substrate for production of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate.* . Can. J. Microbiol. **41 : 262-266.**
54. Deykoa., A., et al., *The Enthalpies of Vaporisation of Ionic Liquids: New measurements and Predictions*. Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics, 2012.
55. Gandini, A., *Polymers from Renewable Resources: A Challenge for the Future of Macromolecular Materials*. Macromolecules, 2008. **41(24): p. 9491-9504.**
56. Verlinden, R.A., et al., *Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by Cupriavidus necator*. AMB Express, 2011. **1(1): p. 11.**
57. Doi, Y., et al., *Production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from butyric and pentanoic acids.* . Appl. Microbiol. Biotechnol, 1988 **28:330-334.**
58. G., C., K.H. Konig., and R.M. Lafferty, *Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus Bacillus.* . FEMS Microbiol. Lett. , 1991. **84, 173-176.**