

SUIVI DE LA DEGRADATION HYDROLYTIQUE ET ENZYMATIQUE DE BIOCOMPOSITES A L'AIDE D'UN LUMINOTECH

N. Pons¹, F. Fesquet¹, N. Vidal²

¹MATERIAU INGENIERIE Sarl, Vallon de Fontanes, 2 rue des Acacias, 30520 Saint-Martin-de-Valgalgues, France

²YELEN Sarl, 10 boulevard Tempête, 13820, Ensues-la-Redonne

A. INTRODUCTION

Afin de pallier aux problèmes de durée et de reproductibilité inhérents aux essais de biodégradation, Matériau Ingénierie, en partenariat avec la société Yelen*, a développé un test de suivi de la biodégradation par chimiluminescence. L'approche retenue est une **approche moléculaire** permettant de doser en temps réel la solubilisation de marqueurs de dégradation enzymatique. Ces marqueurs, réagissent avec un ou plusieurs intermédiaires de réaction afin de produire des photons par luminescence (réactif dédié). Dans le cas du PLA, le marqueur est l'acide lactique (ou lactate) issu de l'action d'enzymes *hydrolytiques* (Figure 1). Le nombre de photons émis est mesuré à l'aide d'un Luminotech.

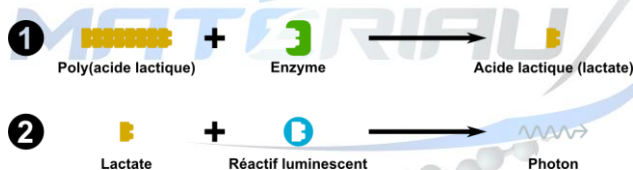


Figure 1 : Principe de la méthode (cas de la dégradation enzymatique du PLA).

Par rapport aux méthodes microbiennes, **l'utilisation d'enzyme facilite l'analyse de la biodégradation** car ce sont des catalyseurs de réaction et ils continuent d'agir tant que la température et le pH sont optimums. Au lieu de ne sélectionner qu'un type d'enzyme spécifique, la méthode développée se base sur l'emploi d'un « cocktail enzymatique » et présente l'avantage d'être bien moins onéreuse tout en étant biomimétique.

La méthode permet également de contrôler la résistance à l'eau des matériaux biodégradables en conditions d'utilisation au niveau moléculaire.

Les travaux présentés dans cet article ont été réalisés sur des biocomposites à matrice poly(acide lactique) (ou PLA) renforcée de fibres de verre et de chanvre. Pour les besoins de cette étude, la méthode présentée ci-dessus (Figure 1) a été adaptée pour suivre deux autres réactions :

- L'hydrolyse « chimique » du PLA (cinétique de dégradation par l'eau en l'absence d'enzyme) ;
- L'hydrolyse « chimique » du verre, certaines formulations verrières ayant l'aptitude d'être altérées par l'eau. Dans ce cas, les marqueurs de dégradation sont les silicates.

B. METHODOLOGIE

1) Matériaux et mise en œuvre

Le PLA est un PLA 7000D® de NatureWorks. L'introduction des fibres dans le PLA a été réalisée par extrusion. Différents types de fibres ont été utilisés :

- une fibre de chanvre [PLA-NF], découpée en fibres courtes de 5mm de longueur (avant extrusion) ;
- une fibre de verre du commerce [PLA-CF] ;
- et deux fibres de verre altérables par l'eau et de formulations différentes [PLA-AF₁ et PLA-AF₂].

Des éprouvettes ont ensuite été obtenues par injection.

La fraction massique de PLA dans les biocomposites est égale à 70 %. Les trois fibres de verres ont un diamètre de 13 µm et une longueur avant extrusion de 5 mm.

2) Condition de dégradation

La dégradation a lieu dans des tubes à essais en verre sur des poudres (Ø 1,5-2 mm) obtenues après broyage des éprouvettes injectées au sein d'un broyeur à couteaux.

La concentration en poudre dans le milieu agressif est de 250 mg/ml. Trois conditions d'essai ont été testées :

- un milieu abiotique (eau pure à 37°C pendant 48 h) ;
- un milieu abiotique (eau pure à 65°C pendant 24 h) ;
- un milieu biotique (eau + cocktail enzymatique à 37°C pendant 48h).

La préparation du milieu biotique a été réalisée à l'aide d'un kit développé par Yelen.

Le contrôle de la température de conditionnement est réalisé à l'aide d'un bain thermostaté.

3) Mesure du nombre de photons

La mesure du nombre de photons a été réalisée avec un Luminotech. Le capteur de photons a été auparavant étalonné avec des solutions étalons de lactates, en traçant la courbe de corrélation entre le nombre de photons émis et le nombre de lactates dans les solutions étalons.

L'analyse a été effectuée sur des prélèvements de 20 µL injectés dans des tubes à essais de diamètre 6 mm. La durée de la mesure a été fixée à 10 secondes.

C. RESULTATS

1) Libération de silicates en fonction de la température

L'analyse a tout d'abord été réalisée en utilisant comme marqueur le silicate. Pour cela, la méthode a été modifiée en choisissant un réactif luminescent adapté au silicate (Figure 2).

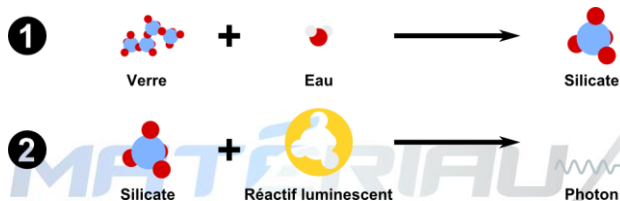


Figure 2 : Principe de la méthode (cas de l'hydrolyse des verres altérables).

Cette première série de mesures a permis de démontrer la pertinence de la méthode (Figure 3).

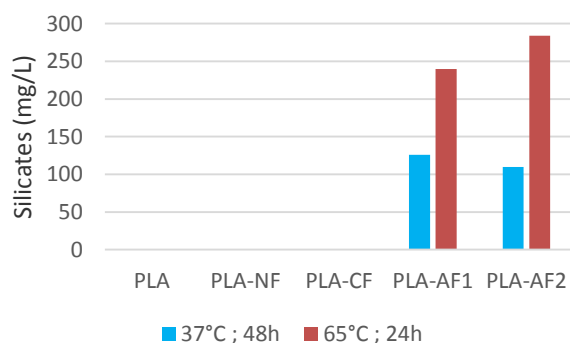


Figure 3 : Quantité de silicates libérés (en mg/L) en fonction de la nature du renfort et de la température.

En l'absence de verre, aucun silicate n'a été détecté, aussi bien à 37°C qu'à 65°C (PLA et PLA-NF). De la même manière, la fibre de verre du commerce résiste à l'eau (PLA-CF). Par ailleurs, la nature altérable des verres AF₁ et

AF₂ est bien observée, le premier semblant se dégrader légèrement plus vite que le second. Logiquement, la dégradation est d'autant plus importante que la température est élevée.

2) Libération de lactates en fonction de la température

Ensuite, nous avons mesuré la dégradation du PLA dans l'eau pure, celui-ci étant sensible à l'hydrolyse (Figure 4), notamment pour des températures supérieures à sa température de transition vitreuse (T_G ≈ 70°C). Cette mesure est nécessaire afin de dissocier l'influence de l'eau de celle des enzymes dans la dernière partie.

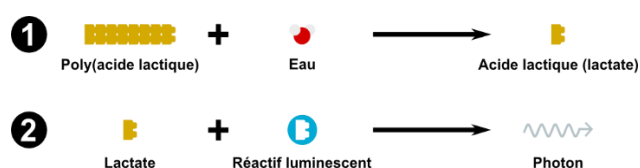


Figure 4 : Principe de la méthode (cas de l'hydrolyse chimique du PLA).

Quelle que soit la température, l'hydrolyse chimique du PLA (non chargé ou chargé fibres de chanvre ou fibres de verre du commerce) est nulle (Figure 5).

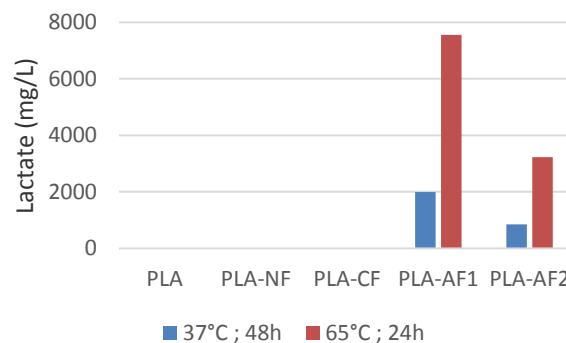


Figure 5 : Quantité de lactates libérés (en mg/L) en fonction de la nature du renfort et de la température.

En présence de fibres de verre altérable, l'hydrolyse du PLA est active et varie en fonction de la composition verrière et de la température. La dégradation du PLA est plus importante en présence de la fibre AF₁ que de la fibre AF₂. Par ailleurs, l'influence de la température est similaire dans les deux cas, le rapport entre la valeur de lactates libérés à 37°C pendant 48h par rapport à celle mesurée après 4h à 65°C étant identique et égale à 3,8.

Ces résultats montrent que la nature et la composition de la charge peuvent modifier la résistance à l'eau du PLA.

3) Libération de lactates en fonction du milieu

L'ajout d'un cocktail enzymatique biomimétique catalyse l'hydrolyse du PLA et augmente la quantité de lactates libérés (Figure 1). Comme pour les essais en milieu abiotique, des différences sont observées en fonction du renfort.

La valeur de 1800 mg/L obtenue pour le PLA-CF est logique. Elle est environ égale à 70 % de la valeur du PLA soit la fraction massique de PLA dans le composite.

La faible valeur de lactate mesurée pour le composite PLA-NF est attribuée à la diminution de l'activité enzymatique sur le PLA. Un dosage de marqueur adapté (glucose?) pourrait permet de confirmer cette hypothèse.

Enfin, la libération de lactates dans le cas de composites à base de fibres de verre altérables est la plus élevée.

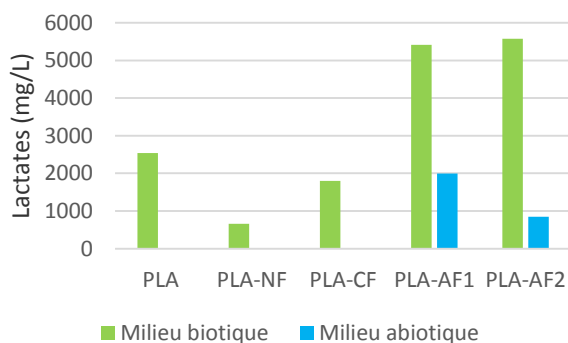


Figure 6 : Quantité de silicates libérés (en mg/L) en fonction de la nature du renfort et du milieu.

Par ailleurs, la différence entre le nombre de lactates dans le milieu biotique et le nombre de lactates dans le milieu abiotique rapportée à la fraction massique de PLA fournit des indications supplémentaires (Figure 7).

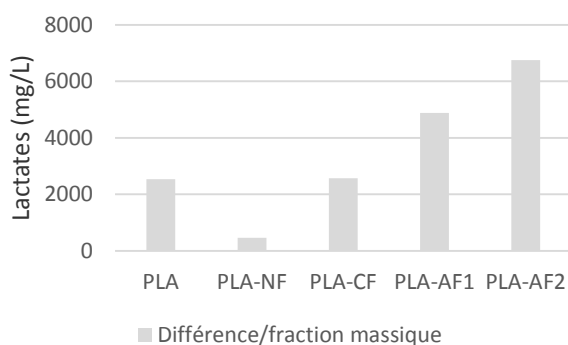


Figure 7 : Différences des quantités de silicates libérés en milieu biotique et abiotique rapportées à la fraction massique de PLA.

La principale information que l'on peut extraire de ces résultats est que les verres altérables accélèrent la cinétique de dégradation enzymatique du PLA. Un effet tampon des silicates (anions) limitant l'acidification du milieu par les lactates, préservant ainsi le pH optimum des enzymes, est pour l'heure l'hypothèse privilégiée en plus de l'augmentation de la surface spécifique de contact enzymes/matériau.

D. CONCLUSIONS

L'étude présentée dans cet article a permis de mettre en évidence la pertinence de la méthode de suivi de la dégradation par chimiluminescence. Le cocktail enzymatique préparé pour cette étude a montré son efficacité. Dans l'eau pure, 37°C et 65°C (et sur des temps relativement courts), la dégradation hydrolytique du PLA est trop faible pour pouvoir être observée alors qu'elle est élevée en présence d'enzymes.

Des différences ont été observées en fonction du milieu (avec ou sans enzyme) et de la température. Les mesures ont été réalisées sur deux matériaux radicalement différents :

- un matériau organique de type biopolymère (poly(acide lactique)) ;
- un matériau inorganique (verre altérable par l'eau).

Des différences de sensibilité à l'eau (conditions d'utilisation) ainsi que de vitesse de biodégradation (conditions de fin de vie) ont été mises en évidence en fonction du type de renforcement (verre, chanvre).

En fonction des besoins, cette méthode est adaptable à d'autres matériaux. Elle a ainsi été déjà utilisée avec succès pour :

- l'étude de la biodégradation d'autres biopolymères, Poly(HydroxyButyrate) (PHB) et amidon ;
- la mesure de l'activité cellulaire, par dosage de l'ATP (Adénosine triphosphate) ;
- etc...

* Créée en 2000, Yelen est une société spécialisée dans le domaine de la détection simple et rapide par luminescence (biologique/chimique) de substances sous forme de traces. Les domaines d'application vont de l'agro-alimentaire à l'industrie avec une adaptation de la méthode au cas par cas : création/recherche d'un réactif spécifique et développement d'un protocole de mesure adapté.