



HAL
open science

Polyhydroxyalcanoates : une alternative ‘bio’ aux plastiques traditionnels

Cristina Pérez-Rivero, Guillermina Hernandez-Raquet

► To cite this version:

Cristina Pérez-Rivero, Guillermina Hernandez-Raquet. Polyhydroxyalcanoates : une alternative ‘bio’ aux plastiques traditionnels. *Innovations Agronomiques*, 2017, 58, pp.99-112. 10.15454/1.5137843268969746E12 . hal-01669399

HAL Id: hal-01669399

<https://hal.science/hal-01669399v1>

Submitted on 20 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Polyhydroxyalcanoates: une alternative 'bio' aux plastiques traditionnels

Pérez-Rivero C. et Hernandez-Raquet G.¹

¹ Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés - LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

Correspondance : hernandg@insa-toulouse.fr

Résumé

Au cours des dernières années, il a été démontré le potentiel des routes biologiques pour remplacer les combustibles fossiles comme ressource pour la production durable de produits chimiques et d'énergie. Ainsi, les polymères biodégradables dérivés de ressources renouvelables pourraient contribuer à la production mondiale de plastiques (plus de 300 millions de tonnes par an) provenant actuellement du pétrole et, en même temps, de réduire les problèmes environnementaux causés par l'élimination des matières plastiques. Cependant, une conception économiquement viable est nécessaire afin de développer des bioprocédés de production de bioplastiques compétitifs avec les équivalents pétroliers.

La famille des polyhydroxyalcanoates (PHA) se compose d'un grand nombre de polyesters biodégradables produit par les organismes vivants comme réservoir de carbone et d'énergie. Les PHA à chaîne courte, ou les PHA-scl, sont des matériaux thermoplastiques alors que les PHA à longueur moyenne de chaîne, PHA-mcl, sont des élastomères présentant de bonnes propriétés d'élongation qui les rendent adaptés à une plus large gamme d'applications. Alors que les technologies pour produire PHA-scl, dont le représentant le plus étudié est PHB (polyhydroxybutyrate), sont bien connues, les études sur les PHA-mcl sont plus récentes. Les PHA-mcl ont été produits en culture pure à partir de matériaux à faible coût utilisant des espèces de *Pseudomonas* comme biocatalyseurs. Des études en culture microbienne mixte ont révélé également la possibilité d'obtenir des PHA-mcl par des consortia microbiens. Cette stratégie ne nécessite pas d'opérations coûteuses de stérilisation et utilise la capacité des microorganismes à s'adapter à différents environnements et substrats. L'enrichissement d'organismes producteurs de PHA-mcl et la sélection des conditions opérationnelles au stade de la production, afin de maximiser le flux de carbone vers la synthèse de la PHA-mcl sont essentiels pour obtenir des procédés efficaces. De cette façon, les polyesters fabriqués sur mesure contenant une gamme stable de PHA-scl et PHA-mcl, ou de PHA-mcl mélangés à d'autres polymères naturels, sont des alternatives environnementales aux plastiques d'origine pétrochimique et peuvent contribuer au développement de la bioéconomie.

Mots-clés : Bioplastiques, Biodégradabilité, PHA-scl, PHA-mcl, Culture pure, Culture mixte

Abstract: Polyhydroxyalkanoates: an « organic » alternative to oil-derived plastics

In recent years, the potential of biological routes to replace fossil fuel-based technologies in the drive towards sustainable production of chemicals and energy has been explored and demonstrated. Biodegradable polymers derived from renewable resources could contribute to the global production of plastics (more than 300 million tons per year) currently derived mainly from crude oil refining and, at the same time, reduce the environmental problems caused by plastic disposal by generating a closed carbon cycle. However, cost-effective designs are required if bioprocesses are to be competitive with oil-based equivalents.

The polyhydroxyalkanoate (PHA) family consists of a large number of biodegradable polyesters produced by living organisms as carbon and energy reservoir. Short chain length PHAs, or scl-PHAs, are thermoplastics materials whereas medium chain length PHAs, mcl-PHA, are elastomers with good elongation properties that make them suitable for a wide range of applications, forbidden to scl-PHA. While technologies to produce scl-PHA, which most studied representative is PHB, are well known, studies on mcl-PHA are still at an early stage. Mcl-PHAs have been produced in pure culture from low cost materials using *Pseudomonas* species as biocatalysts. Studies in mixed microbial culture have revealed the possibility of obtaining mcl-PHAs when using a consortium of microorganisms. This strategy does not require costly sterilization operations and makes use of microorganisms' capability to adapt to different environments and substrates. Enriching mcl-PHA storing bacteria and selecting operational conditions in the production stage that maximize the carbon flow towards mcl-PHA synthesis are essential to obtain processes with large outcomes. In this way, tailored made polyesters containing a stable range of scl and mcl-PHAs, or mcl-PHAs mixed with other natural polymers are environmentally friendly alternatives to conventional plastics and could contribute to the bio-economy development.

Keywords: Bioplastics, Biodegradability, scl-PHA, mcl-PHA, Pure culture, Mixed culture

Introduction: matériaux plastiques et développement durable

La prise de conscience environnementale face à la pollution engendrée par les plastiques classique d'origine pétrolière a motivé les chercheurs et industriels à développer des stratégies innovantes pour un développement durable. Ces stratégies doivent conduire à la production de plastiques biodégradables, à travers des procédés avec une plus faible consommation d'énergie et des ressources, un faible impact environnemental et une faible production de déchets et produits toxiques (Prieto, 2016).

Au cours des dernières années, l'industrie du plastique est devenue l'une des plus grandes industries manufacturières. Cependant, les plastiques conventionnels après utilisation sont soit brûlés, libérant des polluants et des fumées toxiques, soit ils s'accumulent dans les sites d'enfouissement, dans l'environnement en général et plus particulièrement dans les océans (Reddy et al., 2003). Les politiques environnementales actuelles visent à augmenter leur niveau de recyclage et à favoriser la récupération d'énergie sur les déchets mis en décharge. Cependant, vu le nombre limité de cycles de recyclage et l'impossibilité d'incinérer tous les plastiques, l'accumulation plastique devient un sérieux problème écologique (Shah et al., 2008). Les plastiques conventionnels sont difficilement biodégradables, pouvant rester dans l'environnement pendant de nombreuses années sans se décomposer. Ainsi par exemple, les bouteilles en polyéthylène téréphtalate (PET) restent intactes pendant 15 ans sur les fonds marins (Fotopoulou et Karapanagioti, 2017). Les bioplastiques, d'autre part, sont biodégradables et peuvent être transformés en dioxyde de carbone et en eau dans des conditions aérobies sur des périodes beaucoup plus courtes (Tokiwa et al., 2009). Par exemple, dans des conditions optimales de compostage, le bioplastique commercial Biopol™ se dégrade complètement en 10 semaines (Australia, 2002).

Dans l'objectif de développer une économie circulaire, la législation européenne sur les résidus évolue face la nécessité de réduire les émissions de dioxyde de carbone, d'améliorer les taux de recyclage et de diminuer l'utilisation des ressources. Par exemple, en France, la nouvelle directive cadre sur les déchets a remplacé les sacs en plastique légers pour de sacs à base de bioplastiques, pour l'emballage des fruits et légumes, et pour de sacs biodégradables ou biocompostables, pour les résidus. Des mesures similaires adoptées par d'autres pays en Europe renforceront le marché des bioplastiques (European Bioplastics, 2015). L'évolution, en termes de capacité de production dans le secteur de

bioplastiques est montrée dans la Figure 1. Le marché mondial des bioplastiques devrait croître de façon continue au cours des prochaines années selon les prévisions du Nova-Institut (Aeschelmann et Carus, 2017). Pour le cas des polyhydroxyalcanoates, la capacité de production était de 35 000 tonnes en 2014 et devrait atteindre environ 100 000 tonnes d'ici à 2020 (Prieto, 2016).



Figure 1: Prédictions pour les capacités mondiales du marché des bioplastiques. Source: European Bioplastics, Nova-Institute (2016).

Selon l'organisation European Bioplastics (2015), on peut classer les bioplastiques en trois catégories : les plastiques d'origine biologique mais non biodégradables, comme le polyéthylène (PE); des plastiques biodégradables qui sont d'origine biologique, comme l'acide polylactique (PLA), le polyhydroxyalcanoate (PHA) ou le succinate de polybutylène (PBS) et, des plastiques biodégradables d'origine fossile comme le polyester aliphatique, qui est compostable.

Il y a un fort intérêt pour produire des plastiques biodégradables afin de réduire la dépendance en ressources pétrolières non renouvelables mais aussi pour réussir à fermer le cycle du carbone: le dioxyde de carbone libéré lorsque le bioplastique se dégrade est capturé par la biomasse; celle-ci peut à son tour être utilisée comme substrat pour la production de bioplastiques. Parmi les plastiques biodégradables, les polyhydroxyalcanoates (PHA) ont gagné de l'importance grâce à leur diversité structurelle et leur analogie avec les plastiques conventionnels d'origine pétrolière (Reddy et al., 2003).

1. Les polyhydroxyalcanoates : histoire et classification

En 1926, Maurice Lemoigne découvrait la présence d'un constituant granulaire, un polyester aliphatique, chez *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926): le polyhydroxybutyrate (PHB) venait d'être découvert. Il a été considéré le seul type de PHA jusqu'à 1974, lorsque Wallen et Rohwedder ont identifié des autres hydroxyalcanoates incluant le β -hydroxybutyrate (Wallen et Rohwedder, 1974). À la fin des années 1980, une grande variété de microorganismes était connue pour leur capacité à stocker du PHB ou PHA, y compris non seulement des microorganismes Gram négatif, mais aussi quelques bactéries Gram positives, des aérobies et bactéries anaérobies (Byrom, 1987). Aujourd'hui, les études avec des cellules eucaryotes et des insectes visent à fournir des informations supplémentaires pour la production future dans des organismes transgéniques. Dans le présent article nous nous focaliserons sur la production de PHAs par des procaryotes.

Les PHAs sont des polymères d'hydroxyalcanoates divers (différentes unités R dans la Figure 2) reliés par des liaisons ester. Quand le nombre de carbone du monomère est <5 , on parle de PHAs à chaîne carbonée courte notés PHA-scl (small chain length-PHA), dont le représentatif est le PHB. Si les monomères ont entre 6 et 12 atomes de carbone, il s'agit de PHAs à chaîne carbonée de longueur

moyenne (medium chain length-PHA ou PHA-mcl) et quand il y a plus de 12 carbones, il s'agit des PHAs à longueur de chaîne longue, notés PHA-lcl (long chain length-PHA).

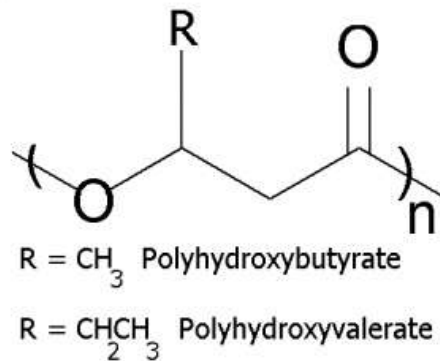


Figure 2: Structure chimique des polyhydroxyalcanotes. Selon la composition chimique de R, on trouve différents PHAs. La figure montre la composition des plus fréquentes : PHB et PHV. n varie de 100 à 30000.

2. Microorganismes producteurs, biosynthèse et régulation de la production

Plus de 300 bactéries ont été identifiées comme productrices de PHAs. Le type de PHA qui sera produit dépend des PHA synthases, de la source de carbone et de la route métabolique utilisées par le microorganisme (Rehm et Steinbüchel, 1999). Il existe quatre classes de PHA synthases, comme illustré dans la Figure 2:

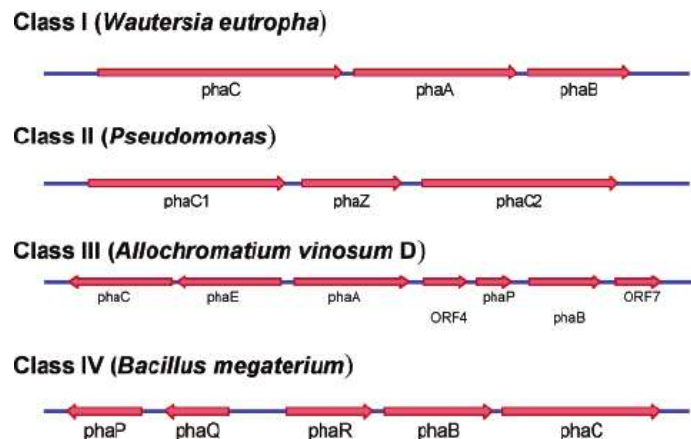


Figure 2: Classes de PHA synthases et organisation des opérons (Rehm et Steinbüchel, 1999).

Les classes I de PHA synthases utilisent des thioester CoA d'acides gras hydroxylés de 3 à 5 atomes de carbone. La classe II utilise préférentiellement des thioesters CoA d'acides gras hydroxylés de chaîne carbonée plus longues, entre 6 et 14 atomes de carbone. La spécificité du substrat de la classe III est similaire à celle de la PHA synthases de classe I, bien que certains mcl-acides gras 3-hydroxylés soient également incorporés. Les substrats pour la classe IV sont que les $3\text{HA}_{\text{scl}}\text{-CoA}$ (Wahl et al., 2012).

La voie de biosynthèse de PHB a l'acétyl-CoA comme précurseur. Ce dernier est converti en (R)-3-hydroxybutyryl-CoA qui est ensuite polymérisé par les microorganismes. Les produits intermédiaires issus de la β -oxydation peuvent également être polymérisés pour produire des PHA par des espèces de *Pseudomonas*. La voie de biosynthèse *de novo* des acides gras conduit à des monomères d'hydroxyalcanoates à partir de sources de carbone simples telles que le gluconate, le fructose, l'acétate, le glycérol et le lactate (Rehm et al., 1998).

3. Architecture macromoléculaire et fonction

Les chaînes de PHA apparaissent, sous la forme naturelle, comme fibrilles (10-15 nm de diamètre) qui sont enroulées pour former des inclusions sphériques de 0,1-0,5 µm de diamètre dans le cytoplasme cellulaire (Dawes et Senior, 1973). Ces inclusions (5 à 20 par cellule) sont entourées d'une couche de phospholipides, phasines, polymérases et dépolymérases, ainsi que d'autres protéines régulatrices (Zinn et al., 2001) comme le montre la Figure 3:

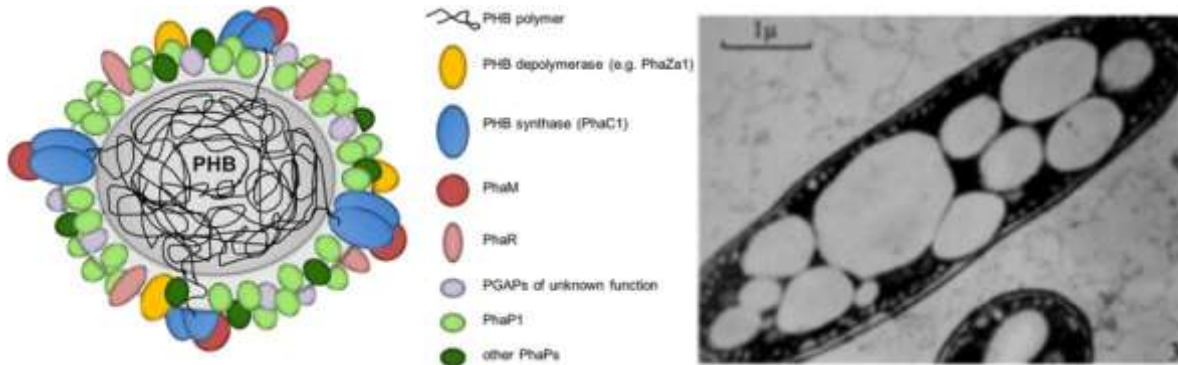


Figure 3: Représentation schématique d'un granule de PHB constitué d'un noyau de polymère et d'une couche superficielle de protéines structurales et fonctionnelles (Bresan et al., 2016) (gauche) et section ultrafine d'une cellule *Azotobacter chroococcum* présentant des granules de PHB entourés d'une membrane (Nutti et al., 1972) (droite).

Les polymères de la famille des PHAs sont des composés de réserve de carbone et d'énergie pour la cellule hôte (Anderson et Dawes, 1990). Les microorganismes accumulent des PHAs lorsqu'il y a un excès d'énergie provenant de sources exogènes par rapport à celui nécessaire aux cellules pour la croissance et la maintenance. Lorsque l'énergie provenant de sources exogènes est insuffisante pour maintenir les processus de viabilité et de croissance cellulaires, les PHAs accumulés par les microorganismes peuvent alors être utilisés pour fournir le carbone et l'énergie nécessaires à ces processus. La dégradation des PHAs, en produits intermédiaires et énergie, dans des conditions sous-optimales de croissance donne ainsi un avantage biologique à la cellule sur d'autres cellules qui ne cumulent pas des composés de réserve tels que les PHAs (Wilkinson, 1963).

4. Propriétés et applications

Outre les propriétés thermoplastiques, une des propriétés les plus attractives des PHAs est leur biodégradabilité. Il existe un nombre important de microorganismes (bactéries et champignons) qui ont des dépolymérases et, par conséquent, sont capables de dégrader les PHAs (Jendrossek et Handrick, 2002). Les produits finaux de dégradation sont du CO₂ et de l'eau dans les environnements organiques, ou CO₂ et méthane dans de conditions anaérobies (Hahn, 1995). Selon les normes établies par EN 13432, les produits biodégradables doivent se décomposer à 90% dans des installations de compostage pendant 180 jours sans laisser de résidu toxique ou produire des effets néfastes (Kalia, 2017). Les produits à base de PHA sont aussi biocompatibles. Ils présentent une grande stabilité aux UV et une faible perméabilité à l'eau.

Les propriétés mécaniques dépendent fortement de la composition de chaque PHA (homo ou copolymères, longueur des acides gras hydroxylés, chaînes latérales). Par conséquent, en contrôlant la composition des monomères, on peut obtenir des plastiques « sur mesure ». Par exemple, le PHB présente une activité optique, piézoélectricité et des bonnes propriétés de barrière, mais il présente une

faible stabilité thermique et il est fragile aux impacts mécaniques (Pachekoski et al., 2009). Ces limites peuvent être surmontées par l'augmentation de la proportion d'hydroxyvalérate (HV) dans le polymère (Yamada et al., 2001). En règle générale, les PHAs composés de hydroxybutyrate (HB) avec des fractions plus longues HV, hydroxyhexanoate (HHx), hydroxyoctonoate (HO), etc. sont des plastiques plus flexibles et résistants (Tableau 1).

Tableau 1: Propriétés physiques et mécaniques du PHB et ses copolymères.

	PHB	PHBV (5%HV)	PHBV (20%HV)	P(3HB-co- HHx)	PHOB (6% HO)	PHOB (31% HO)
Tg (°C)	2	-1 – 0	-5 – 0	-5 – 0	-1.4	-26/-6
Tm (°C)	177	160 - 170	130 – 145	120-130	158	-
Degré de cristallinité (%)	40 – 70	40				
Résistance à la traction (MPa)	15 – 40	30	20	20	10	1.7
Module de Young (GPa)	1.5 – 3	2 – 4	0.8 – 3	0.4 – 0.9	0.17	0.01
Elongation avant rupture (%)	< 5	< 5	< 5 – 50	5 – 10	53	230
Référence	(Bugnicourt et al., 2014; Laycock et al., 2013)	(Laycock et al., 2013; Corre et al., 2012)	(Laycock et al., 2013)	(Laycock et al., 2013; Noda et al., 2004)	(Tappel et al., 2012)	Tappel et al., 2012)

Du le large éventail des propriétés thermoplastiques, les PHAs trouvent des applications dans des domaines aussi variés que l'emballage, l'élaboration de matériaux ménagers, pour l'agriculture, les textiles, etc. (Philip et al., 2007). Mais les applications plus innovantes et peut-être les plus importantes sont les applications médicales (tissu osseux, ingénierie du tissu cartilagineux, pancréas semi-artificiel, conduits nerveux, patch cardio-vasculaire et prothèses) et thérapeutiques (élaboration de microsphères et microcapsules) (Chen et Wu, 2005). Selon les applications, le prix relativement élevé de production des PHAs n'est plus un obstacle à son développement commercial.

À l'heure actuelle, quatre types de PHA, le poly[(R)-3-HB], le copolymère de (R)-3-HB-(R)-3-HV, le copolymère de (R)-3-HB-4-HB, et le copolymère de (R)-3-HB-(R)-3-HHx sont produits à grande échelle dans une vingtaine de plantes à travers le monde (Chen, 2010). De manière générale, le processus de production de PHAs consiste en plusieurs étapes, comprenant la fermentation qui est suivie d'une étape de séparation de la biomasse, du séchage de la biomasse, de l'extraction de PHA, du séchage de PHA et de l'emballage.

5. Méthodes de production

5.1 PHA-scl

5.1.1 Culture pure

La culture pure microbienne a été la stratégie la plus exploitée pour la production de PHA jusqu'à présent. Parmi les souches microbienne connues comme productrices, *Cupriavidus necator* (également connu sous le nom *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*) semble être le

microorganisme producteur le plus prometteur (Verlinden et al., 2011). Ses gènes ont été clonés et transférés à des espèces à croissance rapide, comme *Escherichia coli* et dans la levure comme *Saccharomyces cerevisiae* (Sandström et al., 2015).

L'ingénierie métabolique a également été appliquée pour s'assurer que la plupart du carbone fourni soit canalisé vers la biosynthèse de PHA. De même, les voies inutiles peuvent être arrêtées en inactivant les gènes et l'enzyme(s) impliqués dans certaines réactions (Borrero-de Acuña et al., 2014). De telles manipulations doivent être menées judicieusement pour obtenir une production maximale de PHA dans des temps d'incubation courts et en utilisant des sources de carbone peu coûteuses et facilement disponibles, sans toutefois compromettre la croissance cellulaire.

Actuellement, des efforts sont faits pour développer des procédés mettant en œuvre des bactéries sur des sources de carbone peu coûteuses en vue de réduire les coûts de production globaux des PHAs. Ainsi, de nombreuses sources de carbone à faible coût ont été testées y compris les résidus solides et liquides provenant du traitement des céréales tels que le son de blé et de riz, les sous-produits de l'industrie laitière, la mélasse et d'autres résidus végétaux et les huiles usagées (Verlinden et al., 2011; Bengtsson et al., 2010; Huang et al., 2006). La stratégie la plus étudiée pour l'utilisation des résidus organiques est de d'abord les transformer en acides gras volatils par fermentation microbienne anaérobie. Les acides gras produits sont ensuite utilisés comme matières premières pour la production de PHA (Chakraborty et al., 2009). Une autre alternative est la culture autotrophe pour la production de PHB à partir du dioxyde de carbone ; ceci permettrait au même temps de capturer le CO₂ (Ishizaki et Tanaka, 1991).

Typiquement, la production de PHB est réalisée en mode discontinu avec une durée approximative comprise entre 38 et 72 heures. De cette façon, il est facile de déterminer les conditions limitantes des nutriments nécessaires à la synthèse du polymère. Deux étapes se distinguent dans un processus discontinu:

- Phase de croissance pour atteindre la densité cellulaire souhaitée et épuiser le nutriment qui déclenchera la production de PHB.
- Phase de production, initiée lorsque la limitation nutritionnelle imposée limite la croissance cellulaire.

Les processus en batch (discontinu) sont limités par la quantité initiale de substrats mais ils ne sont pas adaptés pour les substrats qui peuvent inhiber la croissance à des concentrations élevées. La culture fed-batch (discontinue-alimentée) permet un meilleur contrôle des deux étapes de culture et l'utilisation de substrats toxiques potentiels tels que les acides gras volatils (acétate, lactate, propionate, butyrate) qui peuvent être ajoutés progressivement.

Une des productivités les plus élevées à ce jour, 3,14 g/l/h, avec des microorganismes non modifiés a été obtenu dans de cultures fed-batch à haute densité cellulaire d'*Alcaligenes eutrophus* (>281 g/l à la fin de la fermentation) sous limitation de phosphore. L'apport de la source de carbone, dans ce cas glucose, était contrôlé par la concentration d'oxygène dissous et du glucose dans le milieu (Ryu et al., 1997).

En ce qui concerne l'utilisation de substrats peu chers, Ibrahim et Steinbüchel (2009) ont obtenu des résultats prometteurs pour la production de PHB à partir de glycérol en échelle pilote. La productivité du polymère et le coefficient de rendement du substrat étaient 1 g/l/h et 0,25 g/g respectivement après avoir optimisé le processus discontinu alimenté (sous limitation en azote), avec *Zobellella denitrificans*, une souche bactérienne de croissance rapide. En outre, un procédé simple d'extraction de solvant organique a été utilisé pour la récupération de PHB.

Des procédés de production très efficaces ont été rapportés en utilisant *E. coli* hébergeant les gènes biosynthétiques de divers producteurs naturels de PHA. De cette façon, à l'aide d'un système de

membrane de recyclage cellulaire, des productivités de 4 g/l/h ont été obtenus en utilisant des sous-produits provenant de la fabrication du fromage (Suk Ahn et al., 2001).

5.1.2 Culture mixte

Bien que la production commerciale de PHAs repose actuellement sur des techniques de culture de souches pures sélectionnées, la production en culture ouverte pourrait constituer une alternative plus économique (Gurieff et Lant, 2007). Cette stratégie repose sur les principes de sélection naturelle et d'ingénierie de l'écosystème plutôt que sur l'ingénierie de la souche (Albuquerque et al., 2011). Dans le cas des cultures ouvertes, réalisées sous conditions non axéniques, il est possible d'identifier plusieurs avantages par rapport aux systèmes stériles: faibles coûts d'énergie et d'équipement (pas besoin de stériliser les substrats et l'équipements), aucun risque de détérioration de la souche et le risque de contamination est fondamentalement inexistant (Dias et al., 2006). Il n'y a pas besoin de substrats purs et des ressources telles que, par exemple, les acides gras obtenus après fermentation acidogène de déchets peuvent être utilisées (Serafim et al., 2004). La Figure 4 montre un procédé de production de PHA intégré dans un système de traitement des eaux usées.

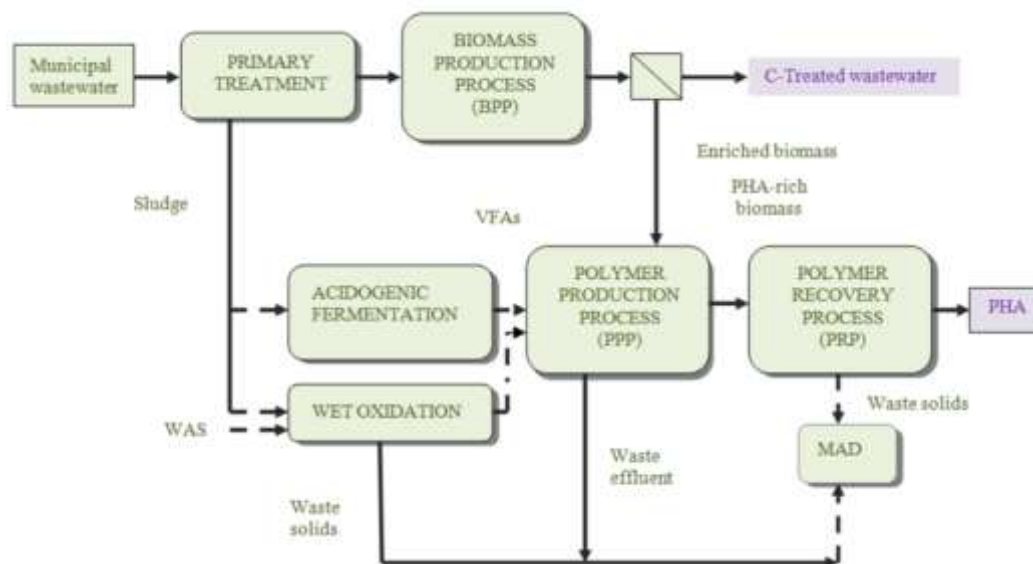


Figure 4: Schéma pour l'intégration d'un procédé de production de PHA dans une station d'épuration (Morgan-Sagastume et al., 2014).

Il existe deux stratégies principales pour l'enrichissement d'une culture mixte avec des microorganismes ayant une capacité supérieure à produire des PHAs. Ces stratégies imposent une forte pression sélective, de sorte que seuls les microorganismes les mieux adaptés survivront:

- **Système AN/AE ou processus alternant conditions anaérobie et aérobie:** pendant la phase anaérobie, la source de carbone (par exemple, l'acétate) est fournie. Certains microorganismes, comme les bactéries qu'accumulent des polyphosphates (PAOs) et des organismes accumulateurs de glycogène (GAOs), peuvent assimiler le substrat sous la forme de PHAs grâce à la dégradation des réserves de glycogène ou du polyphosphate. Par contre, ces microorganismes ne peuvent pas croître sans oxygène, l'accepteur final d'électrons. Au stade aérobie, le carbone est épuisé et le PAOs et le GAOs seront en mesure de croître en dégradant les PHAs accumulés. Ce cycle est répété avec une purge de biomasse à la fin de chaque cycle.
- **Système ADF ou alimentation dynamique aérobie:** ce système est entièrement aérobie et se base dans l'alternance de périodes d'excès de substrat (feast) suivies de périodes de manque de

substrat (famine). C'est pourquoi il est également connu comme «feast and famine». Dans ce système, les bactéries capables d'assimiler le substrat rapidement et de l'accumuler sous forme de PHAs pendant la phase de feast, seront capables de continuer à proliférer pendant la phase de famine grâce à l'utilisation des réserves en PHA. De cette manière les bactéries productrices des PHAs deviennent majoritaires dans le système. Avec cette stratégie couplée à une limitation en azote, des niveaux de PHB très élevés, de l'ordre de 70% de la masse cellulaire, ont été atteints (Morgan-Sagastume et al., 2014 ; Johnson et al., 2009).

Des études sur la limitation nutritionnelle en culture ouverte ont montré qu'une limitation de phosphore a des potentiels encore plus intéressants que celle en azote. Les abondants pools de phosphore dans la cellule permettent une grande flexibilité métabolique lorsque les bactéries sont soumises à une limitation en cet élément. En d'autres termes, le phosphore semble être plus facilement transférable d'un compartiment de la cellule à un autre (Cavaillé, 2015). Avec cette approche, une stratégie de limitation de la croissance par le phosphore pour accumuler du PHB a été mise en place au LISBP utilisant un inoculum issu de boues d'épuration et des acides gras volatils comme substrat. En mode de culture fed-batch, des teneurs en PHB atteignant jusqu'à 70% (g PHB/g DCO) ont été obtenus avec des boues d'assainissement d'origines diverses (Cavaillé et al., 2013). Il a également été démontré que la culture continue ouverte sous double limitation des éléments nutritifs (source de carbone et de phosphore) permettait une sélection de microorganismes accumulateurs de PHB à partir de boues activées (Cavaillé et al., 2016).

5.2 PHA-mcl

5.2.1 Culture pure

En raison des propriétés thermoplastiques améliorées des PHA-mcl, il existe un grand intérêt à produire des copolymères d'hydroxybutyrate, d'hydroxyvalérate et de monomères plus longs (Koller et Braunegg, 2015). Les microorganismes du genre *Pseudomonas* sont les plus exploités pour la production de PHA-mcl en culture pure. Les précurseurs de la synthèse de PHA sont dérivés de la biosynthèse des acides gras lorsque le microorganisme est cultivé sur des sources de carbone telles que le glucose et le glycérol, et la β -oxydation lorsque le microorganisme est cultivé sur des sources de carbone telles que les acides gras (Huijberts et al., 1992). Les principales voies métaboliques pour la production de PHA sont présentées dans la Figure 5.

Des sources de carbone avec une structure chimique proche des PHAs ou avec une structure sans relation avec les PHAs ont été testées en culture pure. Dans le premier cas, des acides alcanoïques (l'acide octanoïque ou nonanoïque), ou des triglycérides (huile ou grasse végétale) étaient la source de carbone (Ashby et Foglia, 1998). La structure des monomères de PHA dépendait alors de la structure des substrats consommés (Khanna et Srivastava, 2005). D'autres substrats, comme les acides gras volatils ou le glycérol, ont également été utilisés pour la production de PHA-mcl ou copolymères, PHB/PHA-mcl (Cerrone et al., 2014 ; Ashby et al., 2004).

Grâce à une stratégie de co-alimentation avec du glucose, Jiang et al. (2013) ont augmenté le rendement de PHA-mcl à partir de l'acide nonanoïque. Dans ce travail, *Pseudomonas putida* KT2440 a été cultivée avec du glucose jusqu'à ce que la limitation en azote soit imposée. Dans l'étape d'accumulation, un mélange de glucose et d'acide nonanoïque a été fourni. Des sous-unités en hydroxyheptanoate (HHp), HO, hydroxynonanoate (HN), hydroxydecanoate (HD) dans le polymère produit ont été détectées: les unités impaires proviennent de l'acide nonanoïque et les unités paires, du métabolisme du glucose.

D'autre part, dans les études métaboliques, le rôle de l'acide acrylique comme inhibiteur de la β -oxydation des acides gras a été étudié par Qi et al. (1998) avec diverses souches génétiquement modifiées. La concentration optimale de l'acide acrylique était de 0,24 mg·ml⁻¹ et provoquait une

canalisation efficace des intermédiaires de la synthèse de la β -oxydation vers l'acide polyhydroxyalcanoïque.

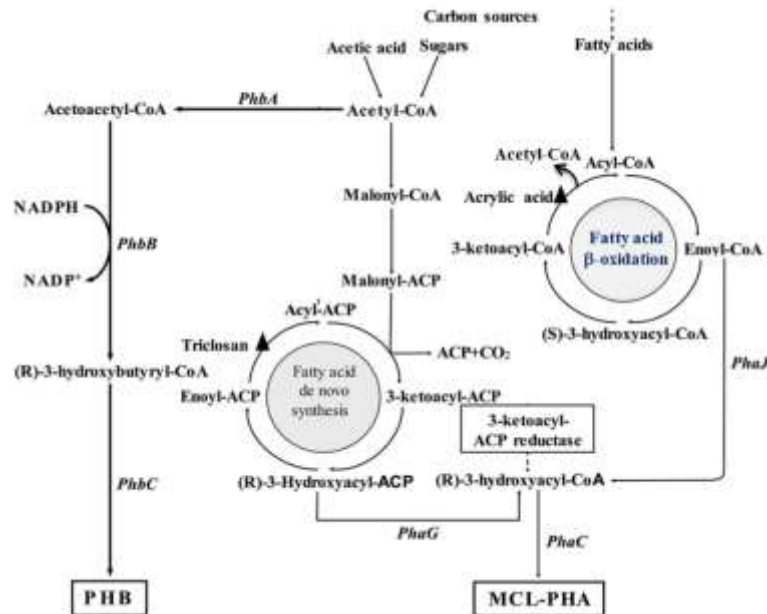


Figure 5: Les principales voies métaboliques utilisées pour la production de PHA en fonction de la source de carbone, adapté du travail de Rehm (2006).

5.2.2 Culture mixte

À notre connaissance, seules quelques études utilisant des consortia microbiens visaient la production de PHA-mcl. Par exemple, Bengtsson et al. (2010) ont étudié la fermentation des acides gras volatils (obtenue dans un fermenteur acidogène à partir de la mélasse de canne à sucre) par une culture microbienne mixte enrichie en microorganismes accumulateurs du glycogène (GAOs) dans des conditions anaérobies-aérobies. Cinq types de monomères ont été détectés dans le polymère produit, à savoir 3HB, 3HV, 3-hydroxy-2-méthylbutyrate (3H2MB), 3-hydroxy-2-méthylvalérate (3H2MV) et 3HHx. Dans une autre étude, Yang et al. (2013) ont analysé la diversité des microorganismes producteurs de PHAs, dans des boues activées soumises à une alimentation dynamique aérobie. La bibliothèque des gènes de PHA synthase construite à partir de ces boues a montré que sur les 80 gènes *phaC* obtenus, 76 appartenaient à la PHA synthase de classe I et quatre à la PHA synthase de classe II. Le PHA obtenu était composée de 3HB, 3HV et 3-hydroxydodecanoate (3HDD). Ce dernier monomère est attribué à l'activité de *Pseudomonas*.

Une accumulation très élevée en PHA-mcl (> 89% mol), avec une petite quantité d'unités de monomères à chaîne courte, a été obtenue par Lee et al. (2011) après un processus d'enrichissement dans un réacteur discontinu séquentiel. Une stratégie de culture alimentée avec de l'acide nonanoïque et un ratio C/N = 40 a permis d'obtenir une teneur maximale en PHA de 48,6% de poids de cellule sèche et un rendement de conversion ($Y_{p/s}$) de 0,94 g/g.

Dans notre laboratoire, par une approche en culture ouverte sans étape d'enrichissement, nous avons obtenu 30% d'accumulation de PHA à partir d'acides gras de moyenne longueur de chaîne carbonée et sous limitation en phosphore. Ces PHAs sont constitués principalement d'unités monomériques de quatre à quatorze atomes de carbone.

Ainsi, ces résultats démontrent la faisabilité de produire des PHA-mcl et PHA-scl-co-mcl à partir de cultures mixtes. C'est certainement un domaine de recherche prometteur qui attirera de plus en plus l'attention dans un proche avenir.

Références bibliographiques

- Albuquerque M.G.E., Martino V., Pollet E., Avérous L., Reis M.A.M., 2011. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *J. Biotechnol.*, vol. 151, no. 1, pp. 66–76
- Aeschelmann F., Carus M., 2017. Bio-based building blocks and polymers global capacities and trends 2016–2021. Nova-Institut GmbH, Hürth, Germany
- Anderson A.J., Dawes E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, vol. 54, no. 4, pp. 450–472
- Ashby R.D., Foglia T.A., 1998. Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 49, no. 4, pp. 431–437.
- Ashby R.D., Solaiman D.K.Y., Foglia T.A., 2004. Bacterial Poly(Hydroxyalkanoate) Polymer Production from the Biodiesel Co-product Stream. *J. Polym. Environ.*, vol. 12, no. 3, pp. 105–112
- Australia E., 2002. Biodegradable Plastics – Developments and Environmental Impacts.
- Bengtsson S., Pisco A.R., Reis M.A.M., Lemos P.C.V., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. *J. Biotechnol.*, vol. 145, no. 3, pp. 253–263
- Borrero-de Acuña J. et al., 2014. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 1, p. 88
- Bresan S., Sznajder A., Hauf W., Forchhammer K., Pfeiffer D., Jendrossek D., 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Sci. Rep.*, vol. 6, 2016.
- Bugnicourt E., Cinelli P., Lazzeri A., Alvarez V., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym. Lett.*
- Byrom D., 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.*, vol. 5, no. 9, pp. 246–250
- Cavaillé L., et al., 2013. Polyhydroxybutyrate production by direct use of waste activated sludge in phosphorus-limited fed-batch culture. *Bioresour. Technol.*, vol. 149, pp. 301–309
- Cavaillé L., 2015. Production de poly-hydroxy-butyrates à partir d'acides gras volatils en culture ouverte : Influence du degré de limitation en phosphore sur les réponses cinétiques et les sélections microbiennes. Université fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées.
- Cavaillé L., et al., 2016. Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth conditions in non-axenic continuous culture. *Bioresour. Technol.*, vol. 201, pp. 65–73
- Cerrone F., et al., 2014. Medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production from volatile fatty acids derived from the anaerobic digestion of grass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, no. 2, pp. 611–620
- Chakraborty P., Gibbons W., Muthukumarappan K., 2009. Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, no. 6, pp. 1996–2005
- Chen G.-Q., Wu Q., 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6565–6578
- Chen G.-Q. (Ed.), 2010. Industrial production of PHA. Springer, Berlin, pp. 121–132.
- Corre Y.-M., Bruzaud S., Audic J.-L., Grohens Y., 2012. Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study,” *Polym. Test.*, vol. 31, no. 2, pp. 226–235
- Dawes E.A., Senior P.J., 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 10, pp. 135–266
- Dias J.M.L. et al., 2006. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 11, pp. 885–906,

- European Bioplastics, 2015. French law introduces measures to strengthen bioplastics market Biobased, biodegradable fruit and vegetable bags mandatory as of January 2017. Available: http://www.european-bioplastics.org/pr_150723/. [Accessed: 17-Apr-2017].
- European Bioplastics, 2016. What types of bioplastics do exist and what properties do they have?. Available: <http://www.european-bioplastics.org/faq-items/what-types-of-bioplastics-do-exist-and-what-properties-do-they-have/>. [Accessed: 25-Apr-2017].
- Fotopoulou K.N., Karapanagioti H.K., 2017. Degradation of various plastics in the environment. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–22.
- Gurieff N., Lant P., 2007. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 17, pp. 3393–3403
- Hahn S.K., Chang Y.K., Lee S.Y., 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 1, pp. 34–39
- Huang T.-Y., Duan K.-J., Huang S.-Y., Chen C.W., 2006. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 8, pp. 701–706
- Huijberts G.N., Eggink G., de Waard P., Huisman G.W., Witholt B., 1992. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, no. 2, pp. 536–44
- Ibrahim M.H., Steinbüchel A., 2009. Poly (3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 19, pp. 6222–6231
- Ishizaki A., Tanaka K., 1991. Production of poly- β -hydroxybutyric acid from carbon dioxide by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697T. *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 71, no. 4, pp. 254–257
- Jendrossek D., Handrick R., 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 403–432
- Jiang X.J., Sun Z., Ramsay J.A., Ramsay B.A., 2013. Fed-batch production of MCL-PHA with elevated 3-hydroxy-nonanoate content. *AMB Express*, vol. 3, no. 1, p. 50
- Johnson K., Jiang Y., Kleerebezem R., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M., 2009. Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 4, pp. 670–676
- Kalia V.C. (Ed.), 2017. *Microbial Applications* vol. 2. Cham: Springer International Publishing.
- Khanna S., Srivastava A.K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 607–619
- Koller M., Braunegg G., 2015. Potential and Prospects of Continuous Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, vol. 2, no. 2, pp. 94–121
- Laycock B., Halley P., Pratt S., Werker A., Lant P., 2013. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Prog. Polym. Sci.*, vol. 38, no. 3–4, pp. 536–583
- Lee S.H., Kim J.H., Mishra D., Ni Y.-Y., Rhee Y.H., 2011. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by activated sludge enriched under periodic feeding with nonanoic acid. *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 10, pp. 6159–6166
- Lemoigne M., 1926. Produits de déshydratation et de Polymérisation de l'Acide β -oxobutyrique. *Bull Soc Chim Biol*, vol. 8, pp. 770–782
- Morgan-Sagastume F., et al., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sludge and municipal wastewater treatment. *Water Sci. Technol.*, vol. 69, no. 1, p. 177
- Noda I., Satkowski M.M., Dowrey A.E., Marcott C., 2004. Polymer Alloys of Nodax Copolymers and Poly(lactic acid). *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 3, pp. 269–275
- Nuti M.P., de Bertoldi M., Lepidi A.A., 1972. Influence of phenylacetic acid on poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in *Azotobacter chroococcum* Beij. *Can. J. Microbiol.*, vol. 18, no. 8, pp. 1257–1261

- Pachekoski W.M., Agnelli J.A.M., Belem L.P., 2009. Thermal, mechanical and morphological properties of poly (hydroxybutyrate) and polypropylene blends after processing. *Mater. Res.*, vol. 12, no. 2, pp. 159–164
- Philip S., Keshavarz T., Roy I., 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 82, no. 3, pp. 233–247.
- Prieto A., 2016. To be, or not to be biodegradable... that is the question for the bio-based plastics.” *Microb. Biotechnol.*, vol. 9, no. 5, pp. 652–657.
- Qi Q., Steinbüchel A., Rehm B.H.A., 1998. Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid β -oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 167, no. 1, pp. 89–94
- Reddy C.S., Ghai R., Rashmi, Kalia V., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour. Technol.*, vol. 87, no. 2, pp. 137–146
- Rehm B.H.A., Steinbüchel A., 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 25, no. 1–3, pp. 3–19
- Rehm B.H.A., Krüger N., Steinbüchel A., 1998. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The PHAG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 37, pp. 24044–51
- Rehm B.H.A., 2006. Genetics and Biochemistry of Polyhydroxyalkanoate Granule Self-assembly: The Key Role of Polyester Synthases. *Biotechnol. Lett.*, vol. 28, no. 4, pp. 207–213
- Ryu H.W., Hahn S.K., Chang Y.K., Chang H.N., 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 55, no. 1, pp. 28–32
- Sandström A.G., Muñoz de Las Heras A., Portugal-Nunes D., Gorwa-Grauslund M.F., 2015. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of poly-3-d-hydroxybutyrate from xylose. *AMB Express*, vol. 5, p. 14
- Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 3, pp. 246–265
- Serafim L.S., Lemos P.C., Oliveira R., Reis M.A.M., 2004. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 87, no. 2, pp. 145–160
- Suk Ahn W., Jae Park S., Yup Lee S., 2001. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, vol. 23, pp. 235–240
- Tappel R.C., Kucharski J.M., Mastroianni J.M., Stipanovic A.J., Nomura C.T., 2012, Biosynthesis of Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] copolymers with controlled repeating unit compositions and physical properties. *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 9, pp. 2964–2972
- Tokiwa Y., Calabia B.P., Ugwu C.U., Aiba S., 2009. Biodegradability of Plastics. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 3722–3742
- Verlinden R.A., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., Piotrowska-Seget Z., Radecka I.K., 2011. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*, vol. 1, no. 1, p. 11
- Wahl A. et al., 2012. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiol.*, vol. 12, no. 1, p. 262, 2012.
- Wallen L.L., Rohwedder W.K., 1974. Poly-beta-hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 8, no. 6, pp. 576–579, Jun. 1974.
- Wilkinson J.F., 1963. Carbon and Energy Storage in Bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, vol. 32, no. 2, pp. 171–176
- Yamada S., Wang Y., Asakawa N., Yoshie N., Inoue Y., 2001., Crystalline structural change of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with narrow compositional distribution. *Macromolecules* 34(13):4659-4661

Yang C., et al., 2013. Analysis of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene and PHA-producing bacteria in activated sludge that produces PHA containing 3-hydroxydodecanoate. *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 346, no. 1, pp. 56–64

Zinn M., Witholt B., Egli T., 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 53, no. 1, pp. 5–21

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL)