



HAL
open science

Livrable 2.3 : Impact des fructanes sur la biodégradation.

Feriel Bacoup

► **To cite this version:**

Feriel Bacoup. Livrable 2.3: Impact des fructanes sur la biodégradation.. Unilasalle Rouen. 2022. hal-04555521

HAL Id: hal-04555521

<https://hal.science/hal-04555521>

Submitted on 23 Apr 2024

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.

Livrable 2.3

Impact des fructanes sur la biodégradation

Résumé du projet

Le projet Algriplast a pour but de développer des nouveaux matériaux et produits finis plastiques biodégradables en valorisant des dérivés et coproduits issus des productions agroalimentaires. Les travaux portent notamment sur la recherche de nouvelles fonctionnalités pouvant être apportées par l'utilisation de ces coproduits dans la plasturgie. Ce projet, d'un budget de 1,25 M€, est soutenu par la Région Normandie et des fonds européens (Fonds Européen de Développement Régional).

- Conception de nouvelles formulations bioplastiques
- Développement de nouvelles applications rigides, semi-rigides et souples
- Contrôle de la durée de vie en modulant la cinétique de biodégradation
- Mise en place de procédés industriels pour la production de prototypes
- Étude de l'impact environnemental à l'aide d'une analyse de cycle de vie

Ce projet, mené par Natureplast, est réalisé par un partenariat qui regroupe des laboratoires de recherche universitaires, des sociétés privées ainsi qu'une coopérative agricole.

- NaturePlast
- Algaia
- NOV'A Recherche (service innovation Coopérative Agrial)
- UMR EVA - Université de Caen
- UniLaSalle

Résumé

La seconde tâche du projet ALGRIPLAST, portée par Unilasalle, couvre la réalisation de travaux de Recherche et Développement portant sur la biodégradation des polymères, dérivés et coproduits ici étudiés. Une étude de la biodégradabilité des systèmes composites polymères biodégradables + coproduits a été réalisée pour mettre en évidence l'influence de la présence de coproduits sur la cinétique de biodégradation.

Le présent rapport synthétise les travaux de laboratoire réalisés permettant d'étudier l'impact de l'ajout de fructanes au sein de formulation de matériaux biosourcés sur la cinétique de biodégradation. Le rapport présentera l'identification de la composition en fructanes de différents co-produits, les résultats d'extraction et de purification de fructanes de poireaux à échelle pilote menés par le laboratoire EVA et la société Algaïa, et les cinétiques de biodégradation des composites à base de fructanes.

Sommaire

| | |
|--|----|
| 1. Identification de la composition en fructanes et amidon des différents coproduits et mise au point de la purification des fructanes à l'échelle laboratoire | 5 |
| 2. Extraction et purification des fructanes de poireau en pilote industriel | 9 |
| 3. Influence sur les cinétiques de biodégradation des composites | 10 |
| a. Formulations et mise en œuvre des composites à base de fructanes | 10 |
| b. Etude de compostabilité par minéralisation (quantification de CO ₂ produit) (NF T51-800) | 11 |
| c. Suivi analytique de la compostabilité..... | 12 |
| CONCLUSION | 15 |

1. Identification de la composition en fructanes et amidon des différents coproduits et mise au point de la purification des fructanes à l'échelle laboratoire

Les teneurs en fructanes et amidon (polysaccharides non-structuraux) des co-produits céréaliers et légumiers fournis par AGRIAL ont été déterminées pour ensuite être utilisé pour les tests de plastification par Natureplast (voir Livrable correspondant).

Les teneurs en amidon ont été déterminées grâce à une hydrolyse enzymatique par des enzymes microbiennes (α -amylase et amyloglucosidase) suivie d'un dosage du glucose libéré (Figure 2.3.1). Le glucose a été dosé grâce à des réactions enzymatiques (glucose oxydase et peroxydase) suivies d'une détection par spectrophotométrie de la quinoéimine produite lors de la réaction.

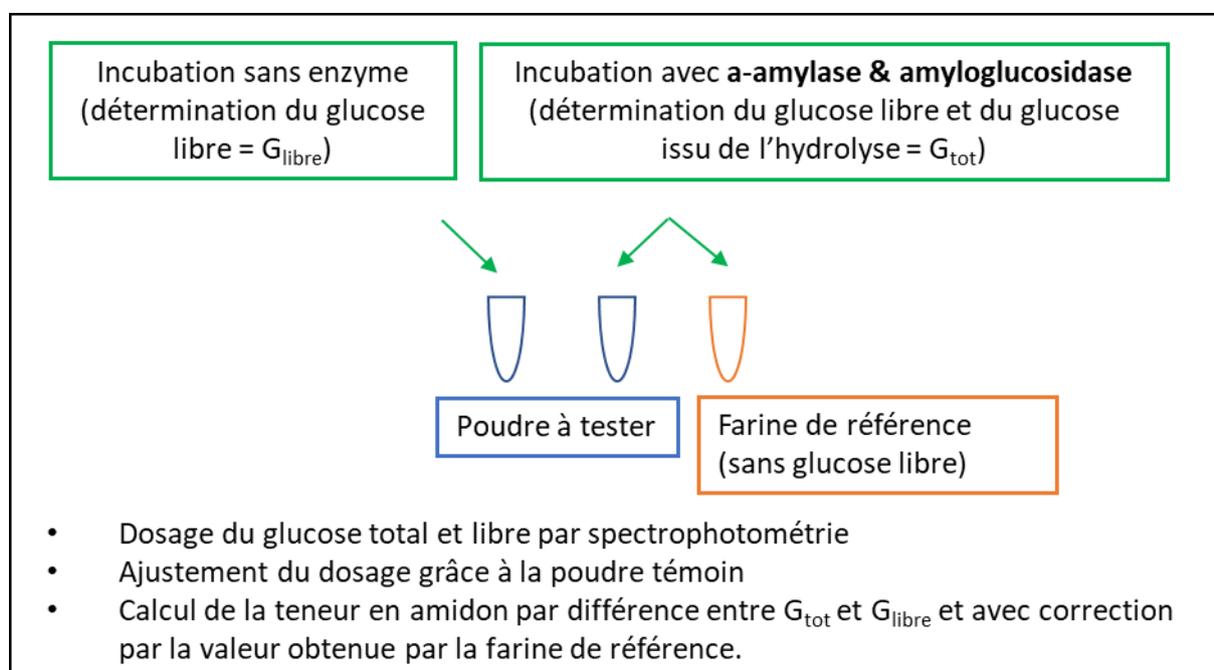


Figure 2.3.1. Dosage de l'amidon par hydrolyse enzymatique sur poudres végétales (kit Total Starch, Megazyme, Irlande)

Les glucides solubles (fructanes, saccharose, glucose, fructose) ont été analysés après extraction dans l'eau chaude et purification des glucides solubles par dessalage sur résines échangeuses d'ions. Les teneurs en glucides solubles ont été déterminées par chromatographie liquide haute pression (HPLC) avec une séparation sur colonne Sugar-Pak (Waters, USA) et une détection par indice réfractométrique. Cette méthode permet de quantifier les fructanes, les oligosaccharides et les mono- et disaccharides présents dans l'extrait (Figure 2.3.2).

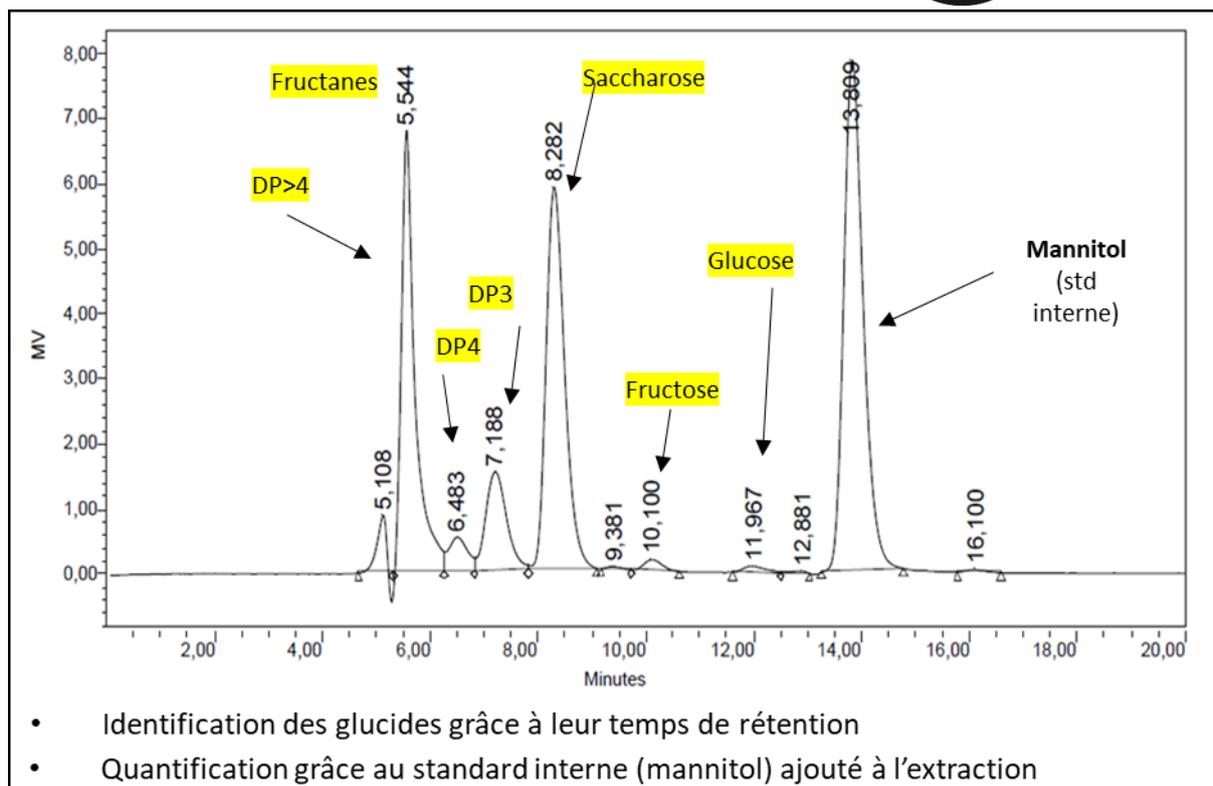


Figure 2.3.2. Exemple de chromatogramme obtenu par séparation en HPLC avec colonne Sugar-pak (Waters, USA) et détection par réfractométrie (extrait de blé).

Le tableau 2.3.1 présente les résultats obtenus pour les co-produits céréaliers. Les teneurs en amidon sont comprises entre 450 et 700 mg/g de matière sèche (MS) soit 45 à 70%. Les fructanes, composés minoritaires de grains, représentent 4 à 7 % de la MS.

Tableau 2.3.1. Teneurs en glucides non structuraux (mg/g MS) dans trois co-produits céréaliers issus de tri de semences.

| Co-produits | Fructanes | Saccharose | Glucose | Fructose | TOTAL Glucides non structuraux solubles | Amidon | TOTAL Glucides non structuraux |
|-------------|-----------|------------|---------|----------|---|---------|--------------------------------|
| Avoine | 41,4 | 9,7 | 0,4 | 0,5 | 56,7 | 466 ±10 | 522,7 |
| Blé | 66,5 | 44,1 | 0,4 | 0,2 | 122,3 | 675 ±28 | 797,3 |
| Triticale | 43,2 | 33,3 | 0,7 | 0,6 | 90,2 | 692 ±8 | 782,2 |

Ces méthodes d'analyses ont aussi été utilisées pour l'analyse des glucides non structuraux de différents produits ou co-produits du poireau (Figure 2.3.3). L'amidon a été analysé mais n'a pas été détecté, indiquant que les teneurs sont très faibles (<1%). Le co-produit « champ », correspondant au sommet des feuilles contient peu de fructanes (environ 5%) et les teneurs en sucres solubles (saccharose, glucose, fructose) sont très faibles (<1%). Les co-produits « entrée usine » et « ligne vinaigrette – feuilles » contiennent environ 7% de fructanes et de fortes teneurs en monosaccharides (glucose et fructose) qui représentent ensemble environ 30% de la MS. Le produit « poireaux

vinaigrette » contient de fortes teneurs en glucides soluble qui représentent plus de 50% de la MS avec des teneurs élevées en fructanes (plus de 25% de la MS). Comme les co-produits « feuilles », les monosaccharides représentent près de 25% de la MS du produit « poireaux vinaigrette ». Le co-produit « racines » de la ligne poireaux vinaigrette contient moins de glucides solubles que le produit « poireaux vinaigrette » (environ 35% de la MS) mais contient très majoritairement des fructanes qui représentent plus de 30% de la MS.

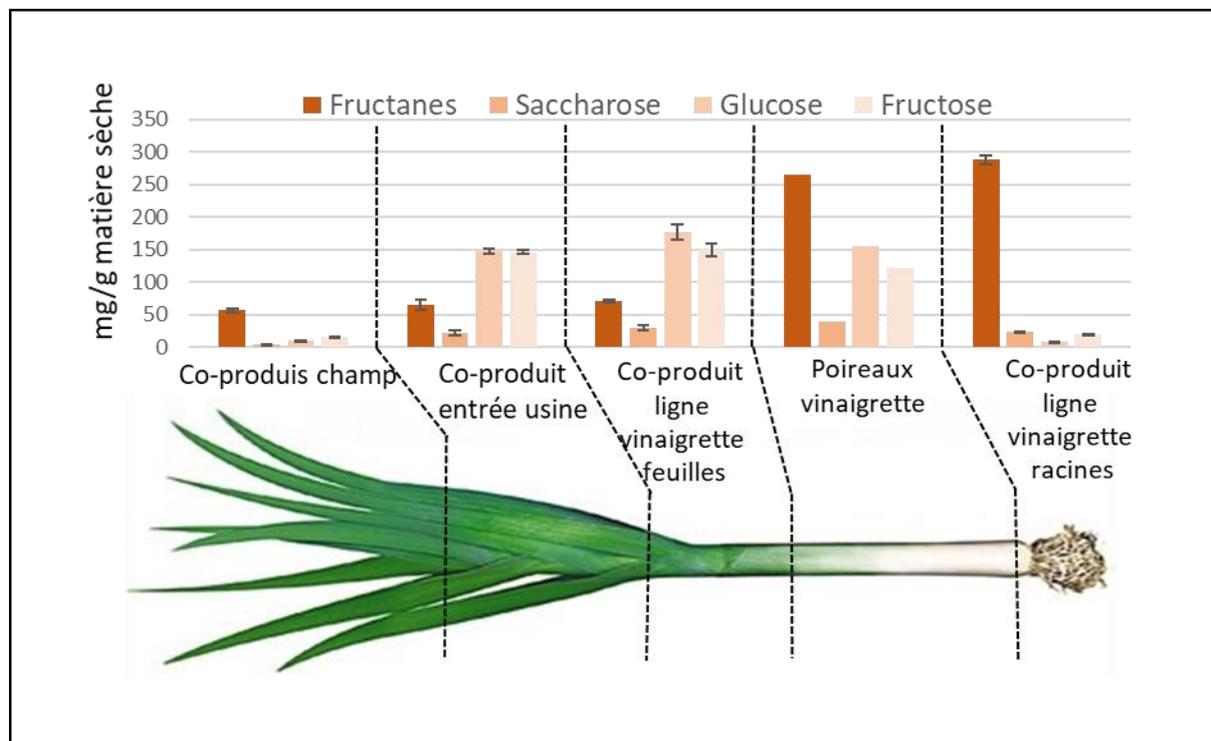


Figure 2.3.3. Teneurs en glucides solubles (mg/g MS) dans les différentes parties du poireau à la récolte au champ ou dans la ligne de production « poireaux vinaigrette »

Les deux fractions les plus riches en fructanes (produit « poireaux vinaigrette » et co-produit « racines ») ont été utilisées pour purifier les fructanes à l'échelle « laboratoire ». L'objectif est de démontrer la faisabilité avant le passage à la purification à l'échelle « pilote » mais aussi d'obtenir une fraction pure pour pouvoir déterminer les différents types de fructanes présents chez le poireau (analyse en LC-MS par prestation de service).

La figure 2.3.4 est une représentation schématique du protocole mis au point pour l'extraction et la purification à partir de lots de produits ou co-produits de 600 g de matière fraîche congelée. Après trois extractions successives à l'eau bouillante, les filtrats sont lyophilisés puis re-solubilisés dans un petit volume d'eau ultra-pure avant un dessalage sur résines échangeuses de cations et anions. Le filtrat dessalé est de nouveau lyophilisé puis repris dans un petit volume d'eau ultra-pure avant des séparations successives par exclusion de taille sur gel Sephadex. Cette étape a été mise au point après analyse des différentes sous-fractions obtenues (Figure 2.3.5). Le protocole finalisé a permis de séparer les fructanes de DP>10 des oligo-fructanes, du saccharose et des monosaccharides. Les fructanes purs obtenus sont lyophilisés pour une conservation à sec avant analyse.

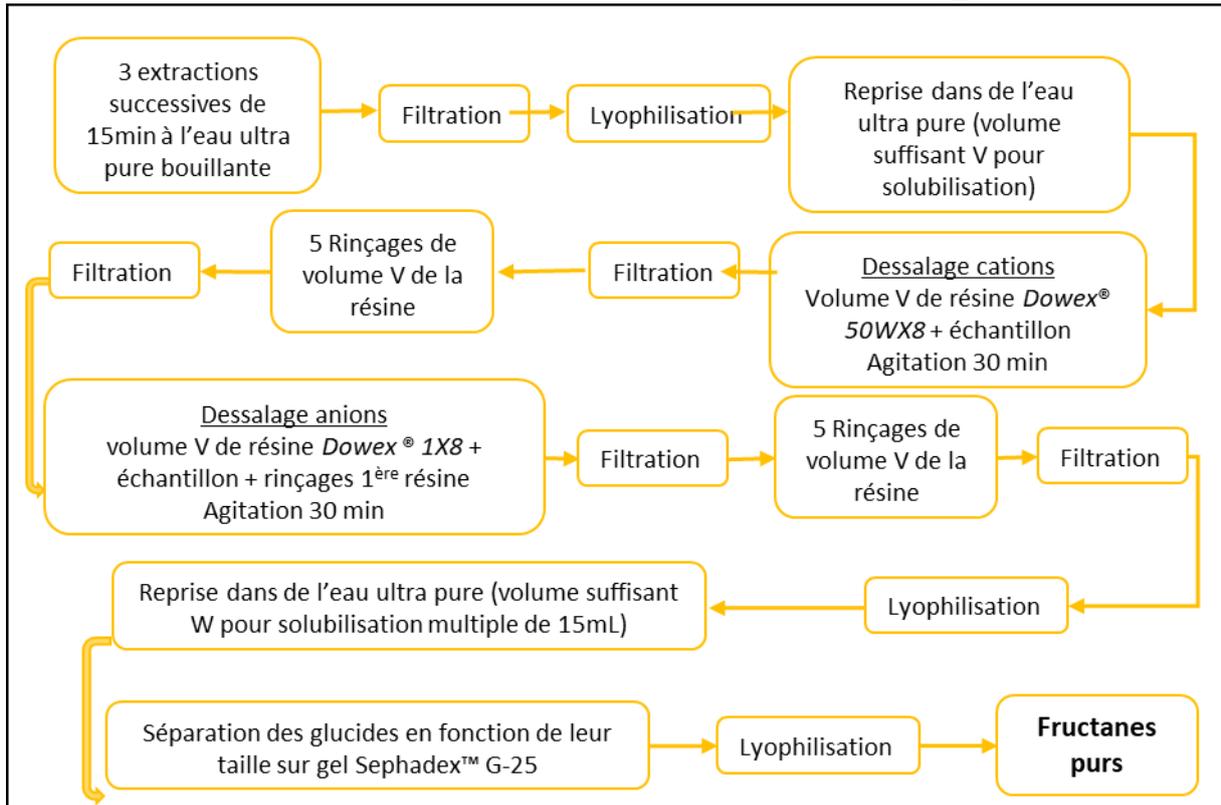


Figure 2.3.4. Protocole d'extraction et de purification des fructanes du poireaux à l'échelle laboratoire.

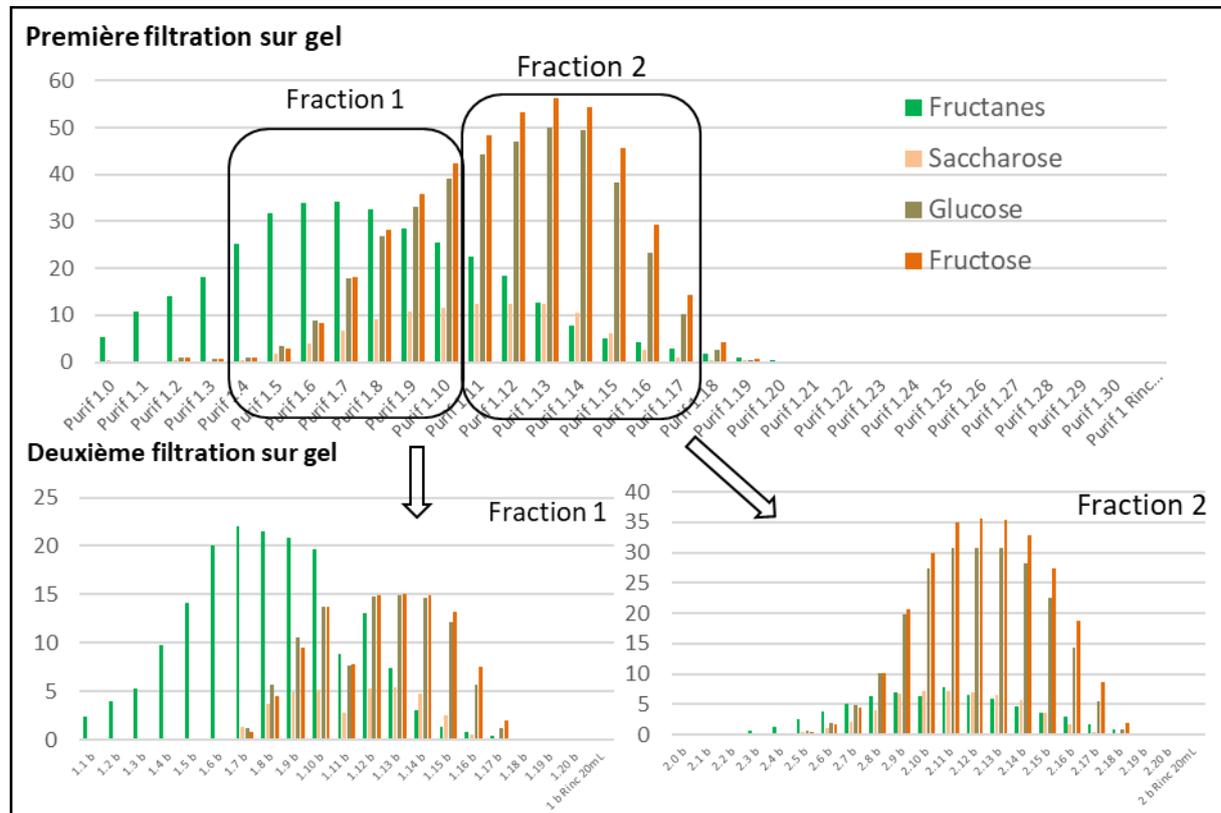


Figure 2.3.5. Exemple d'analyse des différentes fractions obtenues par filtration sur gel Sephadex.

Les fructanes purs obtenus à partir du produit « poireaux vinaigrette » et du co-produit « racines » sont analysés par Scott J. Harrison (prestation de service avec la société AFFINITY BOIMARKER LABS, Londres, UK) qui est le spécialiste de la caractérisation des fructanes par LC-MS¹. Ces analyses montrent la présence de différents isomères, principalement de DP3 à DP7, avec quelques isomères allant jusqu'à DP20.

Grâce à l'ensemble des analyses effectuées et des tests réalisés pour la mise au point de ces protocoles, un « Guide méthodologique de l'analyse des glucides non-structuraux dans des échantillons végétaux » est en cours de rédaction. L'objectif est de publier ce guide dans un journal technique national (cahiers techniques de l'INRAE – NOV'AE²) et dans un journal technique international (Bio-protocol³). La figure 2.3.6 présente un exemple d'illustration qui sera inclus dans ce guide.

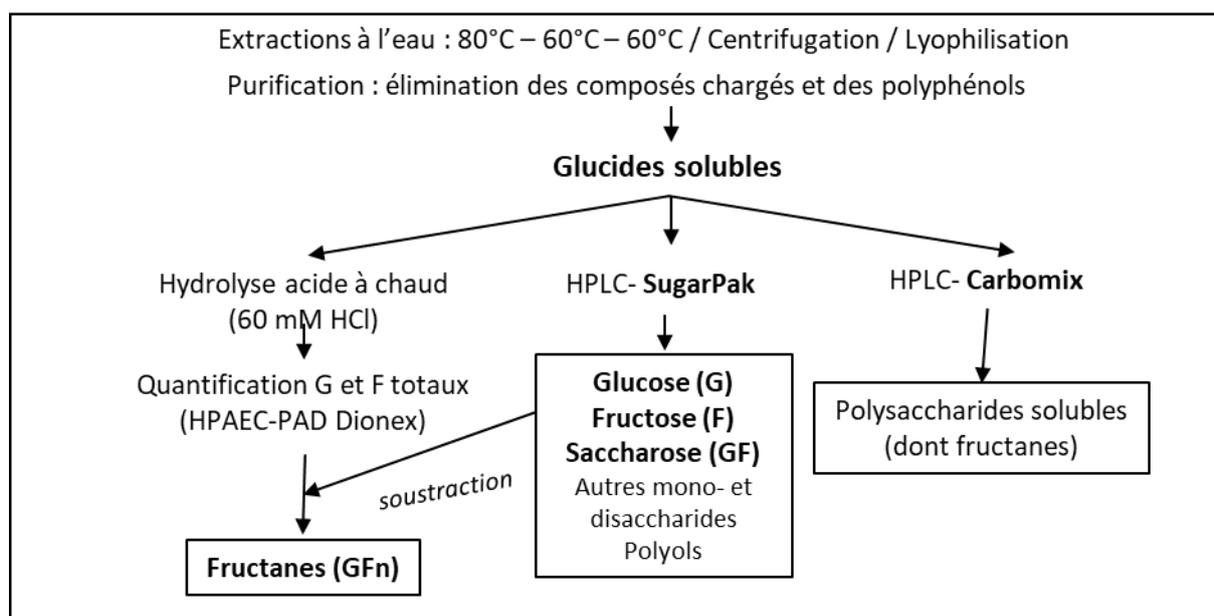


Figure 2.3.6. Exemple d'illustration pour le guide méthodologique en cours de rédaction pour une publication dans un journal technique.

2. Extraction et purification des fructanes de poireau en pilote industriel

Le protocole de purification utilisé à l'échelle laboratoire a été adapté pour passer à l'échelle pilote industriel. L'extraction des glucides solubles a été faite en une seule fois mais en allongeant la durée de l'extraction à l'eau à 80°C. La séparation de l'extrait et des résidus insolubles a été faite par décantation centrifuge. La purification des fructanes a été réalisée par ultrafiltration/diafiltration avec un seuil de coupure à 1000 Da. Ce seuil a été choisi d'après les analyses en laboratoire qui ont montré une forte proportion de fructanes de faible DP (à partir de DP3, soit 506 Da) dans les extraits de poireaux. Cette purification a été suivie d'une évaporation sous -vide permettant une première phase de concentration suivie d'une atomisation (prestation de service, POLYMARIS). Les fractions enrichies

¹ J. Verspreet et al. / Carbohydrate Polymers 174 (2017) 343–351

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.063>

² <https://www6.inrae.fr/novae>

³ <https://bio-protocol.org/default.aspx>

en fructanes ont été utilisées pour les tests de plastification réalisées par Natureplast (voir Livrable correspondant), suivis des tests de biodégradabilité réalisés par UniLaSalle (partie 3 ci-après).

La composition en glucides des fractions obtenues lors des différentes étapes de purification en pilote industriel est présentée dans la figure 2.3.7.

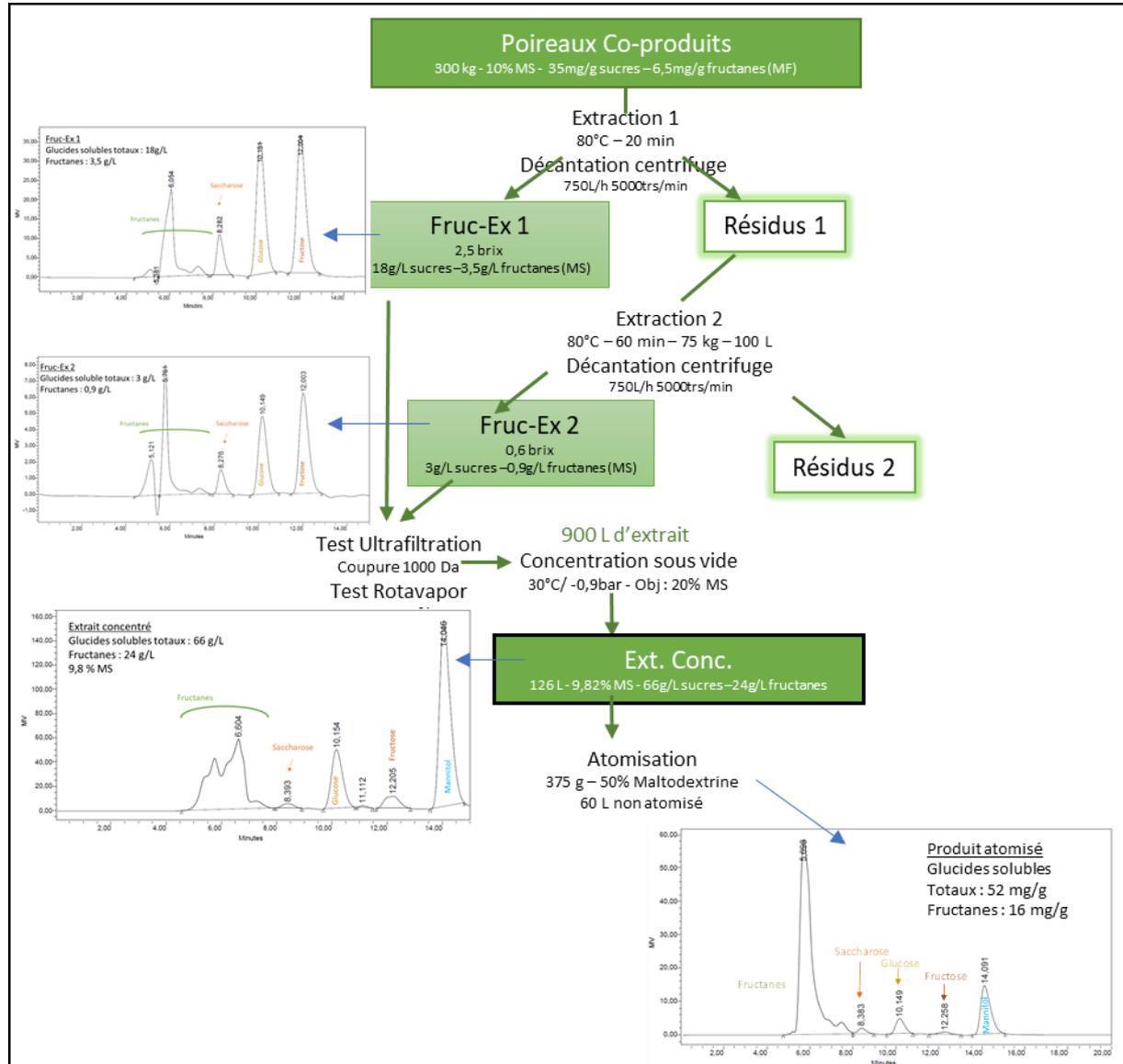


Figure 2.3.7. Analyse des glucides solubles dans les différentes fractions au cours de la purification des fructanes de poireaux en pilote industriel.

3. Influence sur les cinétiques de biodégradation des composites

a. Formulations et mise en œuvre des composites à base de fructanes

Pour réaliser les essais de compostabilité, cinq composites ont été mis en œuvre par extrusion, et obtenus sous forme de bandelettes. Les formulations suivantes ont été sélectionnées (Figure 2.3.8) :

- PLA/Fructane d'agave commercial (95/5)
- PLA/inuline de chicorée commercial (95/5)
- PLA/résidu de poireaux (95/5) noté ALG200210-X
- PLA/extrait de poireaux atomisé (composé à 50% de maltodextrine)(95/5) noté ALG200210-Y
- PLA/extrait de poireaux lyophilisés (95/5) noté ALG200210-AS

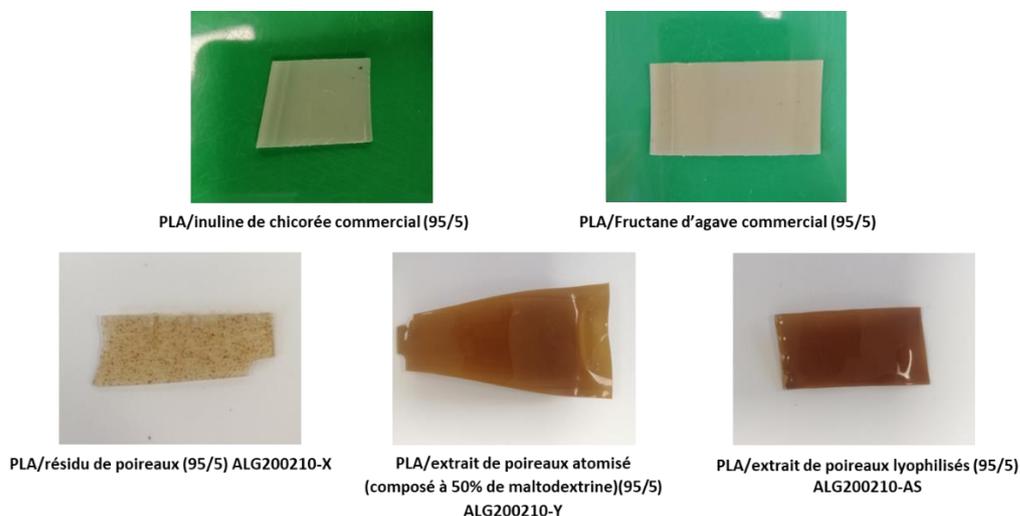


Figure 2.3.8. Bandelettes obtenues par extrusion à base de PLA et de fructane

b. Etude de compostabilité par minéralisation (quantification de CO₂ produit) (NF T51-800)

Une étude de minéralisation a été menée sur deux des cinq composites décrits précédemment. Les trois autres échantillons seront testés au-delà du temps du projet. Le livrable fera l'objet d'une mise à jour lorsque les tests seront finalisés. Le protocole, réalisé selon la norme NF T51-800, basé sur la quantification de CO₂ produit au cours du compostage a été décrit en détails dans le livrable 2.1 « Travaux de laboratoire ».

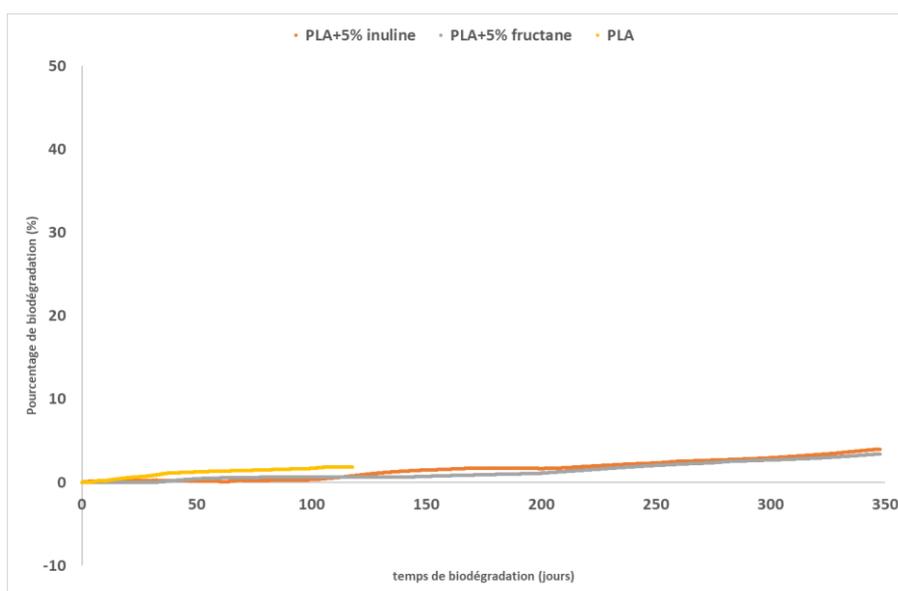
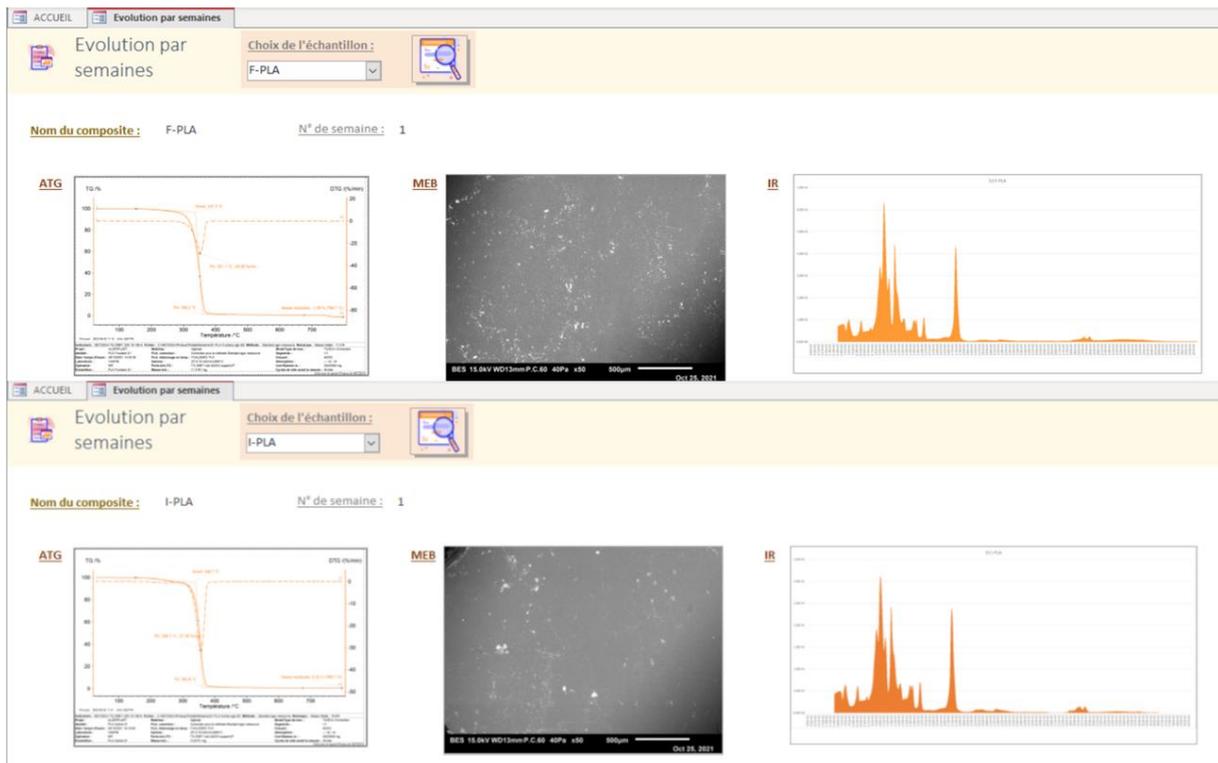


Figure 2.3.9. Etude de minéralisation des échantillons de PLA (jaune), PLA fructose (gris) et PLA inuline (orange)

La figure 2.3.9 met en évidence de très faible taux de minéralisation au bout d'un an d'essai (< 5%) quelle que soit la formulation. Cette figure nous permet également de comparer les cinétiques de minéralisation des deux formulations à base de fructose avec une cinétique de minéralisation du PLA seul réalisée dans les mêmes conditions de compostage domestique. Les trois cinétiques de minéralisation obtenues sont similaires. L'ajout de 5% de fructose pur provenant d'agave ou de chicorée n'impacte pas la cinétique de minéralisation.

c. Suivi analytique de la compostabilité

En parallèle de l'étude de minéralisation, un suivi analytique a également été menée sur les cinq composites décrits précédemment. Le protocole basé sur un suivi hebdomadaire du composite par analyse infra-rouge, analyse thermogravimétrique et par microscopie électronique à balayage au cours du compostage a été décrit en détails dans le livrable 2.1 « Travaux de laboratoire ». L'ensemble des analyses a été regroupé par type de composite et par semaine d'analyse dans la base de données Access créée dans le cadre du projet Algriplast (figure 2.3.10).



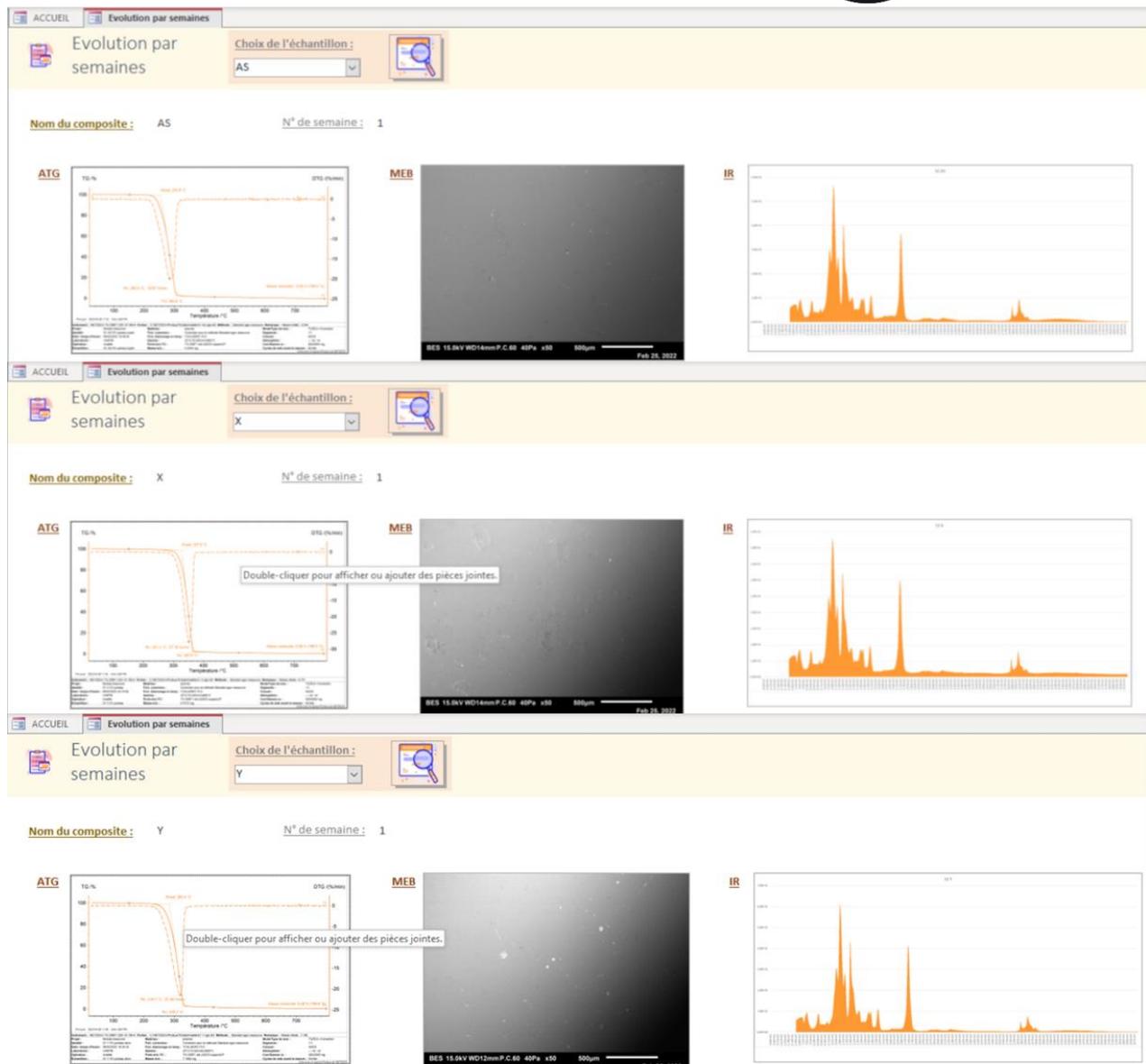


Figure 2.3.10. Suivi analytique semaine 1 des cinq formulations à base de fructose extrait de la base de données Access

Les analyses thermogravimétriques réalisées lors de ce suivi ne montrent pas de modification importante de la température de dégradation quelle que soit la semaine d'analyse ou la nature de la formulation à base de fructose. La température de dégradation correspond bien à la température de dégradation du PLA qui ne semble pas avoir subi de biodégradation. Ceci confirme les résultats obtenus lors de l'étude minéralisation.

Les analyses par infra-rouge réalisées lors de ce suivi montrent également très peu de modifications de bandes d'absorptions par rapport aux spectres réalisés pour le PLA seul. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment. Cependant la figure 2.3.11 met en évidence une différence entre les spectres infra-rouge à base de fructose pur et les spectres obtenus à base d'extrait de poireaux.

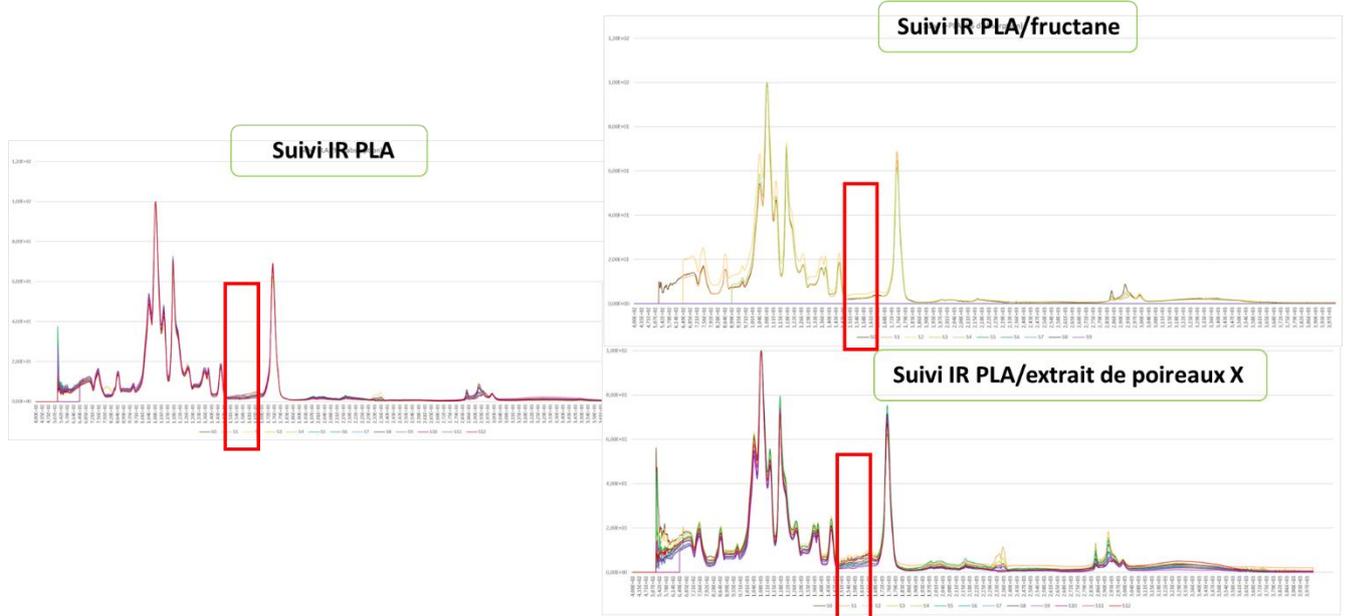


Figure 2.3.11. Suivi analytique par IR formulations à base de fructane et d'extrait de poireaux X

En observant plus particulièrement sur l'ensemble des spectres, la zone située entre 1600 et 1500 cm^{-1} , correspondant à la formation de liaisons amides, une légère augmentation de l'absorbance uniquement sur les spectres de PLA à base d'extrait de poireaux. La formulation ne contenant pas d'azote, ceci met donc en évidence la formation de liaisons amides entre les enzymes présentes dans l'inoculum et la surface de la formulation. La formation de ces liaisons n'est pas observée dans le cas de la formulation à base de fructane pur. La figure 2.3.12 compare deux images MEB prises à la 9^{ème} semaine de compostage pour la formulation PLA/fructane et la formulation PLA/extrait de poireaux X.

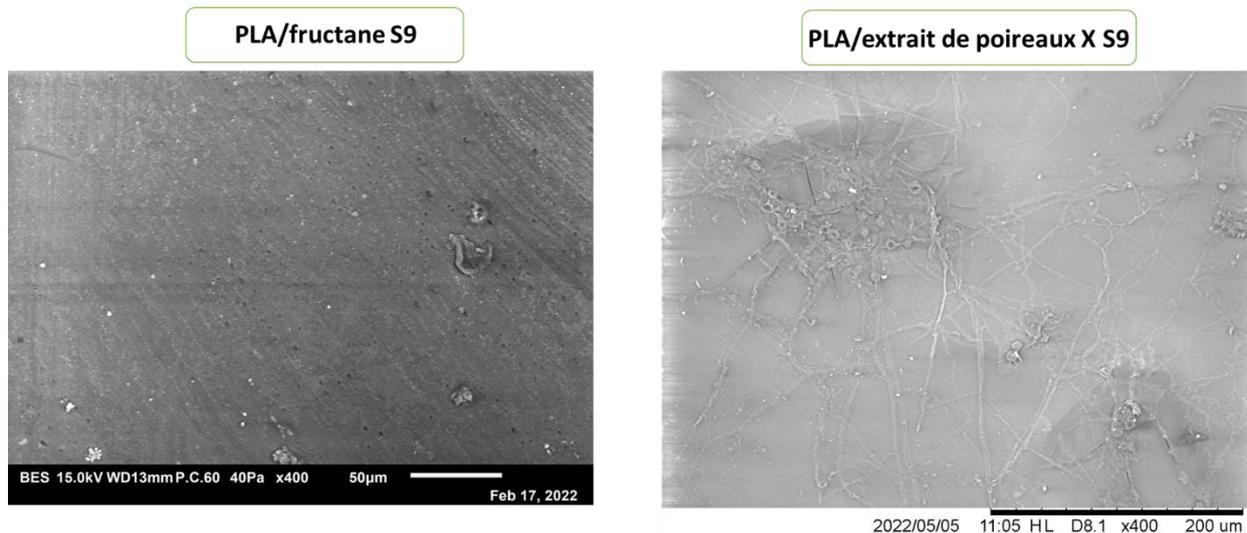


Figure 2.3.12. Suivi analytique semaine 9 par MEB formulations à base de fructane et d'extrait de poireaux X

Nous observons une colonisation des micro-organismes et la formation d'un réseau à la surface de la formulation contenant l'extrait de poireaux. Nous n'observons rien de comparable à la surface de la formulation PLA/fructane. Ceci confirme les résultats obtenus lors des analyses par infra-rouge.

L'accroche des micro-organismes semblent être facilitée sur la surface de la formulation contenant de l'extrait de poireaux.

CONCLUSION

Le dosage des fructanes a pu être réalisé sur l'ensemble des co-produits céréaliers et légumineux fournis par AGRIAL au laboratoire EVA. L'extraction des fructanes, à échelle laboratoire, a été réalisée à partir de co-produits de poireaux les plus riches en fructanes : produit « poireaux vinaigrette » et co-produit « racines ». L'extraction de fructanes à partir de co-produits de poireaux a par la suite pu être transposée à échelle pilote par le laboratoire EVA et la société ALGAÏA. Ces extraits de poireaux à forte teneur en fructanes ont permis l'élaboration par la société Natureplast de matériaux composites à base de PLA et de 5% d'extrait au sein des différentes formulations. Lors des essais de biodégradation réalisés par Unilasalle, il a été constaté que l'ajout de 5% de fructose au sein d'une formulation à base de PLA, n'a pas d'impact sur sa cinétique de minéralisation. Le suivi analytique n'a pas détecté de modification chimique du PLA due à une éventuelle biodégradation. En revanche, il a mis en évidence une meilleure colonisation de surface par les micro-organismes sur les formulations à base d'extraits de poireaux que sur celles contenant du fructose pur. Les essais de minéralisation à venir des formulations à base d'extraits de poireaux apporteront des éléments importants sur ce point. Afin de conclure sur l'impact des fructanes sur la biodégradabilité du PLA, il serait important de réaliser des essais sur des composites contenant des taux plus élevés de fructanes.