

Don Au
Pole 5
même aut. en
français

Bioconversion de l'amidon en acide L(+) lactique, synthèse chimique du poly(acide lactique) et dégradation par des microorganismes

A. TORRES DE DOMINGUEZ¹, S. ROUSSOS¹, M. VERT², S.M. LI², C. SOCCOL³

¹ Laboratoire de Biotechnologie. Centre ORSTOM. 911, av. Agropolis, B.P. 5045; 34032 Montpellier Cedex, France.

² Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels. URA 1465, CNRS, Faculté de Pharmacie, 15, av. C. Flahault, 34060 Montpellier, France.

³ Laboratório de Processos Biotecnológicos, Sector de Tecnologia, Depto. de Tecnologia Química, Universidade Federal do Parana, 81531-970 Curitiba-PR, Brasil.

RESUME

La transformation de produits céréaliers en matière première pour la fabrication de nouveaux matériaux plastiques pourrait contribuer à maintenir les activités de ce secteur agricole tout en offrant des solutions alternatives à l'utilisation des plastiques classiques.

En étudiant l'hydrolyse de l'amidon de manioc, un nouveau procédé de biotransformation du glucose en acide L(+)lactique par des champignons filamenteux a été mis au point. La production d'acide L(+) lactique se réalise avec des bons rendements et avec une pureté élevée (Soccol, 1992).

L'acide L-lactique a été polycondensé pour former des oligomères de poly(acide L-lactique), PLA100. Des oligomères racémiques (PLA50) ont été synthétisés parallèlement à partir d'acide DL-lactique. La dégradation de composés identifiés comme résidus d'hydrolyse chimique des polymères d'acide L-lactique de hautes masses (monomère, dimère et oligomères) (Li, 1989) a été étudiée en présence de deux microorganismes, un champignon filamenteux et une bactérie. Les résultats montrent que la vitesse de dégradation diminue quand la masse molaire augmente.

Par ailleurs, la dégradation des oligomères de PLA50 a été étudiée en cultures pures et mixtes de ces deux microorganismes. Il a été constaté que la vitesse de dégradation devient plus importante lorsqu'ils sont utilisés en co-culture.



INTRODUCTION

La prise de conscience actuelle face aux problèmes de pollution et la nécessité de protéger l'environnement ont focalisé l'attention sur le devenir après usage des matériaux polymères appelés plus communément "plastiques". Ces polymères, utilisés dans de nombreux secteurs de l'activité humaine, sont devenus indispensables. Le traitement des déchets qu'ils engendrent est devenu un problème de société tout autant que de protection de la vie.

Diverses solutions sont actuellement envisagées et mises en oeuvre: recyclage, incinération, pyrolyse, compostage, dégradation chimique et biodégradation (Vert, 1992). Apparemment, la seule qui pourrait régler ce problème de façon radicale serait l'utilisation de matériaux "biodégradables" pouvant être recyclés totalement par l'intermédiaire de la nature, solution choisie par elle-même pour les biopolymères et les matériaux vivants.

Nous présentons ici un exemple de recyclage par voie biologique de composés oligomères à base d'acide lactique en prenant comme point de départ l'amidon du manioc, étant entendu que la dégradation hydrolytique des polymères de haute masse conduit à des oligomères par simple hydrolyse chimique. Ceci pourrait contribuer à trouver une utilisation non alimentaire de l'amidon et permettre une réduction du volume de déchets plastiques disséminés dans la nature.

Biotransformation de l'amidon de manioc en acide L(+) lactique

Un criblage de champignons filamenteux du genre *Rhizopus* capables de se développer sur des grains de manioc a permis de sélectionner une souche de *Rhizopus arrhizus* (Soccol, 1992). Les conditions d'incubation de ce microorganisme ont été optimisées au moyen du dispositif de fermentation en milieu solide décrit par Raimbault (1980). Elles ont été établies comme suit: grains de manioc cru humidifiés à 50% avec un milieu minéral de base, inoculés à raison de 2×10^7 spores par gramme de substrat sec et incubés à 35°C pendant 48h. Il a été observé qu'à la fin de la culture il existe une accumulation de 18 grammes de glucose par 100 grammes de manioc sec. Cette transformation a été liée à une production des enzymes amylases.

Pour la production d'acide L(+) lactique, une souche de *Rhizopus oryzae* a été identifiée comme la plus performante (Soccol, 1992). En effet, en utilisant comme support solide la bagasse de canne à sucre à laquelle une solution nutritive à base de glucose est absorbée, ce microorganisme s'est révélé capable de transformer 180 g/l de glucose en 136 g/l d'acide lactique à raison de 1,43 g/l/h. Ceci avec une aération de 20 ml/min.

Polymérisation de l'acide lactique

L'acide lactique peut être polymérisé par deux méthodes chimiques (Li, 1989):

a) La polycondensation directe qui conduit à des polymères de faibles masses molaires (oligomères).

b
conduit
L
applica
L
aliphati

L
présent
permet
différen
copoly:
d'unité:
amorph

E

J
essenti:

:
polymè

t
zones :

c
grande

c
dégrad
positi:

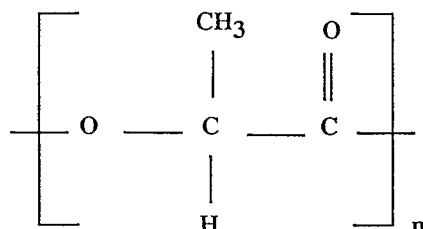
C

(Bioéc
(Cooki

b) L'ouverture du cycle dilactonique du lactide, dimère cyclique d'acide lactique qui conduit à des polyesters de masses molaires élevées.

Les matériaux polymères obtenus par la deuxième méthode peuvent trouver des applications diverses: chirurgie des os, libération prolongée de médicaments, emballages, etc...

Les polymères de l'acide lactique (PLA) appartiennent à la famille des polyesters aliphatiques. La structure de base est la suivante:



L'acide lactique existe sous deux formes énantiomériques L et D. Les unités de répétition présentes dans les chaînes de PLA peuvent être également de configurations L et/ou D. Ceci permet d'aboutir à des polymères ayant des propriétés mécaniques, physiques et biologiques différentes et d'adapter ces propriétés aux utilisations particulières par intermédiaire de la copolymérisation et de la stéréocopolymérisation. En effet, un polymère à base de 100% d'unités L (PLA100) est semicristallin alors que celui à base d'un mélange racémique est amorphe (Li, 1989).

Dégradation hydrolytique des polymères d'acide lactique

Jusqu'à présent, la dégradation des polymères d'acide lactique est considérée comme essentiellement hydrolytique.

a) BILAN hydrophyllicité / hydrophobicité : l'hydrolyse est influencée par la capacité au polymère à absorber l'eau.

b) Degré de cristallinité: il a été observé que la dégradation est plus importante dans les zones amorphes que dans les cristallines.

c) Masse molaire: la dégradation des petites molécules est favorisée par rapport aux grandes.

d) Structure chimique: les facteurs qui déterminent la capacité de ces polymères à être dégradés sont: les types de liaisons des chaînes polymères, les groupements fonctionnels, leur position, leur réactivité, les groupes terminaux, etc...

Certains de ces facteurs sont également impliqués dans la dégradation enzymatique (Biodégradation) des polyesters sensibles aux enzymes tels que PCL, PHB, PHB/HV... (Cooke, 1990).

Une étude de dégradation en milieux aqueux de plaques massives de PLA a mis en évidence un phénomène d'autocatalyse interne (Li *et al*, 1990). Ce phénomène répond aux caractéristiques chimiques mentionnées ci-dessus: après absorption d'eau, les chaînes macromoléculaires des PLA sont susceptibles de se couper au niveau des liaisons ester avec une réduction de la masse molaire.

L'accumulation des groupes -COOH terminaux est plus importante au centre de la plaque étant donné la difficulté des chaînes à diffuser vers le milieu extérieur. Ceci déclenche un processus d'autocatalyse ayant comme résultat des oligomères qui peuvent diffuser lorsque leurs masses molaires sont suffisamment faibles pour qu'ils deviennent solubles dans l'eau. Il en résulte une coquille vide (PLA racémiques) ou remplie d'oligomères cristallisés (PLA100) qui se dégradent beaucoup plus lentement.

En fin de compte, l'hydrolyse des PLA de hautes masses conduit à des oligomères qui ensuite peuvent être dégradés jusqu'à l'unité monomère, l'acide lactique.

DEGRADATION DES RESIDUS DE L'HYDROLYSE CHIMIQUE DU PLA PAR DES MICROORGANISMES

Comme l'acide lactique est le produit ultime de la dégradation hydrolytique des PLA, il a été utilisé pour sélectionner des souches de champignons filamenteux capables de l'utiliser comme unique source de carbone et d'énergie (Torres *et al*, 1993). De ce criblage, une souche de *Fusarium moniliforme* a été retenue. Par ailleurs, la bactérie *Pseudomonas putida* a été choisie en prenant compte de sa puissante capacité métabolique. Ces deux microorganismes ont été cultivés premièrement dans des milieux synthétiques respectivement à base du monomère, à base du dimère et à base des oligomères d'acide L - lactique. Parallèlement, une culture mixte dans un milieu à base des oligomères de PLA50 a été comparée avec les cultures pures de chaque microorganisme.

Matériels et Méthodes

Substrats

Pour le monomère, une solution commerciale à 88% (Carlo Erba 304652) d'acide L-lactique a été utilisée. Le dimère cyclique, le L-lactide, a été fourni par Boehringer. Il a été récrystallisé dans l'acétone avant utilisation afin d'éliminer les traces d'acide lactique éventuellement présent.

Les oligomères de PLA50 ont été obtenus après polycondensation d'une solution racémique d'acide lactique (Sigma L-1250) à 85%. L'analyse par GPC donne une masse molaire moyenne de 2000 daltons et une polymolécularité de 1,3 (phase mobile: dioxane à 1 ml/min; détection par réfractomètre; 20 111 d'injection d'une solution à 1% dans du dioxane; étalonnage par des solutions standards de polystyrène). Le produit obtenu présente une forme

compacte transparente à température ambiante et qui devient visqueux par effet de la chaleur. Pour faciliter leur manipulation, les oligomères ont été chauffés avant utilisation. Afin de réduire au maximum la dégradation par ce pré-traitement, nous avons reparti au préalable les oligomères dans plusieurs récipients de façon à ne pas réchauffer le même lot de produit.

Les oligomères de PLA100 (masse molaire 1500; polymolécularité de 1,4 évaluée de la même façon que pour les oligomères de PLA50) ont été également obtenus par polycondensation d'une solution d'acide L-lactique. Il s'est avéré nécessaire d'éliminer les fractions de faibles masses molaires solubles dans le milieu de culture d'abord par dissolution dans l'acétone suivie d'une précipitation par le milieu lui-même. Le précipité obtenu a été séché sous vide, à température ambiante est une poudre blanche facilement manipulable. Elle a été broyée et tamisée avant usage.

Ces produits ont été conservés à l'abri de l'humidité et de la chaleur.

Microorganismes

La souche de *Fusarium moniliforme* utilisée provient de la collection Orstom, Montpellier et celle de *Pseudomonas putida* de la Collection Tchèque de Microorganismes (CCM).

Milieu de culture

La composition du milieu utilisé est la suivante (g/l): 0,8 urée; 1,27 NaH_2PO_4 ; 1,63 K_2HPO_4 , 0,52 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$; 0,5 glucose; 0,3 KCl; 0,3 MgSO_4 . 1% de méthanol a été additionné au milieu afin de favoriser la solubilité des oligomères. Le pH est de 6,6 avant autoclavage. Cette valeur unique a été considérée comme un compromis acceptable pour les croissances de la bactérie et du champignon. Après stérilisation, une solution de vitamines et une solution d'oligoéléments dont les compositions ont été établies par Roussos (1982), ont été ajoutées à raison de 1 ml /l. Les substrats à dégrader (acide L-lactique, L-lactide, oligomères de PLA100 et de PLA50) ont été additionnés à une concentration de 10 g/l. Dans les cas du dimère et des oligomères, l'ajout dans le milieu a été effectué après autoclavage, afin d'éviter toute dégradation liée à la sensibilité de ces composés à l'hydrolyse.

Conditions de culture

Les cultures ont été réalisées sous agitation à 150 tpm et à une température de 30°C, dans des erlenmeyers de 250 ml. Le taux d'inoculation a été fixé à 2.107 spores de *F. moniliforme* ou cellules de *P. putida* par gramme de substrat à dégrader. Pour la culture mixte, les deux microorganismes ont été inoculés au même taux.

Evaluation de la disparition des différents substrats

Dans le milieu à base du monomère et celui à base du dimère, la disparition au cours du temps de chacun a été évaluée directement à partir du milieu de culture après simple filtration. Dans le cas des oligomères, l'acide lactique correspondant obtenu par hydrolyse alcaline (ajout

de PLA a mis en
nomène répond aux
d'eau, les chaînes
aisons ester avec une

au centre de la plaque
: Ceci déclenche un
vent diffuser lorsque
solubles dans l'eau. Il
cristallisés (PLA100)

à des oligomères qui

SE CHIMIQUE

olytique des PLA, il a
capables de l'utiliser
e criblage, une souche
omonas putida a été
microorganismes ont
base du monomère, à
ent, une culture mixte
les cultures pures de

ba 304652) d'acide L-
ar Boehringer. Il a été
aces d'acide lactique

isation d'une solution
IPC donne une masse
se mobile: dioxane à 1
à 1% dans du dioxane;
enu présente une forme

de NaOH 5 N et réchauffement jusqu'à ébullition) de la totalité du contenu de l'erlenmeyer a été analysé pour différents temps de culture. Pour le dosage d'acide lactique et du dimère, une colonne d'exclusion ionique (Shodex Ionpak KC-811) a été utilisée avec les conditions suivantes: acide phosphorique 0,1 % comme phase mobile à 0,5 ml / min, une détection à 210 nm et une injection de 20 μ l. L'étalonnage d'acide lactique a été réalisé avec des solutions standards d'acide L(+) lactique à 98% de pureté (Sigma) et celui du dimère avec le L-lactide décrit ci-dessus.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les figures 1 et 2 montrent le comportement de *F. moniliforme* et de *P. putida* respectivement, vis-à-vis du monomère, du dimère et des oligomères d'acide L-lactique. Tout d'abord on observe que le monomère est consommé rapidement par les deux souches. Le dimère est dégradé plus lentement avec des vitesses dépendantes du microorganisme. Le pourcentage initial du dimère n'est pas de 100 étant donné que le cycle lactide n'est pas totalement ouvert en acide lactoyl-lactique au temps 0 d'inoculation. Enfin, les oligomères ne sont qu'à 50% dégradés au bout de 25 jours de culture. Il semble que le dimère et les oligomères doivent être transformés en monomère pour être assimilés.

Il est difficile de déterminer si ces microorganismes sont eux-mêmes capables de couper les chaînes polymères ou s'ils provoquent simplement un déplacement de l'équilibre d'hydrolyse chimique vers la libération du monomère consommé continuellement.

Les cultures en présence des oligomères racémiques PLA50 révèlent que la dégradation est accélérée lorsque les deux microorganismes sont présents simultanément (fig. 3). Ceci pourrait s'expliquer par un phénomène de synergie entre eux.

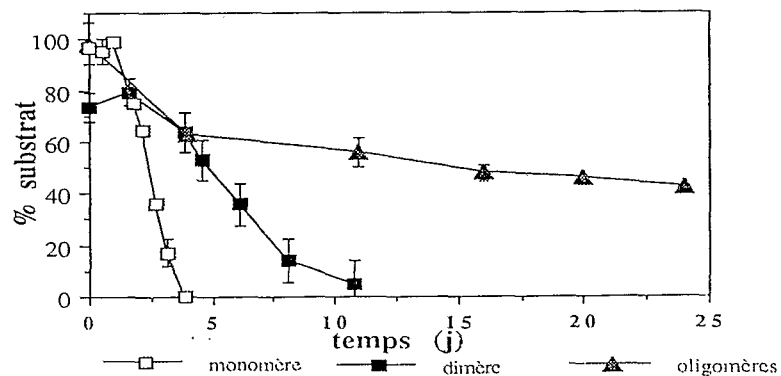


Figure 1 : dégradation du monomère, dimère et oligomères de l'acide L-lactique par *Fusarium moniliforme* cultivé en milieu synthétique agité à 30°C

ra été
e, une
ditions
à 210
lutions
lactide

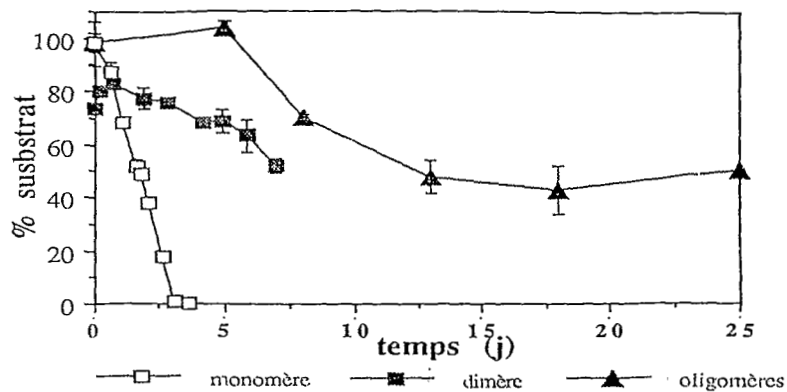


Figure 2 : dégradation du monomère, dimère et oligomères de l'acide L-lactique par *Pseudomonas putida* cultivée en milieu liquide agité à 30°C

putida
ie. Tout
hes. Le
me. Le
est pas
ères ne
e et les

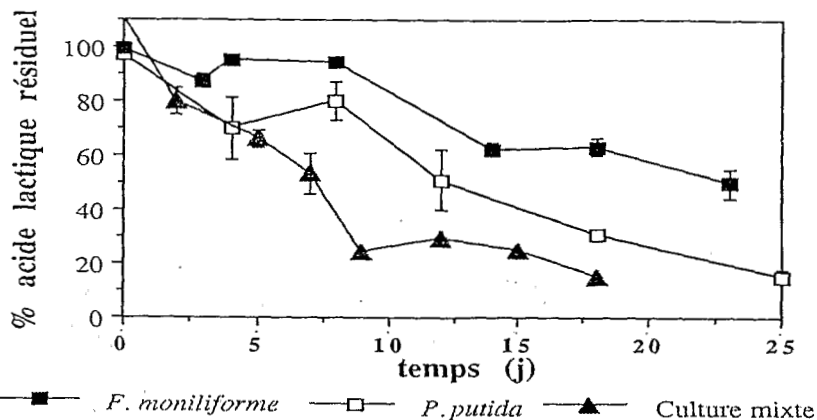


Figure 3 : dégradation comparée des oligomères racémiques d'acide lactique, PLA50, par *F. moniliforme* et *P. putida* et par la culture mixte des deux.

Nous avons également observé que, dans le cas des oligomères de PLA50, *P. putida* provoque une homogénéisation du milieu, alors que dans les cultures de *F. moniliforme* les oligomères restent au fond de l'erenmeyer sous forme d'un amas blanc. Il serait possible que la bactérie soit capable de synthétiser un composé émulsifiant qui permette cette homogénéisation.

pres
le par

CONCLUSION

La mise au point des techniques analytiques pour le suivi de la dégradation et/ou de l'assimilation des monomère, dimère et oligomères d'acide L-lactique a permis de mettre en évidence le comportement des microorganismes sélectionnés, cultivés en milieu liquide agité. Il a été constaté que ces microorganismes sont capables d'assimiler ces composés comme source de carbone. L'acide lactique est consommé rapidement tandis que la vitesse de disparition du dimère et des oligomères est plus faible. La dégradation des oligomères racémiques est accélérée en culture mixte des microorganismes utilisés.

Cependant, il est difficile de distinguer si l'assimilation des petites chaînes est seulement due à une action microbiologique ou si elle est liée en partie à l'hydrolyse chimique. La dégradation des PLA de hautes masses par des microorganismes sera étudiée ultérieurement, ainsi que la possible existence d'enzymes.

Le présent travail montre qu'il est possible d'obtenir des matériaux polymères de synthèse à partir de composés répandus dans la nature, tels que l'acide lactique, qui sont initialement dégradés chimiquement et/ou biologiquement pour donner comme sous-produits des petites chaînes polymères ou des petites molécules assimilables par des microorganismes, assurant ainsi un recyclage biologique absolu.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COOKE J.F., 1990. Biodegradability of polymers and fibers - a review of the literature. *J. of Polymer Eng.* 9(3), 171-211.
- LI S.M. 1989. *Etude de la dégradation des poly(alpha-hydroxy acides) aliphatiques dérivés des acides lactique et glycolique en milieux aqueux modelés.* Diplôme de Doctorat, Université de Rouen, 183 p.
- LI S.M., GARREAU H., VERT M. 1990. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(alpha hydroxy acids) in aqueous media. Part 1: Poly (DL-lactic acid). *J. of Mat. Sci.: Materials in Medicine*, 1, 123-130.
- RAIMBAULT M., ALAZARD D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation, *European J. Appl. Microbiol.*, 9, 199-209.
- ROUSSOS S. 1982. Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits. *Cahiers ORSTOM, série Biol.* 45, 25-34.
- SOCCOL C.R., 1992. *Physiologie et métabolisme de Rhizopus en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique.* Diplôme de Doctorat, Université Technologique de Compiègne, 210 p.
- TORRES de D. A., ROUSSOS S, VERT M. 1993. Biodégradabilité de nouveaux matériaux plastiques, polymères de l'acide lactique: criblage de souches. *Colloque Le Microorganisme, réactif chimique, bioconversion et biodégradation*, Marseille.

VERT M. 1990. Degradation of polymeric biomaterials with respect to temporary therapeutic applications: tricks and treats. Dans S.A. Barenberg et al, eds: *Degradable materials*, Eds. CRC Press, Boca Raton, p 11.

VERT M., GUERIN P., 1992. Des biosystèmes aux matériaux polymères: une utopie? *Biofutur*, Juin, 52-57.

VERT M., TORRES de D. A., LI S.M., ROUSSOS S., GARREAU H., 1993. The complexity of the biodegradation of poly (alpha-hydroxy acid) - type Aliphatic Polyesters. *Third International Scientific Workshop on Biodegradable Plastics and Polymers*, Osaka, Japan, sous presse

de la dégradation et/ou de
ue a permis de mettre en
en milieu liquide agité. Il
composés comme source
vitesse de disparition du
s racémiques est accélérée

lites chaînes est seulement
l'hydrolyse chimique. La
ra étudiée ultérieurement,

aux polymères de synthèse
ique, qui sont initialement
e sous-produits des petites
microorganismes, assurant

view of the litterature. *J. of*

les J aliphatiques dérivés des
e de Doctorat, Université de

relationships in the case of the
aqueous media. Part 1: Poly
30.

udy fungal growth in solid

; caractères morphologiques,
thiers ORSTOM, série Biol.

1 culture solide et submergée
'acide L(+) lactique. Diplôme

ilité de nouveaux matériaux
Colloque Le Microorganisme,

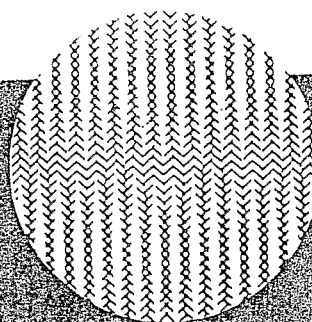
71

Valorisations non-alimentaires des grandes productions agricoles

Nantes (France)
18-19 mai 1994

J. GUEGUEN
Editeur

LES COLLOQUES



INRA
EDITIONS