

FASCICULE DE BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt : 1201800089

22 Date de dépôt : 09/04/2018

30 Priorité(s):

24 Délivré le : 18/01/2019

45 Publié le : 31.01.2019

73 Titulaire(s) :

Conseil du Coton et de l'Anacarde,
B.P. 1093, YAMOUSSOUKRO (CI)

Institut National Polytechnique
Félix Houphouët-Boigny,
B.P. 1093, YAMOUSSOUKRO (CI)

72 Inventeur(s) :

Song Yan (CI)
Rajwinder Kaur (CI)
Rajeshwar Dayal Tyagi (CI)
Allali Patrick Drogui (CI)
Yao kouassi Benjamin (CI)
Adouby Kopoin (CI)
Soro Doudjo (CI)
Sissoko Amara (CI)
Soro Yaya (CI)

74 Mandataire:

54 Titre : Procédé de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir du jus de pomme de cajou.

57 Abrégé :

La présente invention décrit la biosynthèse microbienne des bioplastiques (PHA) ou le procédé de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) par des microorganismes producteurs de PHA (par ex. *Cupriavidus necator*) en utilisant le jus de pomme de noix de cajou comme substrat de carbone renouvelable. Ladite invention a identifié et utilisé le substrat de carbone enrichi en éléments nutritifs pour une production de PHA de haute pureté.

La récupération simultanée des protéines (à partir du surnageant) et son utilisation potentielle pour l'alimentation animale rend le processus de production de PHA plus économique.

Ce processus implique la détermination d'une concentration appropriée de sucre réducteur pour la croissance microbienne. L'invention décrit également une stratégie d'alimentation discontinue par cuvées en utilisant le jus de pomme de cajou comme substrat de carbone et une variation des minéraux (azote et phosphore) pour améliorer la concentration de biomasse et le rendement en PHA.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Procédé de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir du jus de pomme de cajou

La présente invention décrit la biosynthèse microbienne des bioplastiques (PHA) ou le procédé de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) par des microorganismes producteurs de PHA (par ex. 5 *Cupriavidus necator*) en utilisant le jus de pomme de noix de cajou comme substrat de carbone renouvelable. Ladite invention a identifié et utilisé le substrat de carbone enrichi en éléments nutritifs pour une production de PHA de haute pureté.

La prolifération des plastiques issus de la pétrochimie est une préoccupation majeure en raison des impacts négatifs environnementaux et sociaux. L'élimination inappropriée des plastiques et l'épuisement 10 rapide des ressources naturelles dans la production sont les principaux facteurs qui conduisent à des investigations pour trouver des alternatives durables aux plastiques à base de pétrole (Muhammadi et al., 2015).

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont considérés comme étant des alternatives compatibles pour remplacer les plastiques conventionnels à base de pétrole et ce, en raison de leur biodégradabilité, de 15 leur biocompatibilité et de leur nature non toxique. Des fonctionnalités supplémentaires comme la recyclabilité et la nature thermoplastique leur confèrent de nombreuses applications dans le domaine de l'industrie de l'emballage, de la médecine et de l'industrie agroalimentaire (Ivanov et al., 2015). Les PHA appartiennent à la famille des bio-polyesters qui sont produits et accumulés par une variété de microorganismes en tant que source de carbone et d'énergie en présence d'un excès de carbone et de 20 limitation de l'azote ou du phosphore.

Le Polyhydroxybutyrate (PHB) a été identifié pour la première fois par Maurice Lemoige, dans *Bacillus megaterium* en 1926. Les PHB sont la forme de PHA la plus largement étudiée et peuvent accumuler jusqu'à 80% du poids sec de la cellule. Outre PHB, des copolymères contenant du 3-hydroxyvalérate (3- 25 HV) et du 3-hydroxyhexanoate (3-HHx) ont également été identifiés en 1974. Aujourd'hui, environ 150 constituants monomères différents de PHA et plus de 300 espèces microbiennes, principalement des bactéries ont été identifiées comme étant capable d'accumuler des PHA (Anjum et al., 2016).

La structure chimique des PHA est présentée sur la figure 1 qui contient des unités répétitives de 100 - 30 000. Dans le cas de PHB, $R = CH_3$ et $x = 1$, alors que dans le cas de PHV, $R = C_2H_5$ et $x = 1$. Sur la

base du nombre d'atomes de carbone, le PHA peut avoir une longueur de chaîne courte (3 à 5 atomes de carbone) ou une longueur de chaîne moyenne (6 à 14 atomes de carbone). La différence est due à la spécificité du substrat de la PHA synthase, dans le cas d'*Alcaligenes eutropus*, la PHA synthase peut polymériser les 3-hydroxyalcanes (3-HA) constitués de 3 à 5 atomes de carbone, tandis que la PHA synthase de *Pseudomonas oleovorans* peut polymériser 3-HA de 6 à 14 atomes de carbone (Pena et al., 2014).

La voie biochimique de la production de PHA a été bien étudiée et consiste principalement en des réactions en trois étapes dans le cas de bactéries notoires *Cupriavidus necator* (anciennement *Alcaligenes eutropus*, *Ralstonia eutropha*) (Kessler et al., 2001). Dans la première phase, deux molécules d'acétoacétyl-CoA subissent une condensation pour former de l'acétoacétyl-CoA à l'aide de l'enzyme 3-kéthothiolase. La deuxième étape catalysée par l'enzyme acétoacétyl-CoA réductase dépendant de NADPH, qui agit sur l'acétoacétyl-CoA et la réduit pour former la 3-hydroxybutyryl-CoA. L'étape finale catalysée par l'enzyme PHA synthase, qui catalyse la polymérisation du 3-hydroxybutyryl-CoA pour former Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) (Fig.2)

L'utilisation généralisée de PHA est entravée en raison du coût de production élevé par rapport aux plastiques classiques. Le brevet européen n° 0,046,344 décrit la production de PHB en utilisant du glucose comme source de carbone pour *A.eutrophus NCIB 11599*. Les substrats les plus couramment utilisés pour la production de bioplastique sont des sources de carbone pure telles que le glucose, le fructose, le lactose et les huiles végétales. Le coût de ces sources de carbone pur est l'un des facteurs les plus importants qui rend peu économique la production de PHA et représente environ 50 à 60% de la dépense totale pour la production de PHA (Volodina et al., 2016). Par conséquent, une approche alternative est d'utiliser des substrats de carbone renouvelables, économiquement réalisables ou à faible coût et facilement disponibles pour la croissance microbienne et la production efficace de PHA.

Les résidus agricoles et les déchets tels que la pomme de cajou sont des substrats à faible coût et sont appropriés pour la culture microbienne, en tant que source de carbone, d'azote et de minéraux. Les pommes de cajou sont considérées comme des déchets de l'agriculture et son jus nutritif peut être approprié comme substrat peu coûteux en raison de la présence de 10 à 12% de teneur en glucose, ainsi que du fructose, du saccharose, des vitamines et des acides aminés. La plupart du temps, les pommes de noix de cajou pourrissent sur les champs après le retrait de la noix. Bien que les pommes de cajou

puissent être utilisées pour la production de jus, de glaces et autres produits alimentaires, l'utilisation de pommes de cajou comme fruits est très limitée en raison de la présence de composés astringents tels que les polyphénols et les tanins (0,35%) (Fontes et al., 2013). De plus, il existe une présence de couche cireuse autour des pommes de cajou qui les rend peu commode à la consommation humaine.

5 Par conséquent, la sous-utilisation des pommes de cajou, la présence d'une concentration élevée en sucres réducteurs, leur grande disponibilité et leur faible coût en font un substrat potentiel et économique pour la production bioplastique.

L'Afrique de l'Ouest, l'Inde, le Vietnam, l'Afrique de l'Est et le Brésil sont les principaux producteurs de noix de cajou. La production mondiale de noix de cajou en 2016 était de 738 861 tonnes métriques, ce
10 qui conduit à 7 millions de tonnes de pommes de cajou parce que celle-ci représente neuf à dix fois le poids des noix. En raison de sa disponibilité abondante et de son faible coût, le jus de pomme de cajou a été bien étudié comme substrat pour la production fermentative de bio-tensioactifs, de bioéthanol, d'acides organiques et d'enzymes (Prommajak et al., 2014, Betiku et al., 2016). Cependant, aucune invention ou littérature n'a été signalée en ce concerne son utilisation comme substrat de carbone pour la
15 production de bioplastiques.

L'invention a pour but de produire du bioplastique à partir de substrat renouvelable à faible coût, riche en sucre et approprié pour la culture microbienne.

Conformément à l'invention, ce but est atteint avec le processus de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) ou bioplastique avec une pureté élevée et une forte concentration de biomasse, à partir du jus de
20 pomme de cajou. La production de PHA de haute pureté permet d'éviter l'utilisation de produits chimiques coûteux requis pour une extraction et une purification supplémentaires de PHA.

Ce processus implique la détermination d'une concentration appropriée de sucre réducteur pour la croissance microbienne. Il décrit à cet effet, une stratégie d'alimentation discontinue par cuvées en utilisant le jus de pomme de cajou comme substrat de carbone et une variation des minéraux (azote et
25 phosphore) pour améliorer la concentration de biomasse et le rendement en PHA. Les microorganismes producteurs de PHA (*Cupriavidus necator*) sont inoculés dans les milieux de culture de jus de pomme de cajou pour produire une forte concentration de PHA. Par la suite, pour rendre le processus de production de PHA (bioplastiques) plus économique, les protéines extracellulaires et intracellulaires libérées par la bactérie sont récupérées à partir du surnageant pour être utilisées comme protéines animales.

Les détails du procédé de production de bioplastiques et de récupération de protéines comprennent les étapes suivantes:

- 5 a) Préparation des milieux de production de PHA utilisant du jus de pomme de cajou comme substrat de carbone et inoculation de PHH produisant des cellules microbiennes dans les milieux de production
- b) Détermination de la concentration appropriée en sucres réducteurs pour la concentration maximale de biomasse et la production de PHA.
- c) Utilisation d'une concentration appropriée en sucres réducteurs pour la fermentation discontinue alimentée afin d'augmenter encore la concentration de biomasse et la teneur en PHA.
- 10 d) Traitement thermique du bouillon fermenté après la production d'PHA et récupération de 77% des protéines à partir du surnageant après extraction par PHA.

Le procédé nécessite les concentrations suivantes :

- le sucres réducteurs dans le jus de pomme de cajou varie de 5 à 35 g/L,
- 15 ➤ le chlorure d'ammonium dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,20 et 1 g/L,
- l'Hydrogène phosphate disodique décahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,5 et 6 g/L,
- le dihydrogénophosphate de potassium dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,20 et 2,40 g/L,
- 20 ➤ le sulfate de magnésium heptahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,04 et 0,5 g/L,
- le chlorure ferrique heptahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,8 et 10 mg/L,
- 25 ➤ le chlorure de calcium heptahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou variait entre 0,8 et 10 mg/L.

La fermentation discontinue appliquée pendant un temps de 144 h, alimentée à l'aide de milieux de jus de pomme de cajou maintenue avec une concentration réductrice de sucre de 20 g/L et une

concentration en azote de 0,20 g/L donne un rendement PHA maximal de 0,88 g de substrat PHA/g consommé.

C'est le lieu de préciser que le jus de pomme de cajou est sous utilisé. Il est principalement laissé dans les plantations après la récolte de la noix, ce qui a un impact négatif sur l'environnement.

5 Le processus de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) ou bioplastique conforme à l'invention présente plusieurs avantages, notamment :

- la production de plastiques biodégradables permettant de résoudre le problème de pollution des déchets plastiques issus des hydrocarbures ;
- la réduction de l'impact négatif causé à l'environnement en raison de l'abandon des pommes de
- 10 cajou dans les champs ;
- la récupération de protéines à partir du surnageant de la liqueur fermentée (ou bouillon fermenté) en vue de leur utilisation comme protéine animale ou à d'autres fins.

L'invention est décrite ci-après à l'aide d'exemples avec référence aux formules et diagrammes joints à cet effet, pour lesquels :

15 La figure 1 représente la structure de la polyhydroxyalcanoates (PHA) ou bioplastique ;

La figure 2 représente le diagramme de la biosynthèse de PHA ;

La figure 3 représente le diagramme schématique du système de production de PHA provenant du jus de pomme de cajou ;

La figure 1 est la méthode d'alimentation: a) une impulsion, b) alimentation à deux impulsions ;

20 La figure 2 représente la stratégie d'alimentation par étapes : a) Haute concentration de minéraux et d'azote, b) Faible concentration de minéraux et d'azote ;

La figure 6 est le diagramme schématique pour la récupération des protéines du surnageant.

Les caractéristiques physicochimiques du jus de pomme de cajou concentré (le jus de pomme de cajou a été concentré par évaporation) sont représentées dans le tableau 1. La présence de sucres

25 monosaccharides, c'est-à-dire le glucose et le fructose dans le jus de pomme de cajou, est avantageuse car elle permet une assimilation facile et rapide par les cellules bactériennes productrice de PHA, améliorant ainsi le rendement en PHA. Dans la présente invention, bien qu'il y ait présence de potassium

et de phosphore dans le jus de pomme de cajou, par rapport au magnésium et à l'azote, la présence de fortes concentrations de phosphore et de potassium est nécessaire pour la croissance de microorganismes producteurs de PHA tels que *C.necator*. Par conséquent, sur la base de la caractérisation physico-chimique du jus de pomme de cajou, il y avait une forte concentration de glucose et de fructose, tandis que les minéraux et l'azote peuvent être complétés pour améliorer la croissance du microorganisme et de la production d'PHA (tableau 1).

Tableau 1. Caractérisation physicochimique du jus de pomme de cajou.

Composition	Concentration
pH	4.4
Carbone Organique Total (g/L)	205
Sucre réducteur (g/L)	456
Glucose (g/L)	230
Fructose (g/L)	226
Protéine (mg/L)	2100
Aluminium (mg/L)	3.96
Bore (mg/L)	1.28
Calcium (mg/L)	62.40
Chrome (mg/L)	0.12
Cuivre (mg/L)	1.344
Fer (mg/L)	8.88
Plomb (mg/L)	0.48

Composition	Concentration
Magnésium (mg/L)	531.6
Manganèse (mg/L)	5.1
Nickel (mg/L)	0.828
Phosphore (mg/L)	648
Potassium (mg/L)	740
Silice (mg/L)	12.6
Sodium (mg/L)	246
Strontium	0.6
Sulfure (mg/L)	192
Titane	0.06
Vanadium	0.072
Zinc	13.2

La production de PHA utilisant un substrat de carbone nouveau et renouvelable, le jus de pomme de cajou se fait en incubant l'une des souches productrices de PHA, qui est capable d'utiliser le jus de

pomme de cajou comme substrat de carbone renouvelable. Le microorganisme utilisé dans la présente invention est l'une des meilleures bactéries accumulatrice de PHA, *Cupriavidus necator*. Cependant, le procédé peut être appliqué à d'autres microorganismes producteurs de PHA. Pour que le processus de production de PHA réussisse, deux pré-inocula sont nécessaires, mais le nombre de pré-inoculum peut varier selon l'échelle expérimentale. Le premier pré-inoculum doit être préparé par propagation de bactéries productrices de PHA (par ex: *C. necator*) en milieu minéral contenant (par litre d'eau distillée) 20 g de glucose, 6,0 g d'hydrogénophosphate disodique dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2,4g de phosphate de dihydrogène- phosphate (KH_2PO_4), 1,0 g de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), 0,50 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorure de fer (III) hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et hexahydrate de chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Le premier pré-inoculum est maintenu à une température spécifique, une agitation et pour une période de temps spécifique, selon les conditions optimisées pour le microorganisme. La souche productrice de PHA (*C.necator*) est maintenue à une agitation de 150 tours par minute (tr/min) à une température de 30° C pendant une période de 24 heures, afin d'obtenir les cellules en croissance active. Après cette période, 10% de volume de pré-inoculum est transféré dans un deuxième pré-inoculum. Le second pré-inoculum est préparé en utilisant le même substrat de carbone, qui doit être utilisé dans les milieux de production, c'est-à-dire le jus de pomme de cajou. Le second pré-inoculum est généralement préparé à adapter les cellules microbiennes dans le nouveau substrat et à diminuer la période de latence dans les milieux de production finaux. Avec le substrat de carbone, d'autres minéraux et de l'azote sont également ajoutés afin d'obtenir une bonne croissance microbienne et une production de PHA. De préférence, le second pré-inoculum est également maintenu à 150 tr/min à 30° C pendant 24 h. Après 24h, 10% de volume du second pré-inoculum sont ajoutés aux milieux de production PHA finaux, qui ont généralement la même composition que le second pré-inoculum.

La concentration appropriée de sucres réducteurs est nécessaire pour obtenir la concentration maximale de biomasse ou la croissance des cellules microbiennes et la production de PHA. La faible concentration de substrat de carbone peut limiter la croissance microbienne, tandis qu'une concentration élevée de sucres réducteurs ou de carbone peut provoquer l'inhibition du substrat. Dans la présente invention, la concentration en sucres réducteurs a varié entre 5 et 35 g.L-1 et une concentration appropriée de sucres réducteurs a été utilisée pour un procédé ultérieur.

Le procédé de production de PHA dans la présente invention peut être réalisé par traitement discontinu ou semi continu. Le processus de fermentation alimentation semi discontinue assure la régulation de l'alimentation nutritive appropriée dans le fermenteur pour éviter à la fois la limitation et l'inhibition du substrat. Dans la présente invention, différentes stratégies d'alimentation dosée telles qu'une impulsion, deux impulsions et une alimentation par étapes du jus de pomme de cajou ont été appliquées afin d'obtenir une concentration élevée en biomasse et une production de PHA. L'alimentation pendant le processus était basée sur la consommation de sucres réducteurs ou de substrat de carbone. La température du fermenteur a été maintenue à 30° C en faisant circuler de l'eau à travers la double enveloppe du fermenteur, tandis que le pH 6,8 a été maintenu en utilisant de l'acide sulfurique 4N et du NaOH 4N. L'oxygène dissous devrait normalement être maintenu à environ 30% tout au long du processus de fermentation.

La présente invention concerne également l'utilisation de différentes concentrations de minéraux et d'azote dans la solution d'alimentation pendant le processus de fermentation discontinue alimentée, afin de vérifier l'effet sur la croissance microbienne et la production de PHA. L'excès de source d'azote peut modifier la voie métabolique de la cellule microbienne vers la production de biomasse au lieu de la production de PHA.

La présente invention réfère également au traitement thermique des cellules microbiennes à 95-121 ° C pendant 30 minutes afin de tuer les cellules microbiennes de sorte qu'elles ne sont pas capables de consommer le PHA accumulé après la fin de la fermentation. Le traitement thermique contribue également à perturber la structure cellulaire en libérant le PHA au milieu extracellulaire.

La présente invention réfère également à l'utilisation d'un surnageant pour récupérer des protéines après extraction de PHA à partir d'un bouillon fermenté traité thermiquement. Le surnageant est à la fois composé de protéines extracellulaires et intracellulaires libérées à l'extérieur des cellules microbiennes pendant le traitement thermique. Les protéines peuvent être extraites en utilisant un traitement thermique et encore par addition de carboxy méthylcellulose pour accélérer le processus de leur précipitation.

Les exemples suivants servent à illustrer l'invention mais sans en limiter la portée

Exemple 1 Détermination de la concentration appropriée en sucres réducteurs

Le premier pré-inoculum a été préparé en inoculant des cellules de microorganismes producteurs de PHA (pour ex: *C.necator*), des plaques de gélose dans le bouillon de milieu minéral contenant (par litre d'eau distillée) 20 g de glucose, 6,0 g d'hydrogène disodique Phosphate dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 2,4 g de phosphate de dihydrogénate de potassium (KH_2PO_4), 1,0 g de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), 0,50 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorure de fer (III) hexahydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et du chlorure de calcium hexahydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a été stérilisée par filtration à travers un filtre de polyéthersulfone (PES) de 0,2 μm . Le glucose, le NH_4Cl et le $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ont été autoclavés séparément à 121 ° C pendant 15 min. Ces solutions ont été mélangées de manière aseptique après refroidissement. Le pH moyen a été maintenu à 6,8 et le pré-inoculum a été maintenu sous l'agitation de 150 tr/min pendant 24h à 30 ° C.

Après ce temps, 10% du pré-inoculum a été transféré dans des milieux de jus de pomme de cajou (deuxième pré-inoculum) contenant une concentration variable de sucres réducteurs (5-40 g.L⁻¹, même que les milieux de production). Une autre composition minérale était la même que le premier milieu pré-inoculum. Le second pré-inoculum a également été maintenu à 30 ° C pendant 24h et par la suite, 10% de volume du second pré-inoculum ont été transférés dans 200 ml de milieu de production dans une fiole Erlenmeyer 1L. La composition des milieux de production était la même que le second milieu pré-inoculum et la concentration en sucres réducteurs a varié de 5 à 40 g.L⁻¹. L'incubation des supports de production pour la production de PHA a été effectuée pendant 72 heures à 30 ° C et 150 tr / min. Les échantillons provenant de la fermentation bactérienne ont été prélevés après 12h pour mesurer la concentration de biomasse (g/L), la concentration de sucres réducteurs (g/L) et la teneur en PHA (% m/m).

La concentration de sucre réducteur dans le jus de pomme de noix de cajou ainsi que lors de la fermentation a été analysée en utilisant la méthode DNS (3, 5-dinitrosalicylique) (Miller 1959). La concentration de la biosomère a été mesurée selon la méthode standard (APHA, 1998). Le PHA a été mesuré en utilisant un procédé d'extraction standard de méthanol et de chloroforme (Comeau et al., 1988) en utilisant de l'acide benzoïque comme étalon interne. La concentration maximale de biomasse a été obtenue en utilisant 25 g/L de concentration de sucre réductrice du jus de pomme de cajou, tandis que la teneur maximale en PHA et la consommation élevée de sucres réducteurs ont été obtenues dans

le cas de 21 g/L de sucres réducteurs (tableau 2). En outre, 20 g/L de concentration initiale en sucres réducteurs a été utilisé dans le développement ultérieur du procédé.

Tableau 1. Détermination de la concentration appropriée en sucres réducteurs

Conc. initial de sucres réducteurs (g/L)	Consom. sucres réducteurs (%)	Conc. biomasse (g/L)	Teneur PHA (wt.%)	Conc. PHA (g/L)
5.5	97.3	2.84	31.76	0.90
7	95.0	2.16	32.64	0.70
13	97.7	5.76	71.45	4.12
21	88.1	8.47	78.40	6.64
25	76.9	8.73	76.27	6.65
30	43.75	6.89	71.41	4.92
35	29.72	6.43	67.06	4.30

5

Exemple 2: Stratégie d'alimentation discontinue par cuvées à une impulsion et deux impulsions

Différentes stratégies d'alimentation ont été utilisées pour maximiser la concentration de biomasse et la teneur en PHA. La production de PHA a été réalisée en utilisant deux fermenteurs de 5L avec un volume de travail de 3L. Les deux fermenteurs ont été mis en mode d'alimentation à deux impulsions. Dans les
10 deux fermenteurs, les milieux de production ont été complétés par des minéraux. Cependant, l'alimentation a été effectuée en utilisant uniquement du jus de pomme de cajou sans addition de minéraux.

L'étude commence par la préparation du premier et du deuxième pré-inoculum. Le premier pré-inoculum a été préparé en inoculant des cellules de microorganismes producteur de PHA (*C.necator*) à partir des
15 plaques de gélose des milieux minéraux dans le bouillon de milieu minéral contenant (par litre d'eau

distillée) 20 g de glucose, 6,0 g d'hydrogénophosphate disodique dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 2,4 g de phosphate de dihydrogénase et de potassium (KH_2PO_4), 1,0 g de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), 0,50 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorure de fer (III) hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et chlorure de calcium hexahydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a
5 été stérilisée par filtration à travers un filtre de polyéthersulfone (PES) de 0,2 μm . Le glucose, le NH_4Cl et le $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ont été autoclavés séparément à 121° C pendant 15 min. Et ces solutions ont été mélangées de manière aseptique après refroidissement. Le pH moyen a été maintenu à 6,8 et le pré-inoculum a été maintenu sous agitation de 150 tr/min pendant 24h à 30° C.

Après ce temps, 10% du pré inoculum a été transféré dans 300 ml de milieux de jus de pomme de cajou
10 (deuxième pré-inoculum) contenant 15 g/L de concentration en sucres réducteurs. La composition de l'autre milieu minéral était identique à celle du premier milieu pré-inoculum. Le deuxième pré-inoculum a également été maintenu à 30 ° C pendant 24h et ensuite, le pré inoculum total a été transféré dans 2,7 L de milieu de production dans le fermenteur de 5 L. La composition des médias de production comprend 20 g/L de concentration en sucres réducteurs avec des minéraux (g/L): 6,00 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2,4
15 KH_2PO_4 , 1,00 NH_4Cl , 0,50 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Le pH du milieu de production a été maintenu à 6,8. La même procédure a été suivie pour les deux fermenteurs. La température a été maintenue à 30° C en faisant circuler de l'eau à travers la double enveloppe. Le pH de la fermentation a été contrôlé automatiquement à $6,8 \pm 0,1$ par des pompes péristaltiques contrôlées par ordinateur en utilisant de l'acide sulfurique 4N et du NaOH 4N. Le DO et le pH ont été contrôlés en
20 permanence au moyen d'une sonde polarographique à oxygène dissous et d'un capteur de pH (Mettler-Toledo, USA), respectivement.

Dans le premier fermenteur avec une stratégie d'alimentation en pouls, l'alimentation, c'est-à-dire les sucres réducteurs ont été ajoutés une seule fois pendant toute la fermentation, tandis que dans le deuxième fermenteur avec une stratégie d'alimentation à deux impulsions, l'alimentation, c'est-à-dire les
25 sucres réducteurs ont été ajoutés deux fois pendant la fermentation. Les échantillons des deux fermenteurs ont été prélevés après 12h pour mesurer la concentration de biomasse (g/L), la concentration de sucres réducteurs (g/L) et la teneur en PHA (% m/m).

La concentration de sucre réducteur pendant la fermentation a été analysée en utilisant la méthode DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) (Miller 1959). La concentration de biomasse a été mesurée selon la méthode

standard (APHA, 1998). Le PHA a été mesuré en utilisant un procédé d'extraction standard de méthanol et de chloroforme (Comeau et al., 1988) en utilisant de l'acide benzoïque comme étalon interne.

Dans les deux fermenteurs, on a réalisé approximativement la même teneur en PHA ainsi que la concentration de biomasse. La teneur en PHA était très élevée, à savoir de $90 \pm 2\%$, alors qu'une faible concentration en biomasse de $15 \pm 0,3 \text{ g / L}$ était obtenue. La faible concentration de biomasse pourrait résulter du manque de teneur en azote et en minéraux dans la solution d'alimentation car seule la source de carbone était fournie dans l'alimentation.

Exemple 3: Stratégie étape par étape d'alimentation discontinue par cuvées – effets des concentrations élevées et faibles des minéraux et d'azote

- 10 La stratégie d'alimentation discontinue est essentielle pour contrôler la concentration du substrat à son niveau optimal et pour atteindre une concentration maximale de cellules ou de biomasse ainsi qu'une productivité élevée en biomasse. Dans cette étude, le jus de pomme de cajou a été complété par des minéraux et une teneur en azote dans la solution d'alimentation. Cependant, la concentration de sucres réducteurs, de minéraux et d'azote a été variée pour deux fermenteurs.
- 15 L'étude commence par la préparation du premier et du deuxième pré-inoculum. Le premier pré-inoculum a été préparé en inoculant des cellules de *C. necator* des plaques de gélose des milieux minéraux dans le bouillon de milieu minéral contenant (par litre d'eau distillée) 20 g de glucose, 6,0 g d'hydrogénophosphate de disodium dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 2,4g de phosphate de dihydrogène et de potassium (KH_2PO_4), 1,0 g de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), 0,50 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), chlorure de fer (III) hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et de chlorure de calcium hexahydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La solution de ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a été stérilisée par filtration à travers un filtre de polyéthersulfone (PES) de $0,2 \mu\text{m}$. Le glucose, le NH_4Cl et le ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ont été autoclavés séparément à 121°C pendant 15 min. Et ces solutions ont été mélangées de manière aseptique après refroidissement. Le pH moyen a été maintenu à 6,8 et le pré-inoculum a été maintenu à l'agitation de 150 tr/min pendant 24h à 30°C .

Après ce temps, 10% du pré inoculum a été transféré dans 300 ml de milieux de jus de pomme de cajou (deuxième pré-inoculum) contenant 15 g/L de concentration de sucres réducteurs. L'autre composition de milieu minéral était identique à celle du premier milieu pré-inoculum. Le deuxième pré-inoculum a

également été maintenu à 30 °C pendant 24h et ensuite, le pré inoculum total a été transféré dans 2,7 L de milieu de production dans un fermenteur de 5 L. La composition des milieux de production comprend 10 g/L de concentration en sucres réducteurs avec des minéraux (g/L): 6,00 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 2,4 KH_2PO_4 , 1,00 NH_4Cl , 0,50 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,01 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,01 ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Le pH du milieu de production a été maintenu à 6,8. La même procédure a été suivie pour les deux fermenteurs. La température a été maintenue à 30 °C en faisant circuler de l'eau à travers la veste. Le pH de la fermentation a été contrôlé automatiquement à $6,8 \pm 0,1$ par des pompes péristaltiques pilotées par ordinateur en utilisant de l'acide sulfurique 4N et du NaOH 4N. Le DO et le pH ont été surveillés en permanence au moyen d'une sonde polarographique à oxygène dissous et d'un capteur de pH (Mettler-Toledo, USA), respectivement.

Dans le fermenteur A, l'alimentation a été effectuée en utilisant une concentration élevée de minéraux et on a utilisé de l'azote, alors que dans le cas du fermenteur B, on utilisait une faible concentration de minéraux et d'azote (tableau 3)

Tableau 3: Composition de la solution alimentant le bioréacteur lors de l'application de la stratégie étape par étape d'alimentation discontinue par cuvées

Constituants	Concentration	
	Fermenteur A	Fermenteur B
Sucre réducteurs (Cashew apple juice) (g/L)	20.0	15.00
NH_4Cl (g/L)	1.00	0.20
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	6.00	0.50
KH_2PO_4 (g/L)	2.40	0.20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0.50	0.04
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg/L)	10.0	0.80
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (mg/L)	10.0	0.80

Les échantillons des deux fermenteurs ont été prélevés après 12h pour mesurer la concentration de biomasse (g/L), la concentration de sucres réducteurs (g/L) et la teneur en PHA (% m/m). La concentration de sucre réductrice pendant la fermentation a été analysée en utilisant la Méthode DNS (acide 3, 5-dinitrosalicylique) (Miller, 1959). La concentration de biomasse a été mesurée selon la méthode standard (APHA, 1998). Le PHA a été mesuré en utilisant un procédé d'extraction standard de méthanol et de chloroforme (Comeau et al., 1988) en utilisant de l'acide benzoïque comme étalon interne.

Après la fin de la fermentation, une concentration maximale et très élevée en biomasse de 70,11 g/L a été obtenue dans le fermenteur A avec une forte concentration de minéraux et d'azote, suivie de 42,39 g/L de concentration de biomasse dans le fermenteur B avec une faible concentration de minéraux et d'azote. Cependant, la teneur en PHA dans le cas du fermenteur A, a augmenté jusqu'à 80% et a ensuite commencé à diminuer et atteint 66% à la fin de la fermentation, tandis que la teneur en PHA dans le cas du fermenteur B a augmenté jusqu'à la fin de la fermentation et a atteint 89%. La diminution de la teneur en PHA après une période de temps spécifique est due à l'accumulation d'excès d'azote qui modifie la voie métabolique du microorganisme vers la croissance de la biomasse au lieu de l'accumulation de PHA.

Une concentration maximale de PHA de 46 g/L a été obtenue en cas d'alimentation avec une concentration élevée de minéraux et d'azote, tandis que la concentration de 37,5 g/L de PHA a été obtenue en cas d'alimentation avec une faible concentration de minéraux et d'azote. Un rendement maximal et très élevé en PHA de 0,88 g de PHA/g de substrat consommé a été obtenu dans le cas du fermenteur, alimenté avec une faible concentration de minéraux et d'azote, tandis que le rendement en PHA de 0,54 g de PHA/g de substrat consommé a été obtenu dans le cas de fermenteur avec une forte concentration de minéraux et d'azote. **Le rendement PHA obtenu de 0,88 g de PHA/g de substrat consommé est le plus élevé observé en utilisant le jus de pomme de noix de cajou comme substrat de carbone par rapport aux autres substrats de carbone rapportés tels que le glycérol résiduel, le jus de fronde à huile et le saccharose (Mozumder et al., 2014; Cavaleiro et al., 2009; Ahmad et al., 2013).**

Exemple 4 : Récupération des protéines à partir du surnageant

La destruction de la lyse cellulaire qui se produit pendant la désactivation thermique et la lyse des cellules contenant de l'APTH libèrent également des protéines intracellulaires dans la solution. La concentration en protéines, de manière surprenante, dans la soupe de lysat était très élevée (32-36 g/L). Par conséquent, le surnageant recueilli après le traitement thermique lors de la centrifugation a été utilisé

5 pour l'extraction des protéines. Le pH du mélange a été abaissé à 3,5 en utilisant de l'acide sulfurique et le surnageant a été chauffé pendant 20 minutes à 90 degrés celsius sous agitation constante à 250 tr/min. La récupération de 30% de protéines a été obtenue après un traitement thermique. Par la suite, le bouillon a été refroidi à 50 degrés Celsius et le pH a été ajusté à 5,5 en utilisant du NaOH. On a ajouté de la carboxy méthylcellulose (polymère CMC) pour accélérer le processus de précipitation des protéines.

10 Une CMC de 2,4% (p/v) a été ajoutée au bouillon et bien mélangée pendant 20 minutes. Après 20 minutes de réaction, le surnageant a été laissé pendant 8 h pour permettre l'obtention de précipités de protéines par gravité. L'ensemble du procédé a permis de récupérer 77% des protéines du surnageant

REVENDICATIONS

1- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA), caractérisé par l'utilisation du jus de pomme de cajou comme substrat de carbone en mode d'alimentation semi discontinu et comprenant les étapes suivantes:

- 5 e) Préparation des milieux de production de PHA et inoculation de PHH produisant des cellules microbiennes dans les milieux de production,
 - f) Détermination de la concentration appropriée en sucres réducteurs pour la concentration maximale de biomasse et la production de PHA,
 - 10 g) Utilisation d'une concentration appropriée en sucres réducteurs pour la fermentation discontinue alimentée afin d'augmenter encore la concentration de biomasse et la teneur en PHA,
 - h) Traitement thermique du bouillon fermenté après la production de PHA et récupération de 77% des protéines à partir du surnageant après extraction par PHA.
- 2- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration de sucres réducteurs dans le jus de pomme de cajou varie de 5 à 35 g/L.
- 15 3- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration de chlorure d'ammonium dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,20 et 1 g/L.
- 20 4- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration d'Hydrogène phosphate disodique décahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,5 et 6 g/L.
- 5- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration de dihydrogénophosphate de potassium dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,20 et 2,40 g/L.
- 25 6- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration de sulfate de magnésium heptahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,04 et 0,5 g/L.

- 7- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration de chlorure ferrique heptahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,8 et 10 mg/L.
- 5 8- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration de chlorure de calcium heptahydraté dans le milieu de production de jus de pomme de cajou varie entre 0,8 et 10 mg/L.
- 9- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon la revendication 1, caractérisé en ce que la fermentation est appliquée pendant un temps compris entre 90 et 192h.
- 10 10- Procédé de production de bioplastiques ou polyhydroxyalcanoates (PHA) selon les revendications 1, 2 et 9, caractérisé en ce que la fermentation discontinue alimentée à l'aide de milieux de jus de pomme de cajou maintenue avec une concentration réductrice de sucre de 20 g/L et une concentration en azote de 0,20 g/L a donné un rendement PHA maximal de 0,88 g de substrat PHA/g consommé.

ABREGE DESCRIPTIF**Procédé de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir du jus de pomme de cajou**

La présente invention décrit la biosynthèse microbienne des bioplastiques (PHA) ou le procédé de production de polyhydroxyalcanoates (PHA) par des microorganismes producteurs de PHA (par ex. 5 *Cupriavidus necator*) en utilisant le jus de pomme de noix de cajou comme substrat de carbone renouvelable. Ladite invention a identifié et utilisé le substrat de carbone enrichis en éléments nutritifs pour une production de PHA de haute pureté.

Ce processus implique la détermination d'une concentration appropriée de sucre réducteur pour la croissance microbienne. L'invention décrit également une stratégie d'alimentation discontinue par cuvées 10 en utilisant le jus de pomme de cajou comme substrat de carbone et une variation des minéraux (azote et phosphore) pour améliorer la concentration de biomasse et le rendement en PHA. La récupération simultanée des protéines (à partir du surnageant) et son utilisation potentielle pour l'alimentation animale rend le processus de production de PHA plus économique.

PLANCHE 1/5

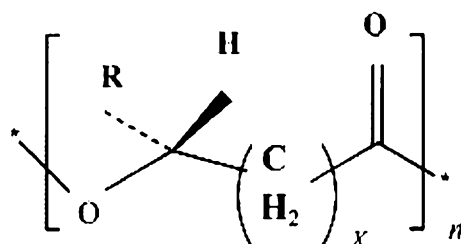


Fig 1.

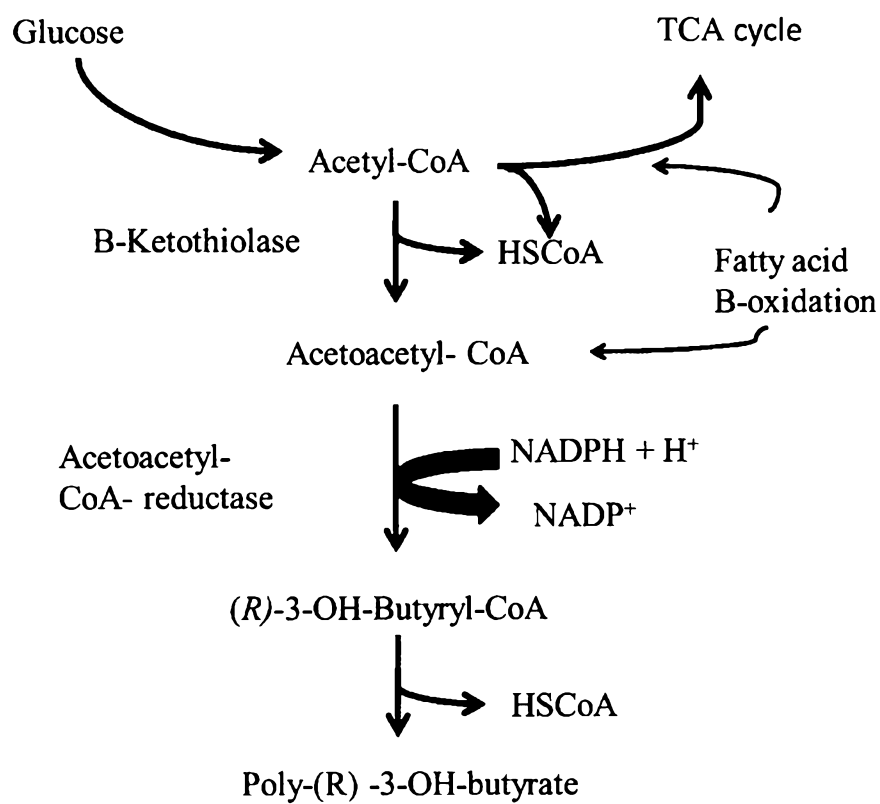


Fig 2.

PLANCHE 2/5

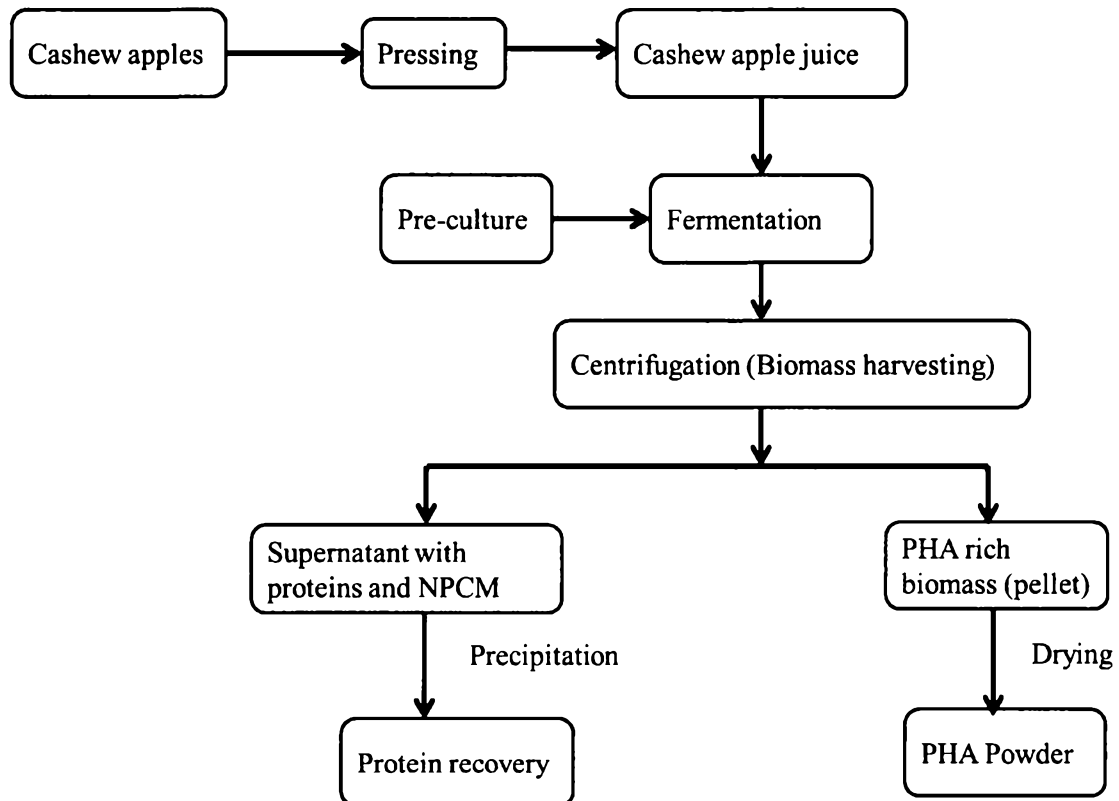


Fig 3.

PLANCHE 3/5

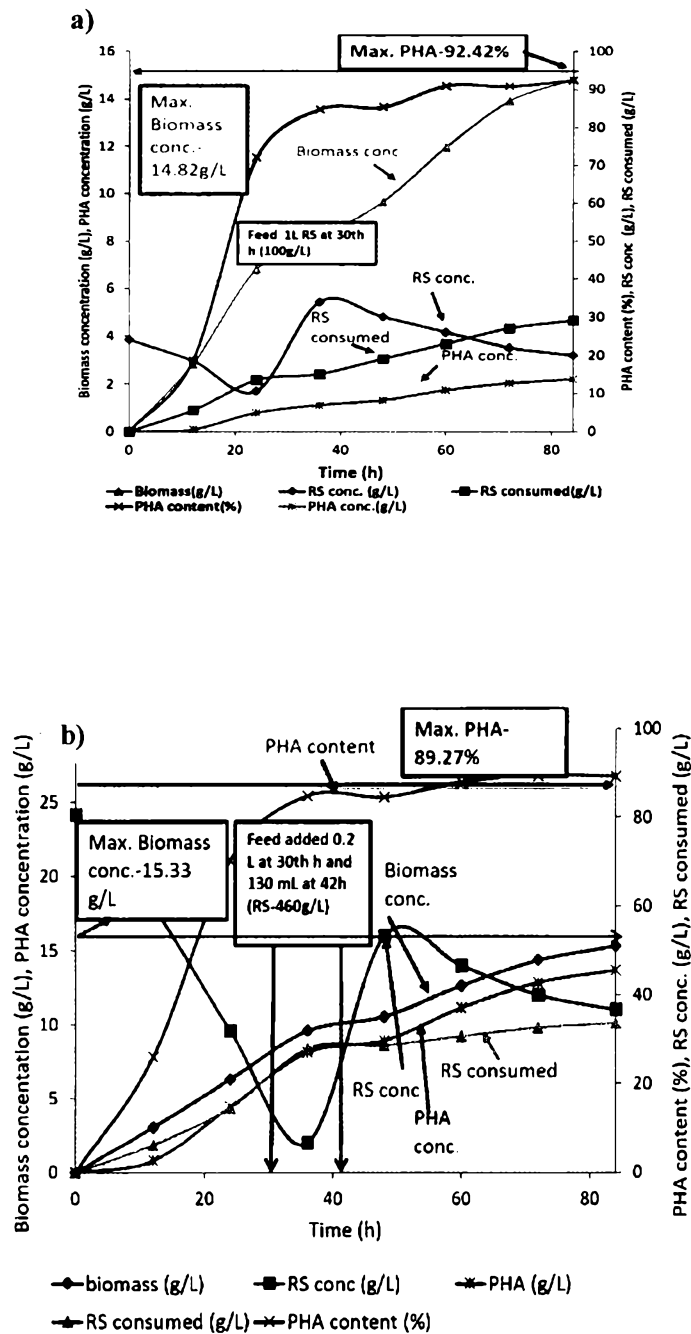


Fig 4.

PLANCHE 4/5

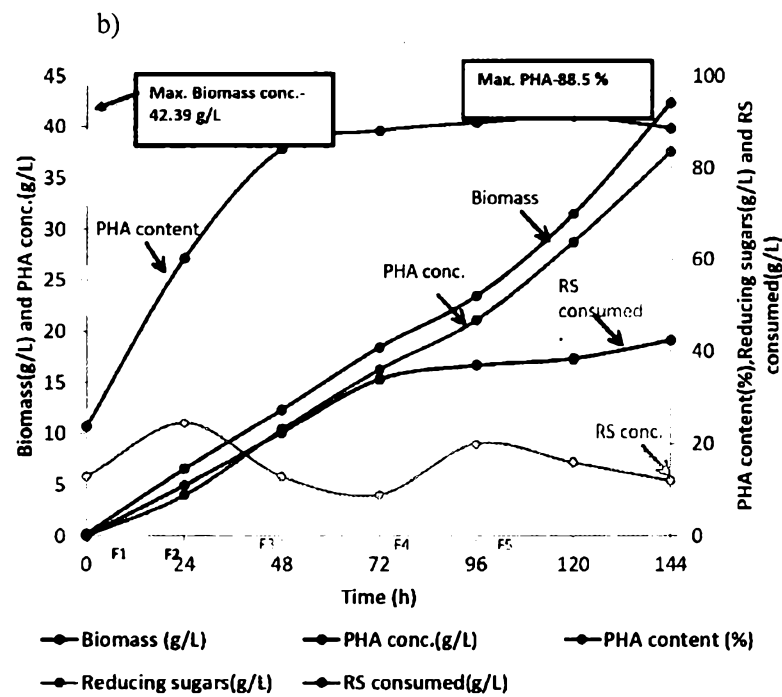
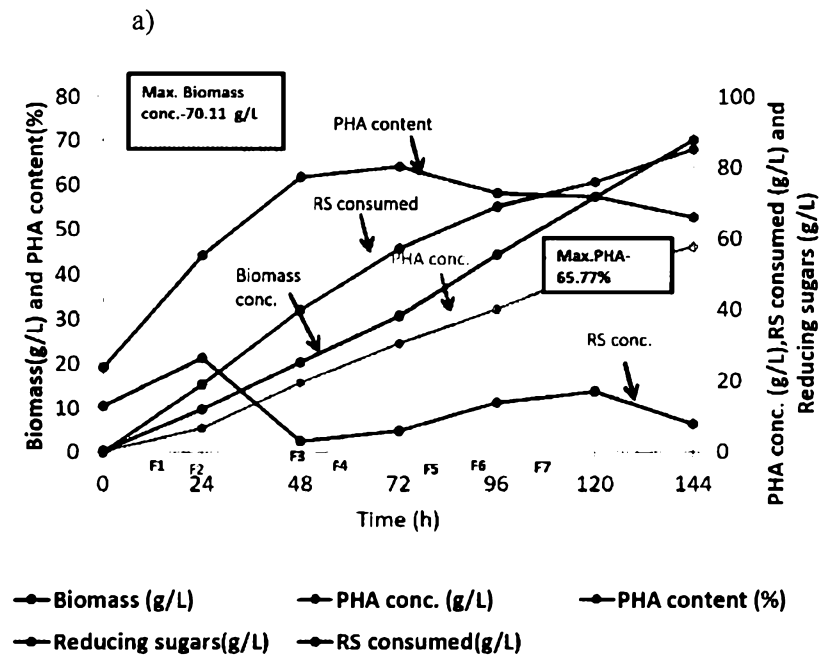


Fig 5.

PLANCHE 5/5

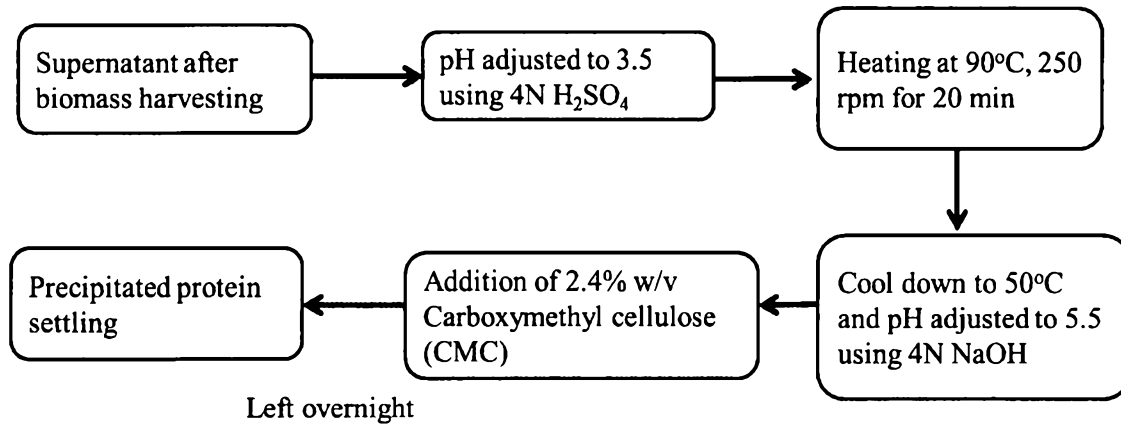


Fig 6. Diagramme schématique de la récupération des protéines à partir du surnageant

Références

- Anjum, Anbreen, et al. "Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements." *International journal of biological macromolecules* 89 (2016): 161-174.
- Betiku, Eriola, Harrison A. Emeko, and Bamidele O. Solomon. "Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice." *Heliyon* 2.2 (2016): e00082.
- Cavaleiro JMBT, de Almeida MCMD, Grandfils C, da Fonseca MMR. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochem* 2009;44:509–15.
- Fontes, Cláudia PML, Mariana Santiago Silveira, Alexandre A. Guilherme, Fabiano AN Fernandes, and Sueli Rodrigues. "Substitution of yeast extract by ammonium sulfate for mannitol production in cashew apple juice." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2, no. 1 (2013): 69-75.
- Hughes L, Richardson KR (1982) Fermentation. (Google patents).
- Ivanov, V., Stabnikov, V., Ahmed, Z., Dobrenko, S. and Saliuk, A., 2015. Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(2), pp.725-738.
- Kessler, Birgit, and Bernard Witholt. "Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism." *Journal of biotechnology* 86.2 (2001): 97-104.
- Lemoigne, M. "Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid." *Bull. Soc. Chem. Biol* 8 (1926): 770-782.
- Mozumder, Md Salatul Islam, Heleen De Wever, Eveline IP Volcke, and Linsey Garcia-Gonzalez. "A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production." *Process Biochemistry* 49, no. 3 (2014): 365-373.
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 56-77.
- Peña, C., T. Castillo, A. García, M. Millán, and D. Segura. "Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work." *Microbial biotechnology* 7, no. 4 (2014): 278-293.
- Prommajak, Trakul, Noppol Leksawasdi, and Nithiya Rattanapanone. "Biotechnological valorization of cashew apple: A review." *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* 13.2 (2014): 159-182.
- Volodina, Elena, Matthias Raberg, and Alexander Steinbüchel. "Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology." *Critical reviews in biotechnology* 36.6 (2016): 978-991.
- Zahari, Mior Ahmad Khushairi Mohd, Sharifah Sopliah Syed Abdullah, Ahmad Muhaimin Roslan, Hidayah Ariffin, Yoshihito Shirai, and Mohd Ali Hassan. "Efficient utilization of oil palm frond for bio-based products and biorefinery." *Journal of Cleaner Production* 65 (2014): 252-260.