



Article

Production de poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) par *Bacillus megaterium* LVN01 à l'aide de digestat de biogaz

Amanda Lucía Mora Martínez *, María Yepes-Pérez, Karent Alexandra Carrero Contreras et Paola Eliana Zapata Moreno

Grupo de Producción, Estructura y Aplicación de Moléculas, Facultad des Sciences, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Street 59A #63–20, Medellín 050003, Colombie ; msyepes@unal.edu.co (MY-P.); kacarreroc@unal.edu.co (KACC); pezapata@unal.edu.co (PEZM)

* Correspondance : almora@unal.edu.co

Résumé : L'espèce *Bacillus megaterium* LVN01 originaire de Colombie a démontré sa capacité à métaboliser différents coproduits ou déchets industriels (tels que le jus de figue, la mélasse de canne et le glycérol résiduel) et à accumuler du polyhydroxybutyrate (PHB), ce qui lui confère un potentiel dans l'industrie des bioplastiques. Dans cette recherche, le potentiel du digestat liquide comme source de carbone pour la production de polymères PHA dans les processus de fermentation avec cette souche bactérienne a été évalué. De manière favorable, il a été constaté que *B. megaterium* utilise les nutriments de ce substrat résiduel pour se multiplier de manière appropriée et synthétiser efficacement le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV). Fermentation discontinue aérobie à l'échelle banc, dans les conditions opératoires de cette recherche [volume : 3 L ; température : 30,8 °C ; agitation : 400 tr/min ; pH : 7,0 ± 0,2 ; oxygène dissous : 100 % de saturation ; antimousse : 10 % (v/v)], a généré des valeurs maximales de poids de cellules sèches (DCW) (0,56 g de cellule L⁻¹) à 60 h, tandis que le rendement maximal en PHBV (360 mg de PHBV L⁻¹) s'est produit à 16 h., ce qui est très favorable à la production durable de bioplastiques dégradables. De plus, les analyses GC – MS et RMN ont confirmé que le copolymère PHBV synthétisé par *B. megaterium* est constitué des monomères 3-hydroxybutyrate (3HB) et 3-hydroxyvalérate (3HV). De plus, les propriétés thermiques déterminées par TGA (Tonset = 283,1 °C ; Tendset = 296,98 °C ; Td = 290,114 °C) et DSC (Tm = °C 155,7 °C ; ΔHf = 19,80 J g⁻¹ ; Xcr = 18,17 %) indiquent qu'il s'agit d'un biopolymère thermiquement stable avec de faibles pourcentages de cristallinité, offrant une flexibilité qui facilite le moulage, l'adaptation et l'application dans divers s



Citation : Martínez, ALM ; Yepes-Pérez, M. ; Contreras, KAC; Moreno, PEZ Production de poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) par *Bacillus megaterium* LVN01 à l'aide de digestat de biogaz. Appl. Microbiol. 2024, 4, 1057-1078. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030072>

Rédacteur académique : Nikolaos

Kopsahélis

Reçu : 23 mars 2024

Révisé : 19 mai 2024

Accepté : 21 mai 2024

Publié : 9 juillet 2024



Copyright : © 2024 par les auteurs. Licencié MDPI, Bâle, Suisse.

Cet article est un article en libre accès distribué selon les termes et conditions des Creative Commons

Licence d'attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Mots clés : biopolymères ; les polyhydroxyalcanoates (PHA) ; le polyhydroxybutyrate (PHB); poly-hydroxyvalérate (PHV); *Bacillus megaterium*; digestat liquide; biomasse résiduelle de pêche

1. Introduction

Le développement industriel a apporté de grands bénéfices à l'humanité, mais bon nombre de ses processus et produits ont également eu un impact négatif sur les écosystèmes naturels, affectant la santé humaine et toutes les autres formes de vie. Parmi les cas les plus critiques figure la production et l'utilisation de plastiques conventionnels. Ceux-ci non seulement épuisent les ressources fossiles non renouvelables mais représentent également l'une des principales sources de contamination environnementale en raison de leur résistance à la dégradation, ce qui conduit à l'accumulation massive de ces contaminants dans divers écosystèmes [1].

Comme cela a été rapporté [2], la production de plastiques est passée de 1,5 tonne en 1950 à 250 tonnes en 2010 et à 400,3 tonnes en 2022. L'émergence des plastiques circulaires, qui implique une seconde utilisation de ceux existants, a obtenu une légère baisse de la production mondiale, proche de 10 % [2]. Les plastiques représentent une grande partie des déchets rejetés dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, où des microplastiques et des îlots de plastique ont été trouvés [3,4]. Selon des rapports de 2019, la pollution plastique a généré 1,8 milliard de tonnes d'émissions de gaz à effet de serre, ce qui équivaut à 3,4 % des émissions totales générées dans le monde [5].

Face à cette crise environnementale, la production de bioplastiques, ou polymères verts du futur, s'impose comme une alternative pour remplacer les pétroplastiques [6]. Ces polyesters sont classés en trois types [1] : l'acide polylactique (PLA), le succinate de polybutylène (PBS) et les polyhydroxyalcanoates (PHA). Ces derniers sont les seuls qui sont synthétisés et catabolisés naturellement par les bactéries, et qui sont donc des composés chimiques naturels, ce qui confère une plus grande valeur ajoutée à leur production industrielle, avec l'estimation qu'en 2023, leur marché mondial atteindra 57,8 million de dollars.

Si les réglementations et politiques gouvernementales continuent de réduire les plastiques à usage unique, il est possible que d'ici 2028, le marché des PHA connaisse une augmentation de près de 50 %, représentée par 98,5 millions de dollars [7].

Les PHA sont des métabolites secondaires d'une grande variété de bactéries, de champignons et de certaines plantes, qui les produisent et les accumulent comme réserve d'énergie lorsque les conditions extérieures rendent leur survie difficile [8]. Ces biopolymères ont un potentiel important pour remplacer les plastiques conventionnels dérivés de la pétrochimie, car ils possèdent des caractéristiques physico-chimiques similaires tout en démontrant également des propriétés supérieures en termes de transformabilité thermique et de biocompatibilité. Cela les rend parfaitement adaptés à la fabrication d'appareils biomédicaux, dentaires et électroniques, ainsi qu'à une utilisation dans tous les secteurs, notamment la construction, l'automobile, l'emballage et l'agriculture [3,8]. En raison des propriétés biodégradables et biocompatibles du PHA, ses applications s'étendent à la production de dispositifs médicaux et dentaires. De plus, des tests sont en cours de développement pour stimuler la régénération tissulaire et la production de microsphères pour l'administration de médicaments [9].

Bien qu'une variété de micro-organismes (plus de 300 espèces) aient été utilisés pour obtenir une large gamme de biopolymères, seules quelques bactéries ont fait l'objet d'études approfondies pour la fabrication de bioplastiques en raison de leur efficacité et de leurs taux de production plus élevés. Ceux-ci incluent *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *P. putida*, *Halomonas* sp., *Pseudomona fluorescens*, *P. oleovorans*, *R. eutropha* et *Cupriavidus necator* [10]. En particulier, la bactérie *Bacillus megaterium* est une excellente machine biologique pour produire des PHA car elle possède un système d'expression robuste et une paroi cellulaire déficiente en lipopolysaccharides, ce qui facilite la libération du biopolymère synthétisé de manière intracellulaire par la bactérie [11,12].

Structurellement, les PHA sont classés selon la composition de leurs monomères en (a) PHA à chaîne courte (SCL), constitués de monomères de 3 à 5 carbones, tels que le poly-3 hydroxyvalérate [P3HV] et le poly-3-hydroxybutyrate [P3HB]; (b) les PHA à chaîne moyenne (MCL), avec des monomères de 6 à 14 carbones, comme le copolymère 3-poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) connu sous le nom de [3 3(HB-co-HV) ou [p(3HB-co-3HV) ou PHBV ; et (c) à chaîne mixte (MCM), qui combinent les deux précédents et sont donc constitués de monomères entre 3 et 14 carbones, comme c'est le cas du poly (3HB co- 3HV-co-3HHx). Du point de vue industriel, le PHB et le copolymère PHBV [9] se distinguent par la longueur de la chaîne carbonée qui définit le caractère fragile de ceux à chaîne courte ou flexible pour les exemples à chaîne moyenne [13] .

Dans une large mesure, la longueur de la chaîne est influencée par le type de substrat utilisé pour induire la production de PHA d'origine microbienne. Les substrats à forte teneur en glucides stimulent principalement la production de polymères SCL PHA (polyhydroxyalcanoate à chaîne courte), tandis qu'une forte teneur en acides gras stimule celle des MCM PHA. Les PHA SCL les plus étudiés sont ceux formés par P3HB. Pour améliorer les propriétés mécaniques du P3HB et élargir ses applications, la production d'hétéropolymères tels que le PHBV a été étudiée, qui, en raison de la présence du monomère 3HV dans sa structure, présente de meilleures caractéristiques de flexibilité, améliorant les propriétés du PHB [9] .

Pour induire la production de copolymères dans les bactéries, des substrats carbonés comprenant des mélanges d'acides gras volatils purs (AGV), ou des matériaux ou des eaux usées à haute teneur en AGV, sont utilisés. Les bactéries du genre *Bacillus* synthétisent des copolymères de PHBV dans des cultures complétées par un mélange d'AGV issus de l'hydrolyse contrôlée d'écorces de pois, de marc de pomme, d'écorces d'oignon et d'écorces de pomme de terre [14]. Les auteurs ont constaté que *Bacillus cereus* EGU43, cultivé sur des hydrolysats de coques de pois, accumulait le copolymère de PHBV avec une teneur en 3HV de 1 % p/p.

La co-culture de *Pseudomonas* sp. ST2 et *Bacillus* sp. Le CS8 dans des milieux de culture contenant des acides acétique et propionique comme source de carbone, complété par du glucose, produit jusqu'à 35 % de copolymère PHBV [15] ; lorsqu'un mélange de glucose et d'acide propionique est utilisé, les souches individuelles produisent plus de PHA que lorsque le glucose est utilisé comme seule source de carbone. Avec *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599, cultivé dans l'acide valérique ou l'acide propionique, on obtient du PHBV avec de meilleurs rendements dans le premier cas. *Ralstonia eutropha* KCTC 2658, cultivée dans un mélange d'acide acétique, propionique et butyrique dans un rapport de 1:2:2 [16], peut atteindre une production de PHBV de 50 % du DCW. *Cupriavidus necator*, cultivé dans des effluents d'eaux usées riches en acides acétique, propionique et butyrique, sans ajout de substrat exogène, produit une quantité substantielle de copolymère PHBV (55 % du DCW) [17]. Récemment, Ferre-Guell et Winterburn [18] ont obtenu des concentrations élevées de copolymère PHBV en cultivant *Haloferax mediterranei* dans un mélange d'acides butyrate et valérate avec l'ajout de tensioactifs (Tween 80) pour augmenter la biodisponibilité du substrat, avec une productivité de 10,2. mg/L·h en fermentation *discontinue* [18]. De telles approches peuvent potentiellement réduire les coûts de production des PHA et offrir des avantages environnementaux grâce à la réutilisation des déchets.

Aujourd'hui, bien que la capacité de production mondiale de PHA d'origine biologique augmente chaque année, la production industrielle de PHA est limitée en raison de ses coûts de production (environ 4 000 à 15 000 USD/tonne métrique), qui dépassent largement les coûts des polymères. dérivés de combustibles fossiles (environ 1 000 à 1 500 USD/tonne) [3]. La matière première (substrat) représente environ 50 % du coût total de production [19] ; par conséquent, la rentabilité de la production de PHA est largement définie par les coûts des matières premières, en particulier les substrats sources de carbone. Ceci est dû au fait que l'accumulation de PHA se produit dans des conditions aérobies, de sorte qu'une grande partie du substrat est utilisée dans la respiration intracellulaire microbienne avec formation de CO₂ et de métabolites secondaires solubles dans l'eau. Seule une partie de la source de carbone, bien moins de la moitié, est dirigée vers la croissance de la biomasse cellulaire et l'accumulation de PHA [19].

En plus de ce qui précède, les processus industriels de production de PHA sont basés sur une technologie de fermentation dans laquelle ils utilisent des substrats coûteux (sucres purifiés, huiles végétales comestibles, entre autres) qui, en outre, font partie du panier familial. Par conséquent, son utilisation met la technologie en concurrence avec l'industrie alimentaire et rend la production totale de PHA plus coûteuse. Par conséquent, il existe un besoin urgent d'utiliser des substrats sources de carbone qui n'affectent pas la sécurité alimentaire, qui soient économiques et abordables et qui soient durables pour la synthèse durable des PHA [3,20].

Des substrats de faible valeur ont été évalués comme sources de carbone pour la production de PHA provenant de différents secteurs productifs : industrie laitière (fromage/lactosérum, eaux usées laitières), usines pétrolières et papetières, cultures agricoles (effluents pétroliers palmier/soja/fruit), et les déchets animaux (fumier de poulet/vache) [3]. Cependant, ce sont des substrats qui nécessitent des traitements préalables pour être utilisés comme milieux de culture microbienne, ce qui entraîne des coûts supplémentaires. Pour cette raison, l'attention a été attirée sur l'utilisation de substrats qui présentent un premier avantage, comme la génération de biocarburants, en particulier les acides gras volatils (AGV), c'est-à-dire les métabolites intermédiaires dans la digestion anaérobie (DA) de la biomasse résiduelle qui sont utilisés. pour la production de biogaz [21]. En ce sens, les chercheurs ont porté leur attention sur le renforcement de la production d'AGV en tant que produit collatéral de la production de biogaz [22]. Des chercheurs colombiens ont rapporté un travail intéressant dans lequel ils exploitent à cet effet les déchets de pêche, avec lesquels on obtient également un digestat riche en AGV [23].

Bacillus megaterium LVN01, originaire de Colombie, a montré sa capacité à produire des PHA à partir de glycérol résiduel provenant de l'industrie du biodiesel [24], de fruits de caroube [25], de résidus de transformation de la figue (jus de figue) [12] et d'huile de friture. Dans cette recherche, *B. megaterium* LVN1 a montré sa capacité à synthétiser le PHBV à partir du digestat liquide, un substrat résiduel issu de la digestion anaérobie des visières de poissons.

Dans ce contexte, le groupe de recherche PROBIOM (production, structure et application de biomolécules) de l'Université nationale de Colombie a apporté son expérience de recherche à la production de PHA à partir de différents substrats (glycérol, jus de figue, pulpe de caroube, huile de friture). donner une seconde utilisation aux déchets de l'industrie de la pêche à travers ses participations

pation dans le projet de redevances « Renforcement de l'activité de pêche artisanale dans le Pacifique Nariño colombien vers une utilisation durable de la ressource. Tumaco ». Dans le cadre du projet, la première utilisation alternative des déchets de pêche a été la production de biogaz via le groupe de prospective environnementale de l'Université nationale de Colombie, au siège de Palmira. PRO- BIOM utilise le digestat de cette première phase comme substrat principal de *B. megaterium* LVN01 pour la production de PHA.

En Colombie, la pêche artisanale fournit environ 12 000 tonnes de poisson/an au marché national, soit 8 % de la pêche de capture totale du pays. On estime que 45 % des captures totales de la pêche artisanale deviennent des déchets [23,26], ce qui entraîne de graves pertes économiques pour ce secteur et des problèmes environnementaux liés à une élimination inadéquate des déchets. En Colombie, les déchets des bateaux de pêche sont jetés directement dans l'océan ou ramenés à terre [23].

Participation au projet « Renforcement de l'activité de pêche artisanale dans le Nariño Pacifique colombien vers une utilisation durable de la ressource. Tumaco », qui a entre autres objectifs « d'augmenter l'utilisation des excédents et des déchets de pêche dans le Pacifique de Nariño », a servi de plateforme à cette initiative. Dans le cadre de l'objectif susmentionné, l'accent initial est mis sur la production de biogaz à partir de déchets de pêche via le groupe de prospective environnementale de l'Université nationale de Colombie, siège de Palmira. Les auteurs de cette recherche (le groupe PROBIOM) utilisent le digestat, coproduit de l'étape initiale, comme substrat principal pour la croissance de *B. megaterium* LVN01 et la synthèse microbienne du PHA tout en explorant un nouveau flux de déchets, non rapporté précédemment, et conférant une valeur potentielle aux déchets de pêche.

2. Matériels et méthodes

2.1. Déclaration d'éthique

Les résultats de cette recherche sont articulés conformément à l'Accord d'accès aux ressources génétiques et dérivés n° 159, signé par le ministère de l'Environnement et du Développement durable et l'Université nationale de Colombie, résolution 0004, 2 janvier 2018, dans le cadre du projet intitulé « Production et caractérisation de polyhydroxyalcoates synthétisés par des souches natives à partir de déchets organiques.

2.2. Zone d'étude et souche bactérienne

B. megaterium LVN01 (Code GenBank : QJGY00000000.1) a été isolée par le groupe PROBIOM à partir d'échantillons de sol collectés dans la commune de Guarne (06°16'50" N et 75°26'37" W, département d'Antioquia, Colombie) et initialement caractérisés à l'aide de techniques moléculaires (similitude de séquence d'ADNr 16S), morphologiques et biochimiques [12]. Les cultures bactériennes ont été conservées à -4 °C dans un bouillon Luria Bertani (bouillon LB, MERCK, Darmstadt, Allemagne) avec 20 % de glycérol (v/v).

2.3. Source de carbone

Un résidu liquide de l'usine pilote de biogaz, qui fonctionne avec de la biomasse résiduelle provenant des déchets de la pêche artisanale, a été utilisé comme substrat pour les fermentations. L'usine est située dans la ville de San Andrés de Tumaco, dans les locaux de l'Université nationale de Colombie (à Tumaco, département de Nariño, Colombie). Les échantillons ont été fournis par le groupe de recherche de prospective environnementale de la même université dans le cadre du projet « Renforcement de l'activité de pêche artisanale dans le Pacifique colombien de Nariño, vers une utilisation durable de la ressource ».

Ce résidu liquide, appelé digestat, est une source précieuse d'AGV. Pour sa conservation, il a été stocké congelé à -4 °C et, avant son utilisation dans le processus, il a été filtré sur du papier épais (taille des pores 20 µm) pour éliminer les sédiments supérieurs à 20 µm. Cette étape a facilité l'activité de fermentation microbienne dans le milieu enrichi de ce substrat et évité l'obstruction des capteurs de l'équipement où le processus a été mené.

La caractérisation bromatologique du digestat a révélé la présence de plusieurs nutriments, dont des AGV (59,04 ± 0,9 g/L), avec des concentrations significatives d'acide acétique.

($24,49 \pm 1,82$ g/L), acide butyrique ($11,81 \pm 0,02$ g/L) et acide isobutyrique ($9,36 \pm 0,02$ g/L). Cette composition représente une source potentielle de carbone pour *B. megaterium*, qui présente un intérêt pour cette recherche (tableau S1).

2.4. Média culturel

La gélose nutritive (Merck, Microbiological Grade, Darmstadt, Allemagne) était composée de $5,0 \times 10^{-3}$ g/L de pluripeptone, $3,0 \times 10^{-3}$ g/L d'extrait de viande, $8,0 \times 10^{-3}$ g/L de chlorure de sodium et $15,0 \times 10^{-3}$ g/L, avec un pH final : $7,3 \pm 0,2$. Le bouillon Luria Bertani (bouillon LB, MERCK, Darmstadt, Allemagne) était composé de 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl, avec un pH ajusté à 7,0, en utilisant environ 0,2 ml de NaOH (5 N).

Les sels moyens minimum (MMS) ont été complétés par KH_2PO_4 (1,5 g/L), Na_2HPO_4 (3,6 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L), extrait de levure (0,1 g/L), glycérol résiduel (20 g/L) comme source de carbone et 1,0 mL/L d'une solution d'oligo-éléments (TE) composée de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,25 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,0 g/L), $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,23 g/L), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (0,1 g/L), et 10 mL HCl (35%), avec un pH final de $7,3 \pm 0,2$.

2.5. Activation de la souche bactérienne et préparation de l'inoculum

2.5.1. Activation de *B. megaterium* LVN01

Un total de 10 μL de cellules préalablement conservées ont été cultivées dans un bouillon LB contenant 20 % de glycérol sur des plaques de gélose nutritive à 37 °C pendant 24 h. La présence et la pureté du micro-organisme ont été déterminées par coloration de Gram et coloration des spores au vert malachite. La capacité d'accumulation de PHA a été vérifiée via la coloration au bleu du Nil, décrite plus loin dans l'article.

2.5.2. Préparation de l'inoculum

Une colonie de *B. megaterium* LVN01 a été remise en suspension dans 10 ml de bouillon LB et incubée pendant 24 h dans un agitateur orbital (Heidolph Unimax 1010 avec Inkubator 1000, Heidolph instruments, Schwabach, Allemagne) à 37 °C et 200 tr/min. Par la suite, 1 mL du micro-organisme activé a été dilué dans 50 mL de milieu de culture LB. Les cultures ont été incubées dans un agitateur orbital (37 °C et 200 tr/min) pendant 6 h ou jusqu'à ce que la solution dans chaque flacon atteigne une densité optique à 600 nm (OD_{600}) supérieure à 1,0 unité. Enfin, pour l'inoculum, une nouvelle fermentation a été réalisée en prenant 100 mL de pré-inoculum et 200 mL de milieu MMS. La culture a été incubée dans un agitateur orbital à 37 °C et 200 tr/min pendant environ 24 h, jusqu'à ce que les lectures estimées de OD_{600} soient comprises entre 0,1 et 0,3 unités.

2.5.3. Caractérisation de *B. megaterium* et visualisation du PHA accumulé

Le protocole de coloration de Gram [27] a été utilisé pour identifier la morphologie des cellules bactériennes de *B. megaterium* LVN01. La lame colorée a été laissée sécher à l'air et observée au microscope (Leica DM500, Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne) (Figure S1). La coloration des spores a ensuite été développée en utilisant la méthodologie Shaeffer-Fulton [28,29] ; la lame a été recouverte de safranine pendant 2 minutes, lavée, laissée sécher et observée au microscope (Figure S2). L'accumulation de polyhydroxyalcanoate (PHA) a été visualisée pour la première fois avec le rouge du Nil [30], en sélectionnant des colonies présentant une fluorescence rouge-orange sous la lumière UV (340 nm), potentiellement classées comme producteurs de PHA (Figure S3a). Par la suite, pour confirmer la présence de PHA, les colonies sélectionnées ont été colorées au bleu du Nil selon la méthodologie d'Ostle et Holt (1982) [31] et observées au microscope à fluorescence à 450 nm (Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japon). Ce processus a permis la visualisation des granules de biopolymère (Figure S3b).

2.6. Processus de fermentation aérobie

Les bioprocédés ont été réalisés dans un bioréacteur de 7 L avec cuve agitée (Applikon, équipé de deux hélices de type Rushton et d'un biocontrôleur EZ2, série 2310110012, Delf, Pays-Bas), exploité en mode batch. Le volume de travail initial était de 3 L (dilué

digestat liquide, MMS et inoculum dans un rapport de 80:10:10) (Figure S4). La température a été réglée à 30,8 °C, la vitesse d'agitation à 400 tr/min et la durée à 60 h. À 300 ml de MMS, 300 ml d'inoculum de *B. megaterium* ont été ajoutés, suivis de 2,4 L du digestat ou de la source de carbone. Dans ces conditions, la DO600 initiale du milieu a été enregistrée entre 0,1 et 0,3 unités. Le milieu de fermentation a été maintenu à pH 7,0 ± 0,2 (ajusté à l'aide de HCl (MERCK, Darmstadt, Allemagne) ou de NaOH (MERCK, Darmstadt, Allemagne, 1 M, selon les besoins), et l'oxygène dissous a été réglé à 100 % de saturation en injectant plusieurs impulsions d'oxygène industriel extra sec pendant la fermentation (1 vvm), à travers un filtre d'aération de 0,22 µm, avec un débit d'oxygène de 3 L/min pour maintenir des conditions aérobies. Gouttes d'une solution antimousse à 10 % (v/v) de silicone (Antioqueña). issus de produits chimiques, de qualité alimentaire, Colombie) ont été ajoutés au début de chaque lot et lorsque nécessaire.

Dans cette recherche, les paramètres opérationnels optimaux établis par Gómez et al. [24] ont été appliqués à la production de PHA, en utilisant *B. megaterium* LVN01 et du glycérol résiduel comme source de carbone, dans un bioréacteur de 5 L fonctionnant en mode batch avec un volume effectif de 3 L. La proportion de digestat (source de carbone) utilisée a été dérivée d'une étude précédente à l'échelle du laboratoire, qui a montré les valeurs les plus élevées de PSC (27,1 mg) et de PHA (14,8 mg) à 36 h pendant des fermentations discontinues dans des flacons de 500 ml sous agitation orbitale (T : 30 °C, 200 tr/min), pH : 7,0 et un rapport MMS-digestat de 20:80.

La cinétique de fermentation a été surveillée pendant 60 h, avec des échantillons (20 ml) prélevés en triple toutes les deux heures. La croissance bactérienne a été mesurée par spectrophotométrie (DO600), suivie d'une détermination du poids cellulaire sec (DCW) et d'une extraction de biopolymère de type PHA.

Chaque échantillon a été centrifugé à 10 000 × g pendant 10 min à 4 °C (centrifugeuse Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Kalkberg, Allemagne). Les culots bactériens ont été lavés deux fois de suite avec 20 ml d'eau déminéralisée. Enfin, les granules ont été remis en suspension dans 700 µL d'eau désionisée et congelés à -4 °C jusqu'à lyophilisation ultérieure (à -50 °C, 0,01 mBar pendant 24 h). La biomasse bactérienne collectée a été séchée à 60 °C (four Binder classe 2.0, Allemagne) jusqu'à ce qu'elle atteigne un poids constant, et elle a été rapportée en DCW (grammes de cellules par litre de milieu de culture).

2.7. Extraction et purification du PHA

Le biopolymère a été isolé de la biomasse lyophilisée selon la méthodologie de Gómez et al. [24]. La biomasse sèche a été traitée avec un mélange de 10 % (v/v) d'hypochlorite de sodium (NaClO, Químicos JM, Medellín, Colombie) et de chloroforme (CHCl₃) (MERCK, 99 %, Darmstadt, Allemagne) dans un rapport de 1 : 1,5. L'échantillon a été homogénéisé par agitation douce et rapide (vortex) et incubé à 40 °C et 200 tr/min pendant 3 h. Ensuite, il a été centrifugé (10 000 × g, 10 min, 4 °C) pour séparer les phases. La phase organique contenant le PHA a été filtrée sur papier filtre épais. Le filtrat a été séché à température ambiante (27 °C) dans une enceinte de biosécurité (BIOBASE, modèle BBS-DDC, série BBS11V1805175D, Shandong, chinois, vitesse de l'air 0,3 à 0,5 m/s), et sa masse sèche a été mesurée en utilisant une balance (Shimakzu, série AUW220D, Kyoto, Japon avec une plage de travail de 220 g à 1 mg).

Pour la purification du PHA, la procédure de Gómez et al. [24] a été suivie, avec quelques modifications : 500 µL de méthanol froid (0–4 °C) à 70 % v/v (JT Baker, GR, Phillipsburg, NJ, USA) ont été ajoutés à chaque tube contenant le filtrat sec pour précipiter les particules. La solution a été réfrigérée à 4 °C pendant 12 h puis centrifugée à 8 000 × g et 4 °C pendant 10 min. Le solvant a été évaporé à température ambiante (27 °C) sous une hotte d'extraction de gaz pour récupérer le PHA.

Ensuite, le biopolymère (PHA) a été lavé consécutivement avec du n-hexane (MERCK, GR, Darmstadt, Allemagne), de l'acétone (MERCK, GR, Darmstadt, Allemagne) et de l'éther diéthylique (Mallinckrodt, 99,9 %, Saint Louis, MO, USA.). Chaque solvant (250 µL) a été ajouté goutte à goutte à l'échantillon de PHA sec, suivi d'une centrifugation (8 000 × g, 4 °C, 10 min). Le surnageant a été jeté et le précipité a été séché à l'air à température ambiante (27 °C) pendant 12 h pour éliminer tout solvant restant. Ce processus de lavage a été répété 2 à 3 fois jusqu'à ce qu'un PHA presque blanc soit obtenu pour garantir sa pureté.

Pour calculer le ratio PHA en fonction de la quantité de poids sec accumulé, exprimée en pourcentage, l'équation suivante a été utilisée :

$$\text{PHA (\%)} = \frac{\text{PHAPoids}}{\text{CellulaireSecPoids}} \times 100.$$

2.8. Caractérisation des PHA

2.8.1. Chromatographie en phase gazeuse – Spectrométrie de masse (GC – MS/SIM)

L'analyse des échantillons a été réalisée conformément aux lignes directrices ISO 12966-2:2017 [32] avec quelques modifications. Le poly (acide 3-hydroxybutyrique) (Sigma-Aldrich, Lot : 09217BD-337, St. Louis, MO, USA) a été utilisé comme étalon de référence. L'analyse chromatographique a été réalisée sur un GC AT 6890 Series Plus (AT, Palo Alto, CA, USA) couplé à un détecteur sélectif de masse (AT, MSD 5973) fonctionnant en mode SIM. L'injection a été réalisée en mode splitless (Viny = 2 µL). La colonne utilisée dans l'analyse était de 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm DB-5MS 5%-Ph-PDMS.

2.8.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN 1H et RMN 13C)

Un spectromètre RMN à 600 MHz a été utilisé (Bruker, Avance III HD, cryoponde TCI à l'azote, Topspin Software v3.6.5, tube de 5 mm, Billerica, MA, USA). L'échantillon a été préalablement préparé en dissolvant 30 mg de biopolymère dans du chloroforme deutéré (CDCl₃), et 700 µL de tétraméthylsilane (TMS) ont été utilisés comme contrôle interne.

2.9. Propriétés thermiques du

PHA 2.9.1. Calorimétrie à balayage différentiel

Un calorimètre Q2000 (TA INSTRUMENTS, New Castle, DE, USA) a été utilisé dans cette analyse pour la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Un échantillon d'exactly 5,72 mg (PHA) a été utilisé pour l'analyse. Le test a été réalisé avec un flux d'azote comme gaz de purge de 50 mL/min ; ensuite, l'équipement a été paramétré pour le matériau. Il y a eu une période de stabilisation à une température de 25 °C, avec un chauffage jusqu'à 200 °C à une vitesse de 10 °C/min.

2.9.2. Analyse thermogravimétrique Pour

l'analyse thermogravimétrique (TGA), un analyseur thermogravimétrique TGA/SDTA851e (Mettler Toledo, OH, USA) a été utilisé, fonctionnant sous une atmosphère d'azote avec un débit de 40 ml/min. Un échantillon de 10 mg d'acide polyhydroxybutyrique (PHB) a été soumis à une plage de température comprise entre 30 °C et 800 °C à une vitesse de 10 °C/min.

2.10. Analyse et présentation des résultats

Tous les tests effectués dans le cadre de cette recherche ont été menés en triple. Les résultats sont présentés sous forme de médiane ± écart type dans les tableaux et les graphiques. Le logiciel Sigma Plot version 10.0 (Systat Software, Inc ; Chicago, IL ; USA) a été utilisé pour concevoir les graphiques, et l'analyse statistique a été développée dans STATGRAPHICS Centurion version XVI.II (Statgraphics Technologies, Inc. ; The Plains, VA, USA).).

3. Résultats

3.1. Cinétique de fermentation

La phase de latence de la culture de *B. megaterium* (LVN01) dans le digestat s'étendait jusqu'à près de 40 h, sa phase exponentielle se produisant entre 40 et 66 h (Figure 1). Le système a été échantillonné jusqu'à 60 h sur la base d'expériences antérieures à l'échelle du laboratoire avec les mêmes paramètres opérationnels (Figure S5). Les échantillons ont été évalués en triple pour garantir l'exactitude des résultats. Toutefois, en raison de la dispersion des données, il a été déterminé que

La phase de latence de la culture de *B. megaterium* (LVN01) dans le digestat s'étendait jusqu'à près de 40 h, sa phase exponentielle se produisant entre 40 et 66 h (Figure 1). Le système a été échantillonné jusqu'à 60 h sur la base d'expériences antérieures à l'échelle du laboratoire avec les mêmes paramètres opératoires (Figure S5). Les échantillons ont été évalués en triple pour garantir l'exactitude des résultats. Cependant, en raison de la dispersion des données, il a été déterminé que le calcul de la médiane de chaque unité expérimentale fournissait une représentation plus représentative des résultats que le calcul des moyennes unitaires expérimentales.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m X_{ij} \times f_{ij}}{n}$$

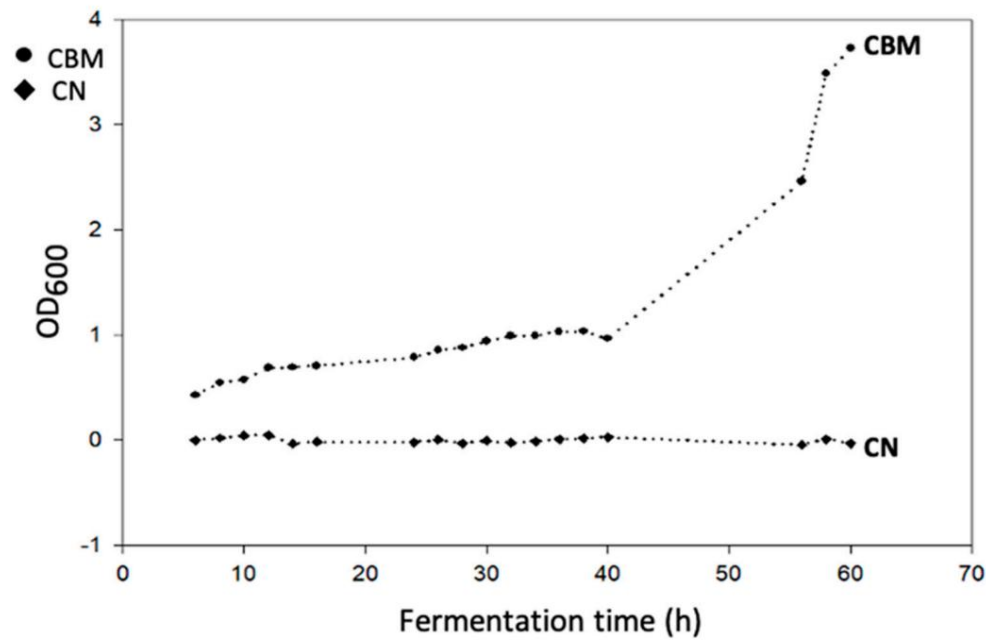


Figure 1. Courbe de croissance de *B. megaterium* LVN01 dans le digestat de biogaz (CBM, cercles) ; contrôle négatif : Figure 1. Courbe de croissance de *B. megaterium* LVN01 dans le digestat de biogaz (CBM, cercles) ; contrôle négatif : milieu avec digestat (CN, diamants) ; conditions opératoires : 3 L, 400 tr/min, 30,8 °C, pH 7.

3.2. Récupération du poly(3-hydroxybutyrate)-Co-(3-hydroxyvalérate) (PHBV) 3.2.

Récupération du poly(3-hydroxybutyrate)-Co-(3-hydroxyvalérate) (PHBV) La récupération du biopolymère est essentielle pour évaluer le succès du bioprocédé. Selon les paramètres de cette étude, les quantités les plus élevées de PHA ont été détectées à 16 h et 24 h, avec des valeurs de 10,8 mg et 10,3 mg, respectivement (Figure 2), et 24 h, avec des valeurs de 10,8 mg et 10,3 mg, respectivement (Figure 2).

La performance optimale de *B. megaterium* LVN01 dans le digestat s'est produite à 16 h, avec un rendement en PHB de 2,7 g de PHB g cell⁻¹ (270 %) et un DCW de 0,133 g L⁻¹ (Figure 3). Les valeurs maximales de DCW = 0,563 g L⁻¹, atteintes à 60 h dans le processus de fermentation de *B. megaterium* avec digestat (Figure 3), contrastent avec le rendement de production maximal de PHA (360 mg PHBV L⁻¹) observé à 16 h. du processus. Une tendance inverse peut être observée entre la production de biomasse et la production de PHBV (Figure 4).

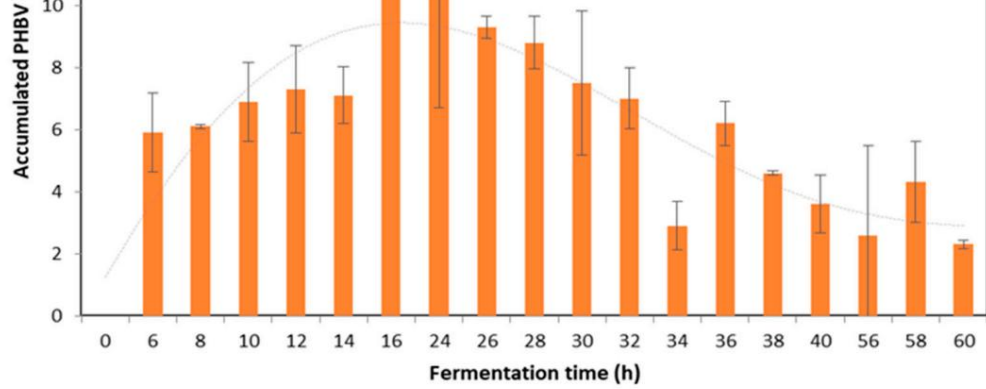


Figure 2. PHBV accumulé par *B. megaterium* LVN01 à l'aide du digestat de biogaz en fonction de la Figure 2. PHBV accumulé par *B. megaterium* LVN01 à l'aide du digestat de biogaz en fonction du temps de fermentation exprimé en heures (h). (V : 3 L ; t : 60 h, 400 tr/min ; T : 30,8 °C, pH 7,0). Les pointillés montrent la tendance à l'accumulation du PHBV pendant la fermentation. La ligne montre la tendance à l'accumulation du PHBV pendant la fermentation.

Figure 1 is a dual-axis line graph showing the relationship between PHBV content and DCW over a 60-hour fermentation period. The x-axis represents Fermentation time (h) from 0 to 70. The left y-axis represents PHBV Content (%) from 0 to 400. The right y-axis represents DCW (g L^{-1}) from 0 to 4. The PHBV content (red dotted line with circles) starts at 0% at 0 hours, rises to a peak of approximately 270% at 16 hours, and then gradually decreases to about 10% by 60 hours. The DCW (green dotted line with diamonds) starts at 0 g L^{-1} at 0 hours, remains low (below 0.1 g L^{-1}) until 40 hours, and then increases to approximately 0.3 g L^{-1} by 60 hours.

Fermentation time (h)	PHBV content (%)	DCW (g L^{-1})
0	0	0.00
6	100	0.05
12	95	0.05
16	270	0.05
24	245	0.02
28	170	0.05
32	135	0.05
36	90	0.05
40	45	0.05
56	20	0.15
60	10	0.30

10

A scatter plot showing the relationship between Recovered PHBV (mg) on the x-axis and DW (mg) on the y-axis. The x-axis ranges from 0 to 12, and the y-axis ranges from 4 to 18. Six data points are plotted, showing a negative correlation. A linear regression line is drawn through the points.

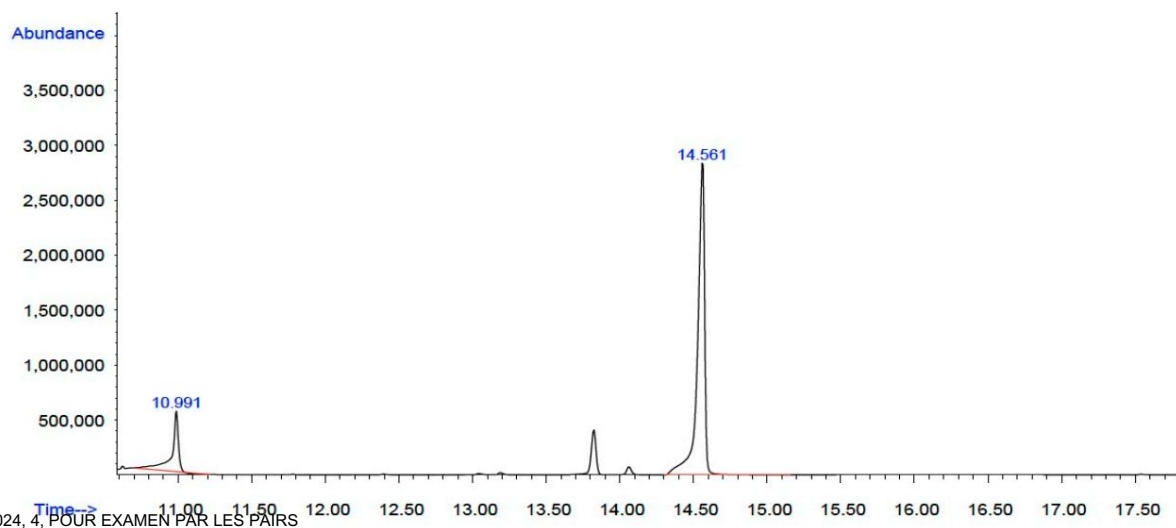
Recovered PHBV (mg)	DW (mg)
2.3	16.8
2.6	11.2
3.6	8.1
5.9	5.6
7.5	8.7
10.3	8.0

3.3.2. RMN par Résonance Manétique Nucléaire

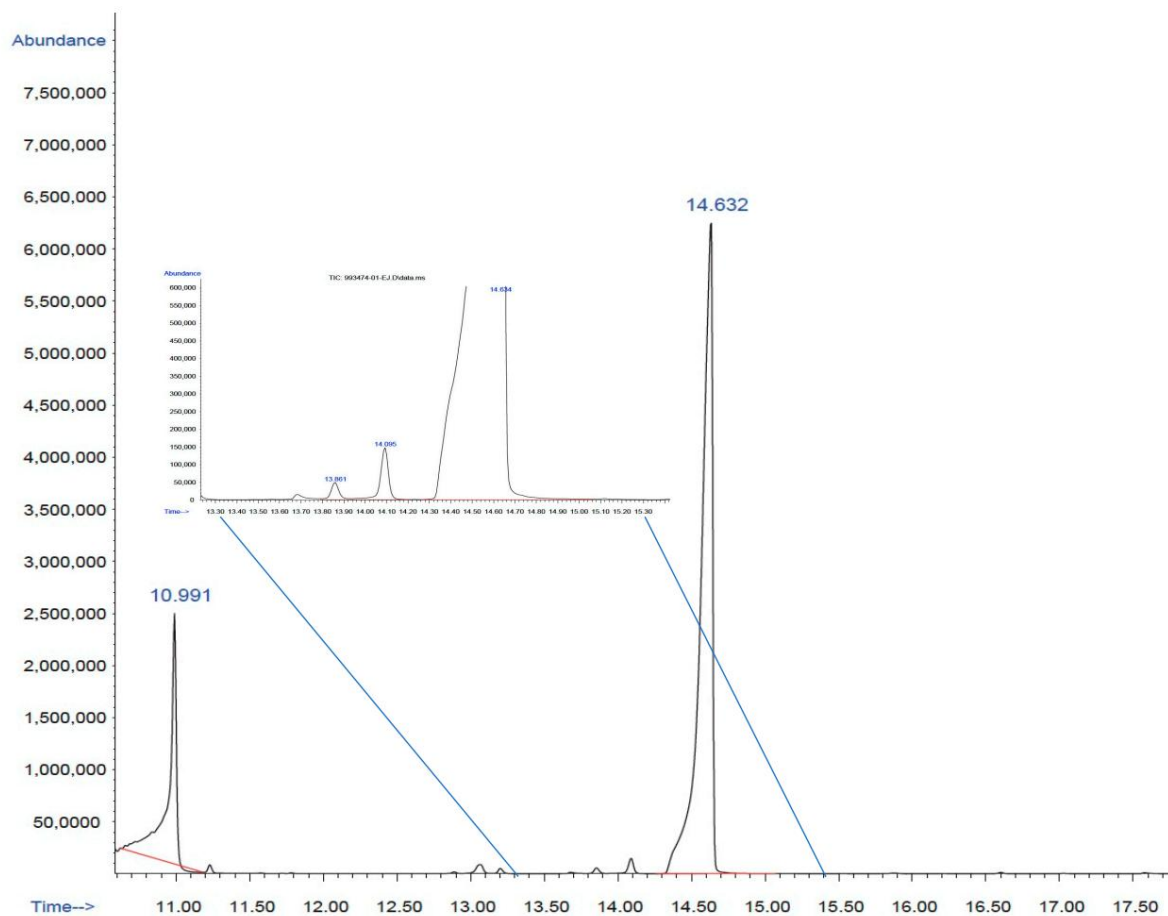
3.3.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Appl. Microbiol. 2024, 4

Pour reconfirmer la structure chimique du PHA déduite de l'analyse GC – MS, la spectroscopie RMN (RMN 1H et RMN 13C) a été utilisée. Les résultats de l'analyse ont montré le copolymère, poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), constitué des monomères 3HB et 3HV¹⁰⁶⁶ (Figure 6), ce qui est en plein accord avec les résultats de l'analyse GC – MS.



(UN)



(B)

Figure 5. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) : (A) chromatogramme du produit commercial poly(acide 3-hydroxybutyrique- acide co-3-hydroxyvalérique) (Pièce N° 403121, Sigma-Aldrich, polymère commercial poly(acide 3-hydroxybutyrique-acide co-3-hydroxyvalérique) (Pièce N° 403121, Sigma-Aldrich, Lot : Lot : MKBL7384V) ; (B) chromatogramme du copolymère biosynthétisé par *B. megaterium* LVN01 MKBL7384V) ; (B) chromatogramme du copolymère biosynthétisé par *B. megaterium* LVN01 à partir du digestat de biogaz. L'agrandissement montre les valeurs des trois pics, de gauche à droite : 13.861 ; 14.095 et 14.634.

De plus, un autre pic est observé à 10,991 min, qui représente l' étalon interne utilisé dans l'analyse, à savoir l'ester d'acide benzoïque. La présence de cet étalon interne est indispensable pour garantir la précision de la quantification et la cohérence des résultats.

3.3.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Pour reconfirmer la structure chimique du PHA déduite de l'analyse GC-MS, Figure 5. Chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse (GC-MS) : (A) le chromatogramme de la spectroscopie RMN commerciale (¹H-RMN et ¹³C-RMN) a été utilisé. Les résultats de l'analyse ont montré que le polymère poly(acide 3-hydroxybutyrique-co-acide 3-hydroxyvalérique) (PAB 403 121 Sigma-Aldrich, copolymère, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV) était constitué par le Lot : MKBL7384V (BP chromatogramme du copolymère biosynthétisé par B. megaterium L'VNO1 les monomères 3HB et 3HV (Figure 6) qui est en plein accord avec les résultats du digestat de biojazz. L'agrandissement montre les valeurs des trois pics, de gauche à droite : analyse GC-MS : 13.581, 14.039 et 14.634.

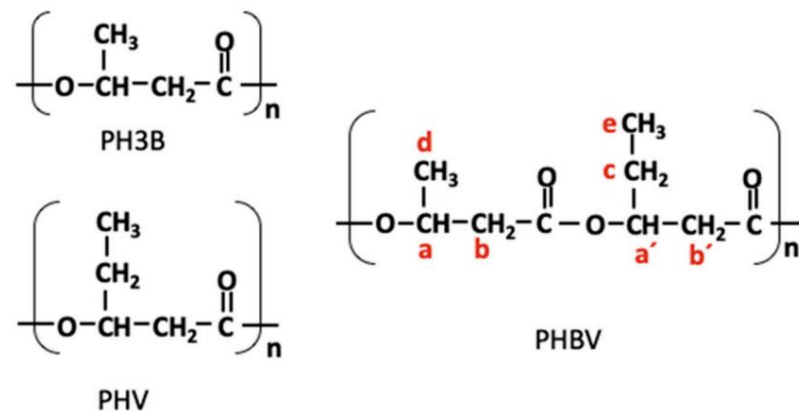


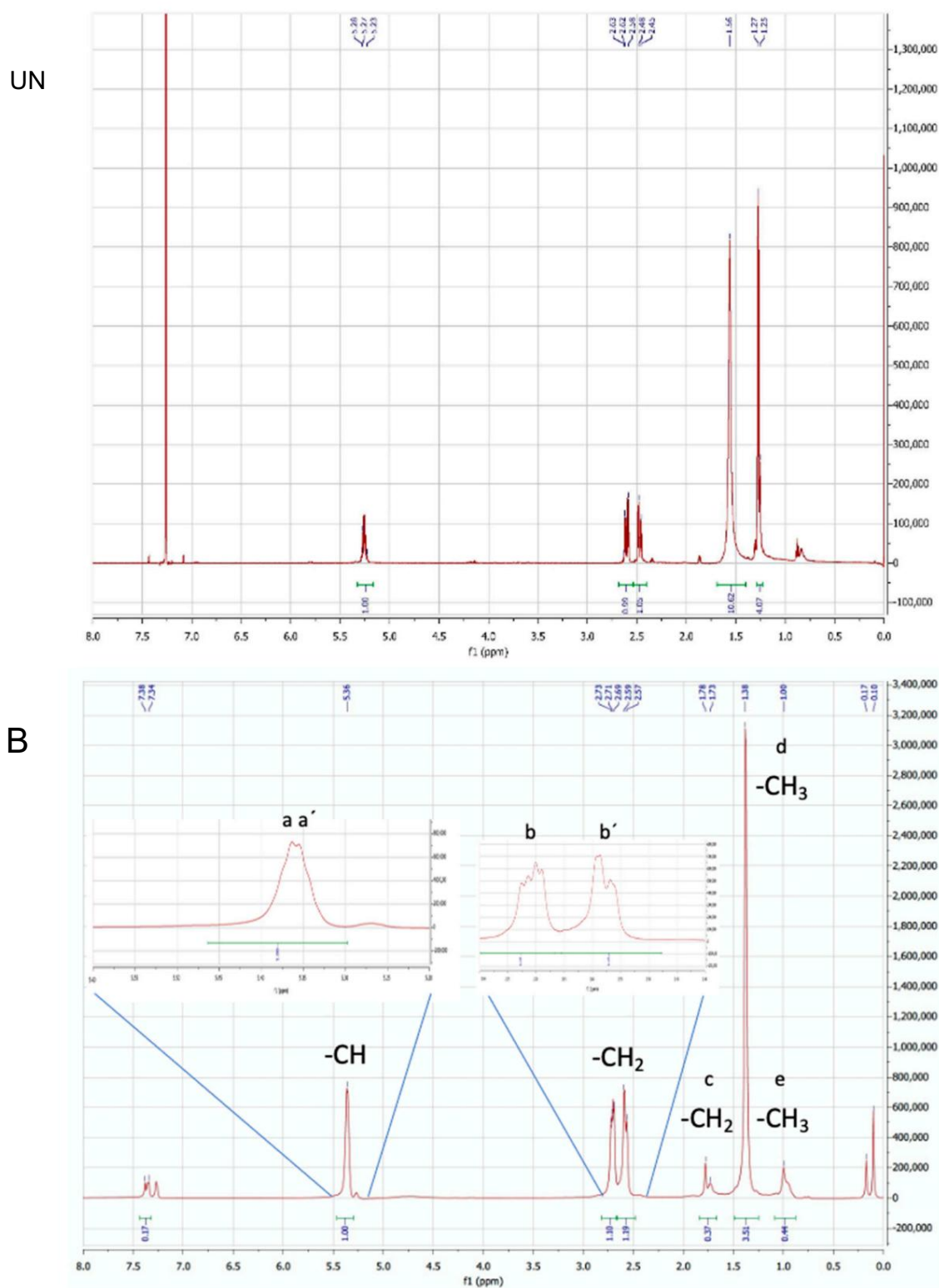
Figure 6. Structure chimique du copolymère PHBV. PH3B : poly(acide 3-hydroxybutyrique) ; PHV : poly (acide 3-hydroxyvalérique) ; Figure 6. Structure chimique du copolymère PHBV. PH3B : poly(acide 3-hydroxybutyrique) ; PHV : poly(acide 3-hydroxyvalérique) ; PHBV : poly(acide 3-hydroxybutyrique-co-acide 3-hydroxyvalérique) ; n : répétition d'unités monomères ; a' : CH₂ ; b' : CH₂ ; c' : 3-hydroxyvalérique) ; PHBV : poly(acide 3-hydroxybutyrique-co-acide 3-hydroxyvalérique) ; n : répétition d'unités monomères ; a' : CH₂ ; b' : CH₂ ; c' : CH₂ ; d : CH₃ ; e : CH₃ ; a' : CH₂ ; b' : CH₂.

Le spectre 1H-RMN (Figure 7) a montré des signaux caractéristiques du composé PHBV (Tableau 1). Certains déplacements sont typiques des deux monomères (3HB et 3HV). Cependant, celles qui marquent la différence entre les deux sous-unités apparaissent à δ 1,73–1,78 ppm, δ 1,38 ppm et δ 1,00 ppm.

Tableau 1. Caractérisation des protons ^1H -RMN.

	Type de proton	Déplacement chimique δ (ppm)
a et un	Méthine (-CH-) dans le PHV et le PHB	5.356 et 5.363
b et B	Méthylène (-CH ₂) dans PHV et PHB	2,59-2,57 et 2,69-2,73
c	Méthylène (-CH ₂) dans le PHV	1,73-1,78
d	Méthyle (-CH ₃) dans le PHB	1,38
e	Méthyle (-CH ₃) dans le PHV	1h00

Le spectre RMN 13C (Figure 8) montre les déplacements chimiques des signaux correspondant aux différents types d'atomes de carbone présents dans la structure du biopolymère obtenu par fermentation de *B. megaterium* LVN01. En comparant ces signaux (C=O δ 169,18 ppm ; CH δ 67,63 ppm ; CH₂ δ 40,80 ppm ; et CH₃ δ 19,77 ppm) avec ceux du spectre commercial du PHBV et ceux rapportés par d'autres auteurs pour le PHB [24,33], il On peut en déduire que *B. megaterium* LVN01 accumule principalement du PHB, ce qui a des implications significatives dans diverses applications biotechnologiques et environnementales.

[illegible]

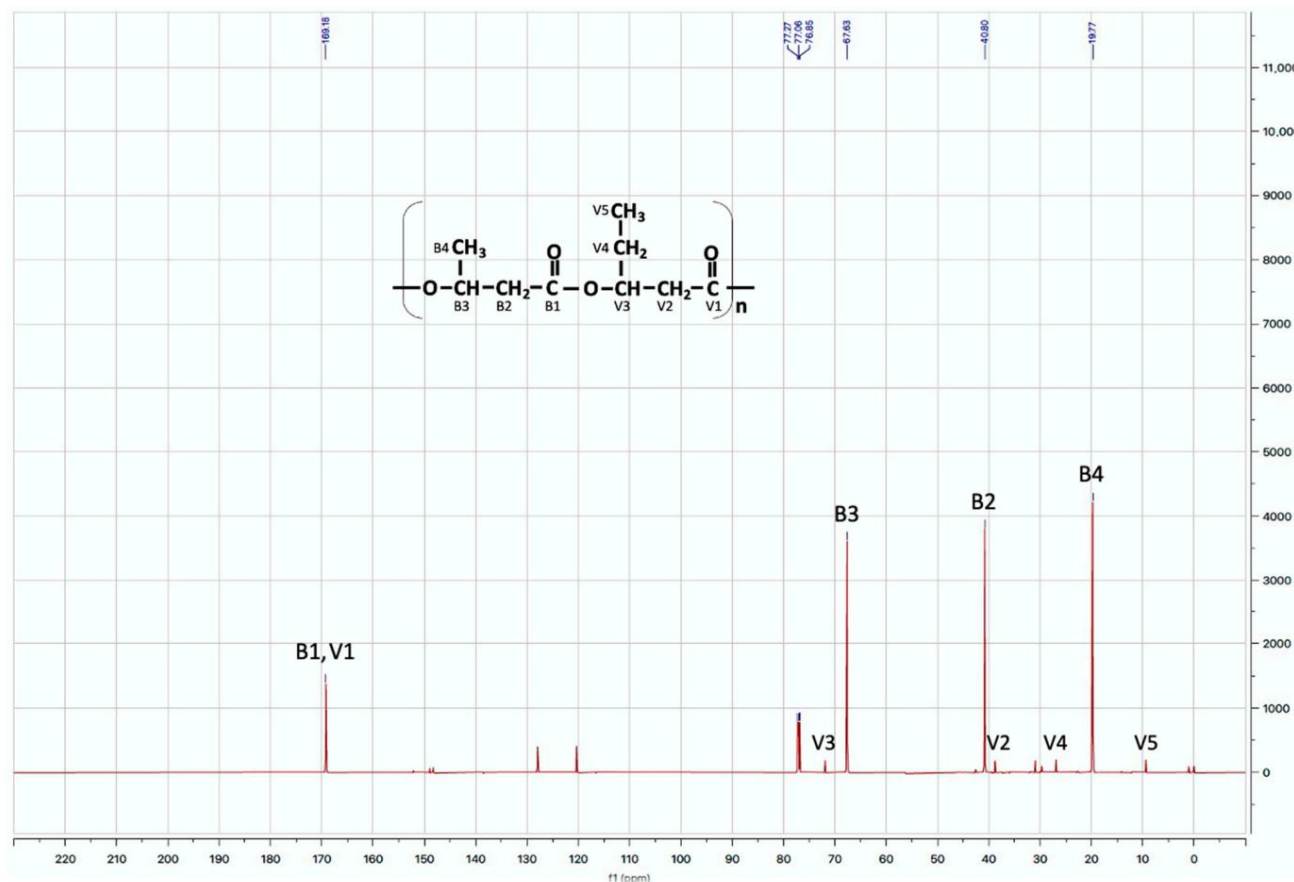


Figure 8. Spectre ^{13}C -RMN, correspondant à l'échantillon PHBV synthétisé par *B. megaterium* LVN01 dans un digestat liquide.

3.4. Détermination des propriétés thermiques

Les propriétés thermiques du PHBV produit par *B. megaterium* ont été analysées par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et analyse thermogravimétrique (TGA) sous une atmosphère d'azote A.

La stabilité thermique du biopolymère obtenu a été déterminée par analyse thermogravimétrique. Sur la base des courbes thermogravimétriques (TG) et dérivées (DTG) (Figure 9), on en déduit que le PHBV obtenu présente une seule étape de décomposition dans le cadre d'un processus continu et uniforme. Le profil de la courbe TG (Figure 9A) indique qu'il s'agit d'un copolymère thermiquement stable dans la plage de température de 35,0 à 254,540 °C, atteignant un Td 1 % de 266,2 °C (la température à laquelle se produit une perte de poids de 1 %) à 23,58 minutes. Elle continue avec des pertes de masse mineures au fil du temps, jusqu'à atteindre un Td 10 % de 280,9 °C ($t = 25,08$ min). Par la suite, le matériau commence à se dégrader, avec une température de décomposition initiale Td (Tonset) de 283,1 °C et une température de décomposition finale (Tendset) de 296,98 °C. Dans cette plage de température, et en seulement 2 min, le composé perd environ 72 % de son poids, avec une Td maximale de 290,114 °C, à laquelle le taux de décomposition maximal est atteint (Figure 9B). Dans le Tendset, une perte de poids de 86 % est observée et environ 90 % de la masse est perdue dans la plage de température de 253,376 °C à 308,084 °C.

B

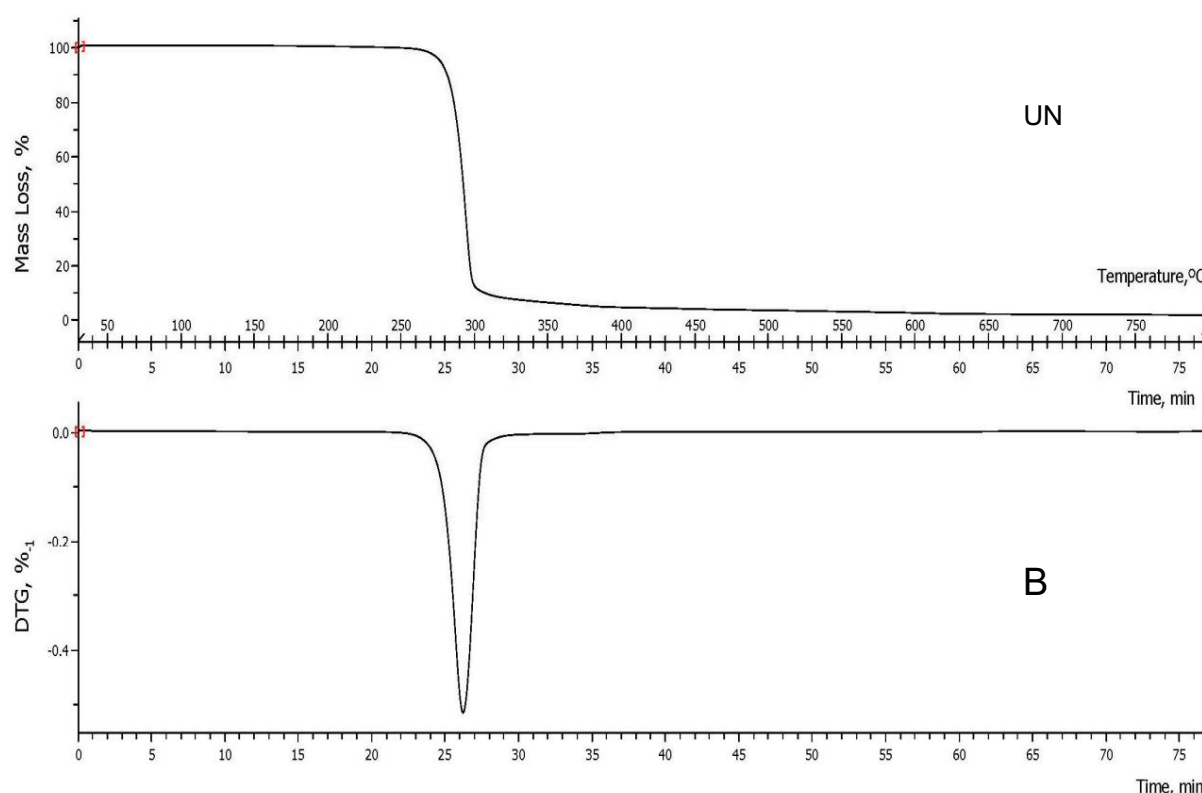


Figure 9. Courbes du thermogramme (TG) (A) et de son dérivé (DTG) (B) de l'échantillon PHBV synthétisé par *B. megaterium* LVN01 à partir du digestat de biogaz.

En comparant ces résultats avec ceux de Gómez et al. (2020), qui ont rapporté une T_d de 266,2 °C et une perte de poids de 97,7 % dans la plage de température de 230 °C à 300 °C pour le PHB synthétisé par *B. megaterium* en utilisant le glycérol résiduel comme substrat [24], il peut On peut conclure que *B. megaterium* ajuste sa batterie biochimique pour métaboliser le digestat de biogaz, produisant un PHA avec de meilleures propriétés physiques que celui synthétisé par les bactéries lors de l'utilisation du glycérol résiduel. Dans ce contexte, la stabilité thermique du matériau est particulièrement importante, car elle est associée au T_d , aux PHA ayant de faibles températures de fusion et/ou à des valeurs de stabilité thermique plus élevées qui sont plus souhaitables [34]. La différence marquée entre les valeurs de T_d enregistrées pour le PHA synthétisé par le mégagaterium B par rapport au digestat de biogaz ($T_d = 290,114$ °C) et au glycérol résiduel ($T_d = 266,2$ °C) permet de déduire la présence de deux structures chimiques différentes, qui complète les résultats de GC – MS et RMN.

Dans tous les cas, la T_d (290,114 °C) du PHBV étudié est supérieure aux valeurs maximales de T_d rapportées dans la littérature pour le PHB : 220 °C [34], 252 °C [35] et 280 °C [36], entre autres. En revanche, bien qu'elles soient dépassées, elle est plus proche des valeurs T_d rapportées pour le PHBV : 279,236 °C [34], 285,9 °C [37] et 286 °C [37], entre autres.

L'analyse DSC du biopolymère synthétisé par *B. megaterium* LVN01 à partir du digestat de biogaz a révélé trois événements thermiques exothermiques (Figure 10). Les deux plus significatifs ont des températures de fusion de $T_{m1} = 143,01$ °C et $T_{m2} = 155,7$ °C et des enthalpies de fusion de $(\Delta H_f) = 1,541$ J g⁻¹ et $(\Delta H_f) = 19,80$ J g⁻¹. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études ; par exemple, Abbasi et al. [38] ont obtenu le PHBV via la fermentation du fumier de laiterie avec des consortiums microbiens mixtes (MMC), avec des teneurs en 3HV comprises entre 16 % et 24 %, et ont rapporté qu'une partie du PHBV extrait présentait deux températures de fusion (T_m) ; le T_{m1} le plus bas variait entre 126,1 °C et 159,7 °C, et le T_{m2} le plus élevé variait entre 152,1 °C et 170,1 °C.

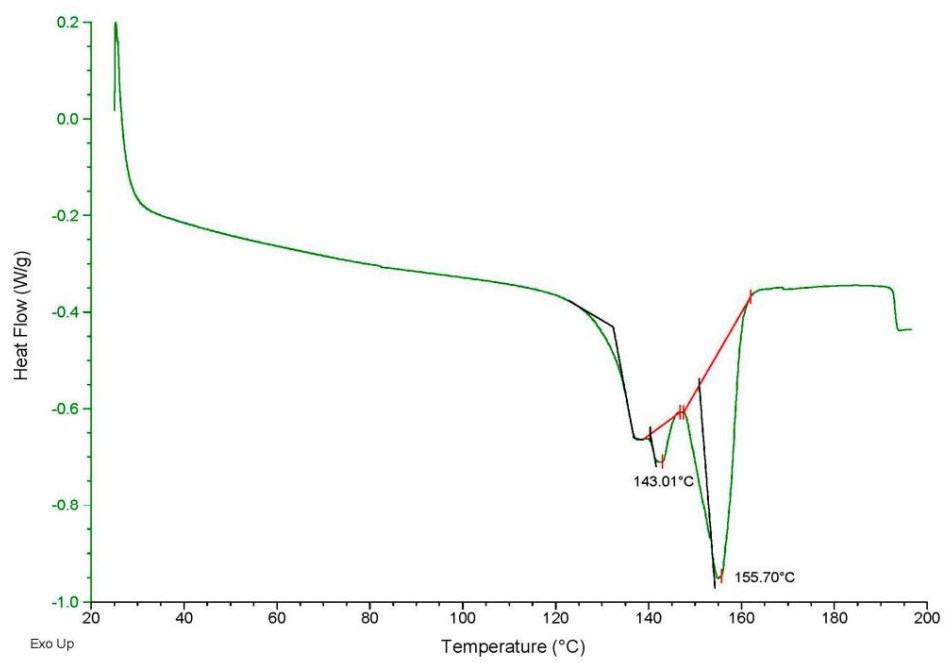


Figure 10. Thermogramme DSC de l'échantillon PHBV synthétisé par *B. megaterium* LVN01 à partir du digestat de biogaz (courbe verte). La ligne rouge montre les changements de température entre chaque événement thermique. La ligne noire correspond à la transition vitreuse.

Les auteurs Abbasi et al. [39] indiquent que la présence de phénomènes d'isomorphisme peut conduire à la présence de deux pics de fusion [38–40]. Comme le PHBV a une structure semi-cristalline, les cristaux avec une teneur plus élevée en HV auront un rapport de phase amorphe plus élevé et fondront donc en premier lors du chauffage (Tm1). Dans les cristaux à faible teneur en HV, le rapport de cristallinité est plus élevé, donc les cristaux fondront à une température plus élevée (Tm2) [39,41]

Le degré de cristallinité Xcr (%) a été calculé à partir des valeurs enregistrées dans le courbe calorimétrique (DSC) utilisant l'équation :

$$Xcr(\%) = 100 \times \frac{\Delta H f}{\Delta H f^{\circ}}$$

où:

$\Delta H f$: Enthalpie de fusion du PHB produit par *B. megaterium* LVN01 ;

$\Delta H f^{\circ}$: Enthalpie de fusion du PHB pur, équivalente à 109 J g⁻¹ [42].

Les calculs associés à l'événement le plus significatif ont montré un Xcr = 18,17% pour le PHBV obtenu selon les paramètres opérationnels de cette recherche, inférieur à celui obtenu pour le biopolymère (PHB) synthétisé par la même espèce (*B. megaterium* LVN01) à partir de glycérol résiduel, atteignant Xcr = 35,7 % [24]. D'autres auteurs ont rapporté des valeurs Xcr pour le PHB comprises entre 30 et 60 % [43-45].

4. Discussion

Maximiser la production de biopolymères de type PHA grâce à la biofermentation microbienne de différents substrats est devenu un domaine de recherche crucial face aux demande croissante d'alternatives durables pour la production de plastiques. Cette bioindustrie recherche des procédés respectueux de l'environnement et économiquement viables, capables de concurrencer l'industrie des plastiques dérivés du pétrole [46]. Le principal problème associé à l'élimination commerciale des bioplastiques réside dans les coûts de production élevés, auxquels les matières premières contribuent de manière significative [20,46-48]. Dans ce contexte, les chercheurs se sont tournés vers la recherche de substrats économiques et durables, notamment la biomasse résiduelle, qui rendent viable un processus industriel.

Dans cette recherche, tirer parti de la capacité de *B. megaterium* LVN01 à métaboliser différents substrats par différentes voies [12, 24, 49-52] a été considéré comme important dans l'évaluation du digestat de biogaz, un sous-produit de la digestion anaérobie des déchets de la pêche artisanale. Cela n'a pas été exploré auparavant; ou, du moins, cela n'a pas encore été rapporté dans le même sens que dans cette recherche.

Nos résultats démontrent que le digestat de biogaz, substrat d'origine résiduelle riche en acides gras volatils, est un excellent substrat pour la croissance de *B. megaterium* et la production de bioplastiques de type PHA. La dynamique de croissance cellulaire (Figure 1), dans les conditions opératoires de ces travaux, montre l'avantage du digestat de biogaz par rapport au glycérol résiduel, autre substrat évalué dans des conditions similaires. Comme cela a été observé, la phase adaptative de *B. megaterium* (LVN01) dans le digestat dure 40 h, soit presque le double du temps rapporté (24 h) pour la même souche microbienne dans le glycérol résiduel [50]. Généralement, une fois la phase stationnaire tardive ou la phase exponentielle atteinte, le métabolisme microbien de *B. megaterium* commence à accumuler du PHA [53]. Cependant, la réponse d'accumulation peut varier en fonction du type de substrat [54]; lorsque le substrat est un digestat, l'efficacité de l'accumulation du PHBV augmente (360 mg de PHBV L⁻¹ en 16 h) dans les phases antérieures. Ceci peut être attribué aux conditions de stress auxquelles il est soumis [54], sachant que le digestat est un substrat assez complexe. La performance optimale de *B. megaterium* (LVN01) dans le digestat s'est produite à 16 h. En revanche, Gómez et al. ont montré que *B. megaterium* (LVN01) dans le glycérol résiduel a besoin de 48 h pour atteindre un rendement de 137,5 g de PHB L⁻¹ avec un DCW de 58,1 mg de PHB gcell⁻¹; passé ce délai, ces paramètres diminuent drastiquement [49].

Il a été souligné que dans le digestat, les valeurs DCW sont plus élevées et que les cellules bactériennes accumulent une plus grande quantité de PHBV par gramme de biomasse sur de courtes périodes de temps. L'excellente capacité de stockage du biopolymère est particulièrement évidente après les premières 24 heures d'incubation et reste à des niveaux relativement élevés jusqu'à 32 heures (Figure 2). En accord avec ce qui a été rapporté par d'autres auteurs, on en déduit que la première étape de la fermentation est une période d'adaptation initiale au cours de laquelle les bactéries se multiplient et augmentent leur biomasse avant de commencer à synthétiser et à accumuler efficacement le PHA [53,55-57].

Les résultats soutiennent l'idée selon laquelle la cinétique microbienne est fortement influencée par la nature chimique de la source de carbone. Contrairement au glycérol résiduel, le digestat est un mélange complexe de composés organiques qui comprend des acides gras et d'autres sous-produits de la digestion anaérobie des matières organiques. Cette complexité pourrait signifier que *B. megaterium* (LVN01) a besoin de plus de temps pour s'adapter au milieu et assimiler les nutriments disponibles pour croître efficacement, expliquant ainsi sa cinétique de croissance prolongée. De plus, dans les premiers stades de la fermentation, une croissance bactérienne rapide (DCW plus élevé) est observée avant que les bactéries ne donnent la priorité à la synthèse du PHBV. Cette relation inverse (Figure 4) entre la biomasse et la production de PHB suit la tendance rapportée par d'autres auteurs pour *B. megaterium* provenant d'autres substrats [11,24,50,58].

En conclusion, la phase de latence (phase adaptative) joue un rôle crucial dans la fermentation, étant importante pour que le micro-organisme active son métabolisme et tire le meilleur parti des nutriments présents dans le milieu de culture. Dans des substrats complexes tels que le digestat, *B. megaterium* nécessite de longs temps d'acclimatation avant d'atteindre une croissance optimale, alors qu'il peut se multiplier rapidement dans des substrats simples. Ces informations sont essentielles à la conception et à l'optimisation des processus de fermentation puisque le temps d'adaptation microbienne par rapport au substrat peut affecter de manière significative la productivité et l'efficacité du processus [21]. Dans cette recherche, *B. megaterium* a pu synthétiser et accumuler du PHBV pendant les premières heures du bioprocédé (16 h à 32 h), en utilisant le digestat de biogaz comme source de carbone, ce qui est prometteur pour une production industrielle efficace. Parallèlement, cela pourrait réduire la dépendance au pétrole, une ressource non renouvelable, et à des sources de carbone coûteuses et moins durables telles que les cultures agricoles [59-63].

La caractérisation chimique du biopolymère synthétisé par *B. megaterium* à partir du digestat de biogaz a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur sélectif de masse (GC – MS) et spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN 1H et RMN 13C).

Les résultats obtenus dans cette recherche démontrent la capacité de *B. megaterium* à produire du PHBV à partir de différents substrats grâce à des processus de fermentation. Le chromatogramme (GC-MS) de l'extrait polymère (Figure 5) a été comparé à celui du standard PHBV commercial. Dans les deux cas, deux pics principaux ont été observés avec des temps de rétention (RT) de 10,9 min et 14,6 min, identifiés via la base de données GC-MS comme étant respectivement l'ester méthylique de l'acide 2-buténoïque et l'ester méthylique de l'acide 3-hydroxybutyrique, qui sont caractéristique du 3HB monomère.

Le pic d'intensité plus faible apparu à 14,1 min est attribué à l'ester méthylique de l'acide 2-pentanoïque, typique du monomère 3HV, identifié par le système de données de l'équipe avec une qualité de 97 % (Figure S6). Ceux-ci sont formés par méthanolyse du 3HB, donnant des esters en C4, et du 3HV, donnant des esters en C4 et C5 [33]. Les acides 2-buténoïque, 3-hydroxybutyrique et 2-pentanoïque sont également des sous-produits de la dégradation thermique du PHBV [64]. Les informations obtenues par GC-MS confirment la présence prédominante d'acide polyhydroxybutyrique et, dans des proportions plus faibles, d'acide polyhydroxyvalérique dans les extraits de *B. megaterium*.

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire nous a permis d'élucider la structure chimique du biopolymère synthétisé par *B. megaterium* LVN01 sous fermentation aérobie de type discontinu avec digestat de biogaz source de carbone. Les spectres RMN 1H (Figure 7) et RMN 13C (Figure 8) de l'échantillon de PHBV purifié et de l'étalon pur étaient similaires, montrant sept signaux typiques du copolymère poly (3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalérate) entre 0,75 ppm et 5,50 ppm, qui sont associés aux déplacements chimiques (δ) des sous-unités 3HB (3-hydroxybutyrate) et 3HV (3-hydroxyvalérate) du copolymère PHBV.

Les signaux H-RMN détectent la présence de groupes fonctionnels caractéristiques des deux fractions monomères (3HB et 3HV), soit $\delta = 5,356\text{--}5,363$ ppm (a et a'), concernant les protons du groupe méthine (-CH), et $\delta = 2,57\text{--}2,59$ ppm et $\delta = 2,69\text{--}2,73$ ppm (b et b'), correspondant aux protons du groupe méthylène (CH₂). En particulier, la sous-unité 3HB présente un $\delta = 1,25$ à $1,26$ ppm, appartenant au groupe méthyle (CH₃) (c). D'autre part, 3HV donne lieu à des décalages à $\delta = 1,73\text{--}1,78$ ppm (d) et $\delta = 1,0$ ppm (e), qui nous permettent de déduire la résonance des protons méthylène (d) et méthyle (e) dans le chaîne latérale (éthyle).

Ces derniers déplacements marquent la différence entre les monomères (HV et HB) et confirment la présence du PHBV. Les résultats de cette recherche coïncident avec ceux rapportés par d'autres auteurs pour le copolymère PHBV [39,65–70].

Les résultats de l'analyse RMN 13C sont cohérents avec ceux de RMN 1H (Figure 7). Le spectre RMN 13C présente des signaux identifiant les atomes de carbone non équivalents dans chaque monomère. Pour HB, des déplacements de carbone ont été observés à 19,65 ppm, 40,68 ppm et 67,52 ppm, correspondant respectivement aux groupes méthyle (-CH₃), méthylène (-CH₂-) et ester (-O-CH-). En particulier pour HV, les signaux des deux groupes méthylène (-CH₂-) ont été observés à 26,74 ppm et 30,82 ppm. Dans ce monomère, le pic correspondant au groupe ester (-O-CH-) s'est déplacé à 71,90 ppm. Enfin, une résonance de 169,14 ppm des atomes de carbone du groupe carbonyle (-C-) est présentée pour les deux monomères (3-HB et 3-HV). Ces données coïncident avec celles rapportées par d'autres chercheurs [38,39,56,69] et permettent de déterminer la présence du copolymère PHBV dans l'extrait polymérique de *B. megaterium*.

La caractérisation chimique du biopolymère de *B. megaterium* est cohérente avec les caractéristiques dérivées de l'analyse des propriétés thermiques du biopolymère par TGA (Figure 9) et DSC (Figure 10). Les valeurs des propriétés thermiques ($T_m = 153$ °C et $T_d = 290,14$ °C) du PHBV produit par *B. megaterium* à partir du digestat de biogaz se situent dans la plage des valeurs mesurées par Wang et al. [71], qui ont analysé trois PHA synthétisés par *Ralstonia eutropha* à partir de l'acide lévulinique. Les chercheurs ont trouvé des températures de fusion (T_m) de 101,93 °C, 150,18 °C et 172,05 °C, ainsi que des températures de décomposition thermique (T_d) de 284,4 °C, 298,3 °C et 263,4 °C, pour le PHB à 0 %, 0,16 % et 53 % HV. Cependant, le pourcentage de cristallinité (% Xcr) = 18 du PHBV étudié différait nettement de ceux rapportés pour le PHB avec 0 % (% Xcr = 61,44%), 0,16 % (% Xcr = 50,34%), et HV 53 % (% Xcr = 51,92 %). Néanmoins, concernant ce paramètre, les résultats de cette recherche sont également comparables à ceux d'Abbasi et al., qui, pour une série de PHBV produits par fermentation, ont rapporté des valeurs Xcr via DSC comprises entre 16,6 % et 29 % [39]. Dans

Selon leurs recherches, le PHBV avec la plus faible teneur en 3HV (0,16) a enregistré le Xcr le plus élevé (29 %). À partir de leur étude, Abbasi et al. [39] et d'autres chercheurs [71] ont conclu que le degré de cristallinité et le point de fusion du biopolymère diminuent avec la teneur en HV du polymère, entraînant potentiellement une amélioration de la ductilité et de la flexibilité du polymère.

Le biopolymère produit dans cette recherche présente des propriétés thermodynamiques qui le différencient de la structure PHB et le rapprochent de la lignée PHBV. Dans ce contexte, il est pertinent de noter que selon la littérature, lorsqu'un copolymère tel que le PHBV est produit, il a un point de fusion plus bas et une plus grande flexibilité par rapport à l'homopolymère PHB [72]. La cristallinité plus faible et le point de fusion plus faible du PHBV de *B. megaterium* suggèrent un pourcentage appréciable de HV avec un ordre structurel plus flexible.

Cela concorde avec la caractérisation des biopolymères à chaîne courte, connus pour avoir une cristallinité et des points de fusion plus faibles, les classant comme élastomères et leur conférant une capacité d'allongement à la rupture supérieure à 100 % [73,74].

Dans cette étude, *B. megaterium* LVN01 a démontré sa capacité efficace à produire du PHBV à partir du digestat de biogaz, un substrat riche en acides gras volatils, en seulement 16 à 24 heures de fermentation. Ceci est prometteur pour la production industrielle de biopolymères puisque le PHBV possède non seulement des caractéristiques physiques appropriées pour une utilisation dans différents domaines industriels, mais possède également un degré élevé de biodégradabilité, ce qui le rend très attractif dans l'industrie pharmaceutique des biopolymères.

Les caractéristiques physiques du PHBV de *B. megaterium* sont intrinsèquement liées aux propriétés de biodégradation et à la facilité de décomposition des PHA. Ces processus de dégradation sont influencés par la composition chimique spécifique du polymère et les conditions environnementales environnantes. Il a été rapporté que la dégradation des objets fabriqués à partir de PHA varie considérablement, de quelques mois dans des sols à températures stables à quelques années dans des environnements marins. Il est à noter que certains types de PHA, comme le poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate), sont notamment affectés dans leur cristallinité, ce qui module leurs taux de dégradation [75].

Le potentiel du procédé de fermentation aérobie avec le système *B. megaterium* utilisant du digestat de biogaz est renforcé par l'utilisation d'un substrat économique pour la production de biopolymères de type PHA, notamment le PHBV. Les principaux avantages de l'utilisation du digestat résident dans sa disponibilité et son faible coût, étant donné qu'il s'agit d'un coproduit du processus de production de biogaz à partir de la biomasse résiduelle de l'industrie de la pêche artisanale de Tumaco, en Colombie. À l'avantage économique s'ajoutent des impacts environnementaux et sociaux positifs : d'une part, les digestats représentent des alternatives aux plastiques dérivés du pétrole, qui génèrent une pollution importante lors de leur fabrication et consomment une ressource non renouvelable ; Deuxièmement, les déchets de pêche (viscères de poisson) sont utilisés pour produire du biogaz, puis, à partir des effluents résiduels (digestat riche en acides gras volatils), des biopolymères de type PHA sont produits. Grâce à cette approche, la pollution due aux déchets de pêche, souvent rejetés à la mer, est évitée. Tout cela est réalisé dans un environnement de bioraffinerie, contribuant à augmenter la valeur ajoutée de la chaîne de production de la pêche artisanale dans les communautés vivant dans des conditions vulnérables, ainsi que la bioéconomie circulaire de la production de biogaz.

Concernant la durabilité du substrat, il est important de mentionner que la pêche artisanale dans le Pacifique colombien génère une quantité abondante de déchets, représentant une source précieuse de matière organique renouvelable pour la production efficace de PHBV par fermentation avec *B. megaterium*. Ainsi, le coût des matières premières pour la production à grande échelle de PHBV pourrait être considérablement réduit, avec des effets importants en termes d'économie et de durabilité environnementale.

5. Conclusions

Le digestat liquide, sous-produit de la production de biogaz par digestion anaérobie de la biomasse résiduelle de l'industrie de la pêche artisanale, est un substrat secondaire renouvelable adapté à la culture de la bactérie indigène colombienne *B. megaterium* LVN01 et

synthétiser des biopolymères de type PHA, notamment le copolymère poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV).

Dans les conditions opérationnelles de cette recherche, le système de digestat de *B. megaterium* produit des quantités appréciables de PHBV en seulement 16 h, avec des productivités en PHBV de 360 mg/L·h, ce qui ajoute une valeur supplémentaire aux résidus de pêche (viscères de poisson). Dans le cadre de l'économie circulaire, cela pourrait renforcer la bioindustrie du biogaz et apporter une valeur ajoutée à la chaîne de production de la pêche artisanale en Colombie. Les analyses réalisées sur le copolymère PHBV démontrent qu'il s'agit d'un polymère thermostable et flexible. Combiné à sa nature biodégradable, cela suggère son utilité potentielle dans une grande variété d'applications industrielles. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour définir les pourcentages de participation du monomère HV dans la structure polymère du PHBV, ainsi que des recherches complémentaires pour établir des opérations optimales de bioprocédés.

Documents supplémentaires : Les informations complémentaires suivantes peuvent être téléchargées sur <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applmicrobiol4030072/s1> : Figure S1 : Coloration de Gram de *Bacillus megaterium* incubé dans un bouillon Luria Bertani pendant 24 h ; Figure S2 : Observation de spores colorées provenant d'échantillons de *Bacillus megaterium* de type sauvage cultivés sur de la gélose nutritive dans des conditions de stress (44 °C) à un grossissement de 100 × ; Figure S3 : Observation au microscope à fluorescence ($\lambda = 510\text{--}560\text{ nm}$) de la croissance de *Bacillus megaterium* de type sauvage adapté au digestat du réservoir homogène de l'usine de biogaz de Tumaco. UN. Croissance sur gélose rouge du Nil *B. megaterium* au bleu du Nil ; Figure S4 : Expériences à l'échelle du laboratoire pour la croissance de *B. megaterium* dans le digestat dans les conditions suivantes : pH 7,0, température : 30,8 °C, agitation 200 tr/min et trois digestats : conditions de rapport MMS 100 : 0, 80 : 20, 50 : 50 ; Figure S5 : Courbe de croissance à l'échelle du laboratoire de *B. megaterium* LVN01 dans un digestat de biogaz, conditions opérationnelles : 10 mL, 200 tr/min, 30,8 °C, pH 7,0 ; Figure S6 : Spectre de masse du courant ionique reconstitué pour le PHBV obtenu à partir de la fermentation de *Bacillus megaterium* LVN01 dans le digestat ; Tableau S1 : Composition du digestat liquide résiduaire rapportée par le groupe de recherche « Prospective environnementale » de l'Université nationale de Colombie – siège de Palmira.

Contributions des auteurs : Conceptualisation, ALMM, MY-P., KACC et PEZM ; conservation des données, ALMM, MY-P., KACC et PEZM ; laboratoire, ALMM, MY-P., KACC et PEZM ; méthodologie, ALMM, MY-P., KACC et PEZM ; administration de projet, ALMM, MY-P. et KACC ; ressources, ALMM et MY-P. ; supervision, ALMM et MY-P. ; validation, ALMM, MY-P., KACC et PEZM ; visualisation, ALMM, MY-P. et KACC ; rédaction – ébauche originale, ALMM, MY-P. et KACC ; rédaction – révision et édition, ALMM, MY-P., KACC et PEZM Tous les auteurs ont lu et accepté la version publiée du manuscrit.

Financement : Universidad Nacional de Colombia : Renforcement de l'activité de pêche artisanale dans le Pacifique colombien Nariñense vers une utilisation durable de la ressource. Tumaco, Code Hermes : 49521, BPIN : 2020000100068, Système Général de Redevances (SGR).

Déclaration du comité d'examen institutionnel : sans objet.

Déclaration de consentement éclairé : sans objet.

Déclaration de disponibilité des données : les données sont contenues dans l'article et dans les documents supplémentaires.

Remerciements : Les auteurs expriment leur gratitude au Système Général de Redevances pour leur soutien financier à travers le projet BPIN 2020000100068. En outre, ils remercient les directeurs du Laboratoire d'Analyse Chimique et des Processus Environnementaux, du Laboratoire des Venins Naturels et du Laboratoire des Processus Biologiques de l'Université nationale de Colombie, campus de Medellín, pour sa collaboration et son soutien en matière d'infrastructure physique, d'équipement et, dans certains cas, de réactifs essentiels à la réalisation des tests expérimentaux. Nous remercions également le Laboratoire de Recherche Environnementale du campus Palmira de l'Université Nationale de Colombie, en particulier Luz Stella Cadavid Rodríguez qui a fourni les échantillons de digestat pour cette recherche, et Elena Stashenko, directrice du Laboratoire de Chromatographie et Spectrométrie de Masse de l'Université Nationale de Colombie. Universidad Industrial de Santander, pour son soutien dans l'analyse des échantillons de PHA.

Conflits d'intérêts : Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

Les références

1. Jaso Sánchez, MA El surgimiento de los bioplásticos: Un estudio de nichos tecnológicos. *Acta Univ.* 2020, 30, 1–24. 2.
Plastics Europe, permettre un avenir durable. Plastiques : les faits en bref. Infographie. 2023. Disponible en ligne : <https://plasticseurope.org/es/plastics-europe-publica-plastics-the-fast-facts-2023/> (consulté le 20 mars 2024).
3. Saratale, RG; Cho, Saskatchewan ; Saratale, GD ; Kadam, AA; Ghodake, GS ; Kumar, M. ; Bh Bharagava, infirmière autorisée ; Kumar, G. ; Kim, DS ; Mulla, SI ; et coll. Un aperçu complet et les avancées récentes sur la production de polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir de divers flux de déchets organiques. *Bioressource. Technologie.* 2021, 325, 124685.
4. Sohn, YJ; Kim, HT; Baritugo, KA; Jo, SY ; Chanson, HM ; Parc, SY ; Park, Saskatchewan ; Pyo, J. ; Cha, HG; Kim, H. ; et coll. Avancées récentes dans le recyclage durable du plastique et des biopolymères. *Biotechnologie. J.* 2020, 15, 1900489. [[CrossRef](#)] [[Pub Med](#)]
5. Organisation des Nations Unies. Tout ce que vous devez savoir sur la contamination par les plastiques. Programme ONU pour le milieu ambiant. Disponible en ligne : <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-la-contaminacion-por-plasticos> (consulté le 25 avril 2023).
6. Grigore, MOI ; Grigorescu, RM; Iancu, L. ; Ion, RM; Zaharia, C. ; Andrei, ER Méthodes de synthèse, propriétés et applications biomédicales des polyhydroxyalcanoates : une revue. *J. Biomater. Sci. Polyme. Éd.* 2019, 30, 695-712. [[Référence croisée](#)] [[Pub Med](#)]
7. Madhumitha Jaganmohan. Disponible en ligne : <https://www.statista.com/aboutus/our-research-commitment/2234/madhumitha-jaganmohan> (consulté le 20 mars 2024).
8. Anjum, A. ; Zuber, M. ; Zia, KM; Noreen, A. ; Anjum, Minnesota ; Tabasum, S. Production microbienne de polyhydroxyalcanoates (PHA) et de ses copolymères : un examen des progrès récents. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 89, 161-174. [[Référence croisée](#)] [[Pub Med](#)]
9. Kaniuk, Ł.; Stachewicz, U. Développement et avantages de polymères PHA biodégradables à base de fibres PHBV électrofilées pour l'ingénierie tissulaire et d'autres applications biomédicales. *ACS Biomater. Sci. Ing.* 2021, 7, 5339-5362. [[Référence croisée](#)]
10. Koller, M. Production de biopolyesters polyhydroxyalcanoates (PHA) par les extrémophiles. *MOJ Polym. Sci.* 2017, 1, 1-19. [[Référence croisée](#)]
11. Cal, AJ; Kibblewhite, RE; Sikkema, DEO ; Torres, LF ; Hart-Cooper, WM ; Orts, WJ; Lee, CC Production de copolymères polyhydroxyalcanoates contenant du 4-hydroxybutyrate dans du *Bacillus megaterium* modifié. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 168, 86-92. [[Référence croisée](#)] [[Pub Med](#)]
12. Sánchez Moreno, SA; Marín Montoya, MA; Mora Martínez, AL; Yepes Pérez, MDS Identification du polyhydroxyalcanoate produisant des bactéries dans les sols contaminés par des déchets de figue. *Révérend Colomb. De Biotechnologie.* 2012, 14, 89-100.
13. Dhangdhariya, JH ; Dubey, S. ; Trivedi, HB; Pancha, moi; Bhatt, JK; Dave, BP ; Mishra, S. Polyhydroxyalcanoate de *Bacillus megaterium* marin utilisant le Dry Sea Mix du CSMCRI comme nouveau milieu de croissance. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 76, 254-261. [[Référence croisée](#)] [[Pub Med](#)]
14. Kumar, P. ; Des rayons.; Kalia, VC Production de copolymères de polyhydroxyalcanoates en régulant l'hydrolyse des biodéchets. *Bioressource. Technologie.* 2016, 200, 413-419. [[Référence croisée](#)] [[Pub Med](#)]
15. Munir, S. ; Jamil, N. Production de polyhydroxyalcanoates (PHA) en co-culture bactérienne utilisant du glucose et des acides gras volatils comme source de carbone. *J. Microbiol basique.* 2018, 58, 247-254. [[Référence croisée](#)] [[Pub Med](#)]
16. Yun, JH ; Sawant, SS; Kim, BS Production de polyhydroxyalcanoates par *Ralstonia eutropha* à partir d'acides gras volatils. *Le coréen J. Chimique. Ing.* 2013, 30, 2223-2227. [[Référence croisée](#)]
17. Martinez, Géorgie ; Bertin, L. ; Scoma, A. ; Rebecchi, S. ; Braunegg, G. ; Fava, F. Production de polyhydroxyalcanoates à partir d'eaux usées de moulins à olives déphénolisées et fermentées en utilisant une culture pure de *Cupriavidus necator*. *Biochimie. Ing. J.* 2015, 97, 92-100. [[Référence croisée](#)]
18. Ferré-Guell, A. ; Winterburn, J. Production accrue de polyhydroxyalcanoates avec une composition contrôlable et cohérente propriétés des matériaux par fermentation fed-batch. *Biochimie. Ing. J.* 2019, 141, 35-42. [[Référence croisée](#)]
19. Hermann-Krauss, C. ; Koller, M. ; Muhr, A. ; Fasl, H. ; Stelzer, F. ; Braunegg, G. Production archéenne de co-et terpolyesters polyhydroxyalcanoates (PHA) à partir de sous-produits dérivés de l'industrie du biodiesel. *Archées* 2013, 2013, 129268. [[CrossRef](#)] [[Pub Med](#)]
20. Sirohi, R. ; Pandey, JP ; Gaur, VK ; Gnansounou, E.; Sindhu, R. Aperçu critique des matières premières de biomasse en tant que substrats durables pour la production de polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioressource. Technologie.* 2020, 311, 123536. [[Réf. croisée](#)] [[Pub Med](#)]
21. Vu, DH ; Wainaina, S. ; Taherzadeh, MJ; Åkesson, D. ; Ferreira, JA Production de polyhydroxyalcanoates (PHA) par *Bacillus megaterium* à l'aide d'acides gras volatils dérivés de la fermentation acidogène des déchets alimentaires. *Bio-ingénierie* 2021, 12, 2480-2498. [[Référence croisée](#)]
22. Kleerebezem, R. ; Joosse, B. ; Rozendal, R. ; Van Loosdrecht, MC Digestion anaérobie sans biogaz ? *Rév. Environ. Sci. Bio/Technologie.* 2015, 14, 787-801. [[Référence croisée](#)]
23. Cadavid-Rodríguez, LS ; Castro-López, VE ; Placido, J. Évaluation des conditions de fermentation optimales pour la production d'acides gras volatils à partir de déchets de poisson artisanal. *Rés. Carré.* 2020. [[Référence croisée](#)]
24. Gómez-Cardozo, JR ; Velasco-Bucheli, R. ; Marín-Pareja, N. ; Ruiz-Villadiego, OS ; Correa-Londoño, Géorgie ; Mora-Martínez, AL
Production Fed-batch et caractérisation du polyhydroxybutyrate par *Bacillus megaterium* LVN01 à partir de glycérol résiduel. *Dyna* 2020, 87, 111-120. [[Référence croisée](#)]
25. Salazar, A. Paramètres opérationnels optimaux pour la production de bioplastiques à partir de sources renouvelables Azucaradas ; Université National de Colombie : Medellín, Colombie, 2011.
26. Rai, AK ; Swapna, Caroline du Sud ; Bhaskar, N. ; Halami, PM ; Sachindra, NM Effet de l'ensilage par fermentation sur la récupération de l'huile viscères de poissons d'eau douce. *Enzyme. Microbe. Technologie.* 2010, 46, 9-13. [[Référence croisée](#)]
27. López-Jácome, LE; Hernández-Durán, M. ; Colín-Castro, Californie ; Ortega-Peña, S. ; Cerón-González, G. ; Franco-Cendejas, R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Enquête. En Discapac.* 2014, 3, 10-18.

28. Tinción de Esporas : Fundamento, Técnicas y Usos. Gardien de la vie. Disponible en ligne : <https://www.lifeder.com/tincion-de-esporas/> (consulté le 18 janvier 2024).
29. Pérez, R. ; Juárez, M. ; Rodríguez, LP Manuel de Laboratorio de Técnicas Microbiológicas ; Département des sciences fondamentales académiques de Microbiologie. Instituto Politécnico Nacional : Pereira, Colombie, 2011.
30. Spiekermann, P. ; Rehm, BH; Kalscheuer, R. ; Baumeister, D. ; Steinbüchel, A. Une méthode de coloration sensible et viable des colonies utilisant le rouge du Nil pour le dépistage direct des bactéries qui accumulent des acides polyhydroxycarboxyliques et d'autres composés de stockage lipidiques. *Cambrie. Microbiol.* 1999, 171, 73-80. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
31. Ostle, AG; Holt, JG Bleu du Nil A comme colorant fluorescent pour le poly-β-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44, 238-241. [\[Référence croisée\]](#)
32. ISO 12966-2:2017 ; Graisses et huiles animales et végétales — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras — Partie 2 : Préparation des esters méthyliques d'acides gras. Organisation internationale de normalisation : Genève, Suisse, 2017.
33. Pradhan, S. ; Dikshit, PK ; Moholkar, VS Production, caractérisation et applications de polymère biodégradable : Polyhydroxycarboxylates. Dans *Avancées des polymères durables : synthèse, fabrication et caractérisation* ; Springer : Singapour, 2020 ; pp. 51-94.
34. Liu, J. ; Zhao, Y. ; Diao, M. ; Wang, W. ; Hua, W. ; Wu, S. ; Chen, P. ; Ruan, R. ; Cheng, Y. Production de poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) par *Rhodospirillum rubrum* en utilisant une stratégie de culture en deux étapes. *J. Chem.* 2019, 2019, 8369179. [\[Réf. croisée\]](#)
35. Jakic, M. ; Vrandečić, NS; Erceg, M. Dégradation thermique des mélanges poly (3-hydroxybutyrate)/poly (oxyde d'éthylène) : Thermo-analyse gravimétrique et cinétique. *EUR. Polyme. J.* 2016, 81, 376-385. [\[Référence croisée\]](#)
36. Vahabi, H. ; Michely, L. ; Moradkhani, G. ; Akbari, V. ; Cochez, M. ; Vagner, C. ; Renard, E. ; Saeb, M. ; Langlois, V. Stabilité thermique et comportement d'inflammabilité des composites à base de poly (3-hydroxybutyrate) (PHB). *Matériaux* 2019, 12, 2239. [\[CrossRef\]](#)
37. Thiré, RM; Arruda, LC; Barreto, LS Morphologie et propriétés thermiques des nanocomposites poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)/attapulgit. *Maître. Rés.* 2011, 14, 340-344. [\[Référence croisée\]](#)
38. Abbasi, M. ; Manteaux, ER ; McDonald, AG Extraction par solvant vert et caractérisation des propriétés du poly (3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalérate) biosynthétisé par des consortiums microbiens mixtes nourris avec du fumier laitier fermenté. *Bioressource. Technologie. Rep.* 2022 , 28, 101065. [\[CrossRef\]](#)
39. Abbasi, M. ; Pokhrel, D. ; Manteaux, ER ; Guho, Nouveau-Mexique ; McDonald, AG Effet de la teneur en 3-hydroxyvalérate sur les propriétés thermiques, mécaniques et rhéologiques des biopolymères poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) produits à partir de fumier laitier fermenté. *Polymères* 2022, 14, 4140. [\[CrossRef\]](#)
40. Guho, Nouveau-Mexique ; Pokhrel, D. ; Abbasi, M. ; McDonald, AG; Alfaro, M. ; Brinkman, CK; Coats, ER Production à l'échelle pilote de poly- 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate à partir de fumier laitier fermenté : performance du processus, caractérisation des polymères et implications à grande échelle. *Bioressource. Technologie. Rep.* 2020 , 12, 100588. [\[CrossRef\]](#)
41. Souza Junior, OF; Staffa, LH ; Costa, LC; Chinelatto, MA Comportement thermique et rhéologique des mélanges binaires de poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) et de poly (éthylène-co-acétate de vinyle) avec différents teneurs en acétate de vinyle. *Macromol. Symp.* 2019, 383, 1800020. [\[Réf. croisée\]](#)
42. Chan, CH; Kummerlöwe, C. ; Kammer, HW Cristallisation et comportement à la fusion de mélanges à base de poly (3-hydroxybutyrate). *Macromol. Chimique. Phys.* 2004, 205, 664-675. [\[Référence croisée\]](#)
43. Bora, L. ; Das, R. ; Gohain, D. Un nouveau biopolymère (polyhydroxycarboxylates) stable à la fusion et à haute résistance à la traction de *Bacillus megaterium* (MTCC10086) et sa caractérisation. *J. Microbiol. basique.* 2014, 54, 1012-1016. [\[Référence croisée\]](#)
44. Castillo, D. Effet de la génération fadH1 sur la production de PHA contenant des monômes insaturés par *Pseudomonas Putida* ; Pontificia Universidad Javeriana : Bogotá, Colombie, 2008.
45. Sudesh, K. ; Abe, H. ; Doi, Y. Synthèse, structure et propriétés des polyhydroxycarboxylates : Polyesters biologiques. *Programme. Polyme. Sci.* 2000, 25, 1503-1555. [\[Référence croisée\]](#)
46. Wang, J. ; Liu, S. ; Huang, J. ; Qu, Z. Une revue de la production de polyhydroxycarboxylates à partir de déchets agricoles *Biomasse : Développement, Avancées, approche circulaire et défis.* *Bioressource. Technologie.* 2021, 342, 126008. [\[Réf. croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
47. Kosseva, MR ; Rusbandi, E. Tendances dans la biofabrication de polyhydroxycarboxylates en mettant l'accent sur le traitement en aval. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 107, 762-778. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
48. Chanson, J. ; Murphy, R. ; Narayan, R. ; Davies, G. Alternatives biodégradables et compostables aux plastiques conventionnels. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2009, 364, 2127-2139. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
49. Gómez Cardozo, JR ; Velasco-Bucheli, R. ; Del Cerro, C. ; Mata, IDL; Mora Martínez, AL Ingénierie de *Bacillus megaterium* pour améliorer la production de PHA à partir du glycérol. *Asie-Pacifique. J. Mol. Biol. Biotechnologie.* 2019, 27, 64-72.
50. Gómez Cardozo, JR ; Mora Martínez, AL; Yepes Pérez, M. ; Correa Londoño, GA Production et caractérisation de polyhydroxycarboxylates et de micro-organismes natifs synthétisés à partir de déchets gras. *Int. J. Polym. Sci.* 2016, 2016, 6541718. [\[Réf. croisée\]](#)
51. Salazar, A. ; Oui, M. ; Corrêa, G. ; Mora, A. Production de polyhydroxycarboxylate à partir de substrats sucrés inexplorés. *Dyna* 2014, 81, 73-77. [\[Référence croisée\]](#)
52. Cardona, AC; Mora, AL; Marín, M. Identification moléculaire des bactéries productrices de polyhydroxycarboxylates et de sous-produits de lait et de sucre. *Rév. Fac. Nac. De Agron. Medellín* 2013, 66, 7129-7140.
53. Salgaonkar, BB; Mani, K. ; Braganca, JM Caractérisation des polyhydroxycarboxylates accumulés par un milieu modérément halophile isolat de saignée, souche H16 de *Bacillus megaterium*. *J. Appl. Microbiol.* 2013, 114, 1347-1356. [\[Référence croisée\]](#)

54. Alkotaini, B. ; Sathiyamoorthi, E. ; Kim, BS Potentiel de *Bacillus megaterium* pour la production de polyhydroxyalcanoates à l'aide de l'algue rouge *Gelidium amansii*. *Biotechnologie. Ing. bioprocédés*. 2015, 20, 856-860. [\[Référence croisée\]](#)
55. Winnacker, M. Polyhydroxyalcanoates : Progrès récents dans leur synthèse et leurs applications. *EUR. J. Lipid Sci. Technologie*. 2019, 121, 1900101. [\[Réf. croisée\]](#)
56. Chen, GQ ; Jiang, XR ; Guo, Y. Biologie synthétique des microbes synthétisant des polyhydroxyalcanoates (PHA). *Synthé. Système. Biotechnologie*. 2016, 1, 236-242. [\[Référence croisée\]](#)
57. Tian, P. ; Shang, L. ; Ren, H. ; Mi, Y. ; Fan, D. ; Jiang, M. Biosynthèse des polyhydroxyalcanoates : recherche et développement actuels. *Afr. J. Biotechnologie*. 2009, 8, 709-714.
58. Cavaleiro, JM; Raposo, RS; De Almeida, MCM; Cesário, MT; Sévrin, C. ; Grandfils, C. ; Da Fonseca, M. Effet des paramètres de culture sur la production de poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) et de poly (3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate- 3-hydroxyvalérate) par *Cupriavidus necator* en utilisant des déchets de glycérol. *Bioressource. Technologie*. 2012, 111, 391-397. [\[Référence croisée\]](#)
59. Marché du polyhydroxyalcanoate (PHA) par type (longueur de chaîne courte, longueur de chaîne moyenne), méthodes de production (fermentation du sucre, fermentation de l'huile végétale), application (emballage et services alimentaires biomédicaux) et prévisions régionales-mondiales jusqu'en 2028. Disponible en ligne : https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html?gad_source=1&gclid=Cj0_KCQjwhTWvBhD9ARIsAOP0GogViHNhj3GJBVD8HaHD2hl_z9qSSB0dUmUTmNE-rvudbLClu9nmLClaAgzzEALw_wcB (consulté le 15 mai 2024).
60. Kumar, M. ; Rathour, R. ; Singh, R. ; Soleil, Y. ; Pandey, A. ; Gnansounou, E. ; Lin, Kentucky ; Tsang, DC ; Thakur, IS Polyhydrox bactérien yalkanoates : opportunités, défis et perspectives. *J. Nettoy. Prod.* 2020, 263, 121500. [\[Réf. croisée\]](#)
61. Abd El-malek, F. ; Khairy, H. ; Farag, A. ; Omar, S. La durabilité des bioplastiques microbiens, leur production et leurs applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 157, 319-328. [\[Référence croisée\]](#)
62. Loizidou, M. ; Moustakas, K. ; Réhan, M. ; Nizami, AS; Tabatabaei, M. Nouveaux développements dans les systèmes durables de valorisation énergétique des déchets. *Renouveler. Soutenir. Energy Rev.* 2021, 151, 111581. [\[CrossRef\]](#)
63. Lambert, S. ; Wagner, M. Performance environnementale des plastiques biosourcés et biodégradables : le chemin à parcourir. *Chimique. Soc. Tour.* 2017, 46, 6855-6871. [\[Référence croisée\]](#)
64. Xiang, H. ; Wen, X. ; Miu, X. ; Li, Y. ; Zhou, Z. ; Zhu, M. Mécanismes de dépolymérisation thermique du poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate). *Programme. Nat. Sci. Maître. Int.* 2016, 26, 58-64. [\[Référence croisée\]](#)
65. Miranda, DA; Marín, K. ; Sundman, O. ; Hedenström, M. ; Quillaguan, J. ; Gorzsás, A. ; Brosrom, M. ; Carlborg, M. ; Lundvist, J. ; Romero-Soto LJonsson, LJ ; et coll. Production et caractérisation du poly(3-hydroxybutyrate) de *Halomonas boliviensis* LC1 cultivé dans des hydrolysats de tiges de quinoa. *Fermentation* 2023, 9, 556. [\[CrossRef\]](#)
66. Sirohi, R. ; Pandey, JP ; Tarafdar, A. ; Agarwal, A. ; Chaudhuri, Saskatchewan ; Sindhu, R. Un processus vert écologiquement durable pour l'utilisation de grains de blé endommagés pour la production de poly-3-hydroxybutyrate. *Environ. Technologie. Innover.* 2021, 21, 101271. [\[Référence croisée\]](#)
67. Joukov, VA ; Jouykova, YV ; Makhina, savoirs traditionnels ; Mychkina, VL ; Rusakov, A. ; Useinov, A. ; Voinova, VV; Bonartseva, Géorgie ; Berlin, AA ; Bonartsev, AP; et coll. Caractérisation comparative structure-propriétés de films de poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) sous dégradation hydrolytique et enzymatique : recherche d'un point de transition dans la teneur en 3-hydroxyvalérate. *Polymères* 2020, 12, 728. [\[CrossRef\]](#)
68. Mohapatra, S. ; Pattnaik, S. ; Maité, S. ; Sharma, S. ; Akhtar, J. ; Pati, S. ; Samantaray, DP; Varma, A. Analyse comparative de la production de PHA par *Bacillus megaterium* Ouat 016 sous fermentation immergée et à l'état solide. *Saoudien J. Biol. Sci.* 2020, 27, 1242-1250. [\[Référence croisée\]](#)
69. Han, J. ; Hou, J. ; Zhang, F. ; Ai, G. ; Li, M. ; Cai, S. ; Liu, H. ; Wang, L. ; Wang, Z. ; Zhang, S. ; et coll. Voies d'approvisionnement multiples en propionyl coenzyme A pour la production du poly bioplastique (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) dans *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79, 2922-2931. [\[Référence croisée\]](#)
70. Cheng, HN; Biswas, A. ; Vermillon, K. ; Melendez-Rodriguez, B. ; Lagaron, JM Analyse RMN et distributions de séquences triades de poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate). *Polyme. Test.* 2020, 90, 106754. [\[Réf. croisée\]](#)
71. Wang, Y. ; Chen, R. ; Cai, J. ; Liu, Z. ; Zheng, Y. ; Wang, H. ; Li, Q. ; Lui, N. Biosynthèse et propriétés thermiques du PHBV produit de l'acide lévulinique par *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE* 2013, 8, e60318. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
72. Forni, D. ; Abeille, G. ; Kreuzer, M. ; Wenk, C. Nouveaux plastiques biodégradables dans la nutrition des moutons - Effets du prétraitement NaOH du poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) sur la digestibilité in vivo et sur la disparition in vitro (Rusitec). *J. Anim. Phys. Animé. Nutrit.* 1999, 81, 41-50. [\[Référence croisée\]](#)
73. Elles Montero, AE; García Echeverry, CA Mezcla Sinérgique Entre Polihidroxibutirato (PHB) et Caucho Natural (Látex) pour Obtenir un copolymère. Thèse de licence, Universidad de Cartagena, Carthagène, Colombie, 2012.
74. Barham, P. ; Keller, A. ; Otun, E. ; Holmes, P. Cristallisation et morphologie d'un thermoplastique bactérien : Poly-3-hydroxybutyrate. *J. Mater. Sci.* 1984, 19, 2781-2794. [\[Référence croisée\]](#)
75. Gutiérrez, G. ; Getzabeth, M. Production de Poli-Hidroxiacanoatos por Bacterias del Género *Bacillus* d'Origen Marino. Maîtrise Thèse, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Espagne, 2008.

Avis de non-responsabilité/Note de l'éditeur : Les déclarations, opinions et données contenues dans toutes les publications sont uniquement celles du ou des auteurs et contributeurs individuels et non de MDPI et/ou du ou des éditeurs. MDPI et/ou le(s) éditeur(s) déclinent toute responsabilité pour tout préjudice corporel ou matériel résultant des idées, méthodes, instructions ou produits mentionnés dans le contenu.