

# Le mariage réussi du plastique et des enzymes

*Alain Marty est ingénieur du génie biochimique de l'INSA de Toulouse. Depuis 2007, il est Professeur dans cet établissement et ses activités de recherches sont focalisées sur l'ingénierie enzymatique. Depuis 2015, il est Directeur Scientifique de la société Carbios.*

## 1 Objectif : améliorer le cycle de vie des plastiques

Trouver une solution à la fin de vie des plastiques est devenu un sujet d'étude et un objectif industriel. La société Carbios (**Encart : « La société Carbios »**) s'y consacre depuis plusieurs années.

Pourquoi s'intéresser à la fin de vie des plastiques ? Si on regarde autour de nous, les plastiques sont partout. On en produit 400 millions de tonnes par an dans le monde. Chaque année, 125 millions de tonnes finissent leur vie en tant que déchets et malheureusement presque 9 millions finissent dans la nature et polluent les terres et les océans, créant par exemple le fameux « 7<sup>e</sup> continent » de plastique (**Figure 3**).

L'innovation de Carbios (**Figure 1**) est basée sur une technologie enzymatique. L'idée a été de découvrir des micro-organismes dégradant les plastiques, d'identifier les enzymes responsables de cette dégradation, qu'on va appeler des dépolymérase. Ces enzymes, qui sont des catalyseurs biologiques, vont couper la chaîne polymère et, dans le cas idéal, revenir au monomère qui constituait ces plastiques (**Figure 4**).

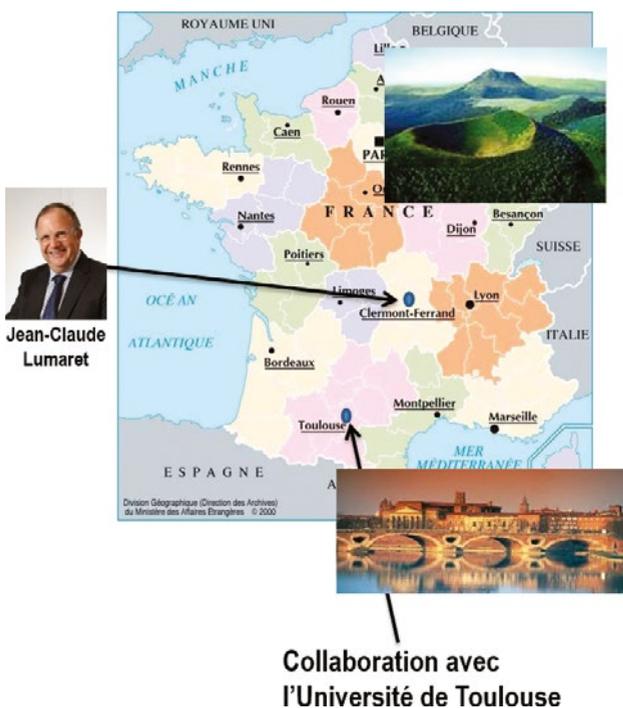
## 2 Rendre les plastiques biodégradables

### 2.1. Une réglementation pour la biodégradabilité des plastiques

Le premier marché auquel s'intéresse Carbios est le marché des sacs et de

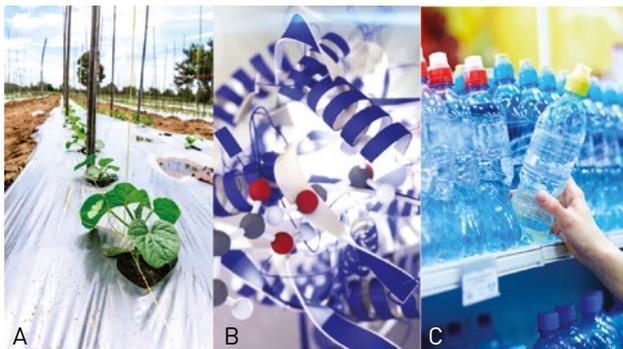
## LA SOCIÉTÉ CARBIOS

Carbios\* est une jeune société fondée en 2011 par Jean-Claude Lumaret (**Figure 1**). Elle compte aujourd'hui dix-neuf personnes, dont dix en R&D. L'objectif est d'améliorer le cycle de vie des plastiques, en s'intéressant particulièrement à leur fin de vie (**Figure 2**). Carbios est basée à Clermont-Ferrand et collabore étroitement avec TWB (Toulouse White Biotechnology), l'INSA de Toulouse et le Lisbp (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés).



**Figure 1**

La société Carbios, fondée par Jean-Claude Lumaret, est basée à Clermont-Ferrand et collabore avec TWB (Toulouse White Biotechnology), l'INSA de Toulouse et le Lisbp (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés).



**Figure 2**

La société Carbios a pour objectif d'améliorer le cycle de vie des plastiques. A) Des plastiques sont utilisés comme films agricoles ; B) la dépolymérase est une enzyme capable de dégrader les plastiques ; C) les plastiques abondent dans les rayons des supermarchés.

\*[www.carbios.fr](http://www.carbios.fr)



Figure 3

Le rejet des produits de consommation (plastiques, etc.) est un fléau pour les terres et les océans. La quantité de déchets est telle qu'elle a créé un septième continent, une zone immense d'accumulation de déchets plastiques amalgamés dans le nord de l'Océan Pacifique. Il est aujourd'hui urgent de trouver des solutions de recyclage.

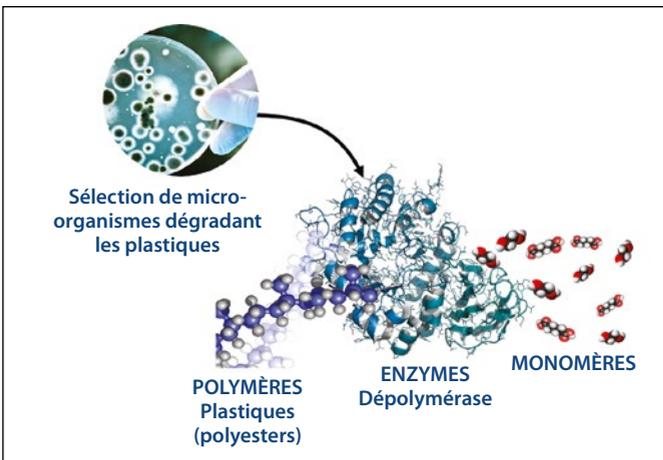


Figure 4

Les dépolymérases sont capables de dégrader des plastiques. Ces enzymes vont casser les chaînes polymères pour redonner le monomère initial.

l'emballage, des films agricoles et de certains films techniques (Figure 5). Il s'agit de millions de tonnes. Par

exemple en France, avant l'interdiction des sacs de caisses, 25 milliards de ces sacs nous étaient donnés chaque année

Figure 5

Les marchés du plastique.

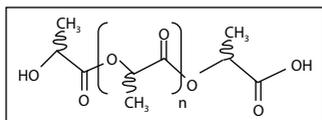


Figure 6

Acide polylactique, polymère intéressant car biosourcé, mais malheureusement non biodégradable à une température inférieure à 60 °C.

chez Leclerc, Carrefour, etc. En France, ces sacs de caisse à usage unique ont été interdits et seuls sont autorisés les sacs réutilisables. Les sacs de fruits et légumes autorisés doivent être compostables « à la maison », donc dans la nature, et contenir au minimum 40 % de matière biosourcée<sup>1</sup>. En 2020 ce sera 50 %, l'année suivante ce sera 60 %. Parmi tous les bioplastiques correspondant un tant soit peu à ces critères, on compte l'acide polylactique<sup>2</sup> (PLA),

fabriqué à partir d'acide lactique : c'est donc un polymère 100 % biosourcé (Figure 6). Il ne correspond malheureusement pas à tous les critères car il n'est pas dégradé à une température inférieure à 60 °C. Donc dans son compost, au fond du jardin, ce plastique ne se dégradera pas, et s'il se retrouve malencontreusement dans la nature, il ne se dégradera pas non plus.

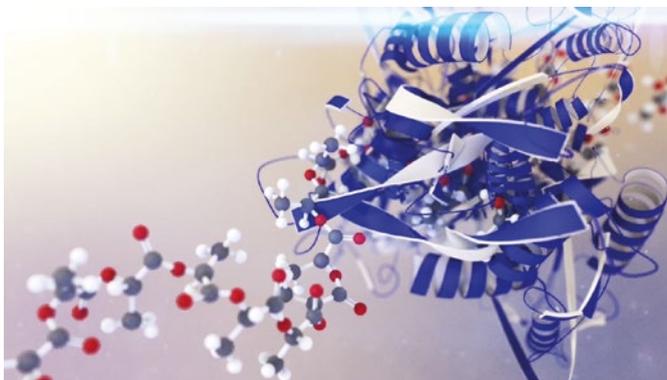
## 2.2. Une enzyme pour biodégrader le plastique ?

1. Matière biosourcée : matériau issu de la biomasse d'origine animale ou végétale.
2. Acide polylactique (PLA, « polylactic acid ») : le polymère biosourcé PLA est obtenu majoritairement par fermentation d'amidon en présence de bactéries produisant de l'acide lactique.

L'idée de Carbios est d'utiliser une enzyme dépolymérase (Figure 7) pour couper le polymère et libérer l'acide lactique. Ce dernier est parfaitement biodégradable dans le sol. À peu près tous les micro-organismes ont des

Figure 7

Action d'une dépolymérase sur les chaînes de PLA. L'enzyme va découper le polymère afin de libérer de l'acide lactique, qui va être entièrement métabolisé par les bactéries.





**Figure 8**

L'idée est de mélanger du plastique et des enzymes dans une extrudeuse pour obtenir un plastique biodégradable.

activités de dégradation de l'acide lactique, donc le produit final ce sera du dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> et de l'eau.

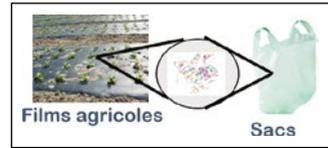
Comment introduire une enzyme dans un plastique ?

En 2011, quand Jean-Claude Lumaret est venu me voir à l'INSA dans mon laboratoire, il m'a expliqué la chose suivante : « Notre idée est de prendre un polymère, du PLA, de le mettre dans une extrudeuse<sup>3</sup> industrielle, et on introduira en même temps l'enzyme dans la matière fondue » (Figure 8). À la fin, avec ce polymère contenant une enzyme, on aurait un polymère biodégradable dans la nature. Jean-Claude Lumaret m'a ensuite expliqué que pour faire fondre du PLA il fallait une température de 165 °C. Ma réaction a été instantanée : mettre une enzyme à 165 °C, cela va être très compliqué, l'enzyme a de forts risques d'être détruite (Figure 9). Optimistes, nous nous sommes tout de même lancés dans l'aventure.

### 2.3. À la recherche de l'enzyme idéale

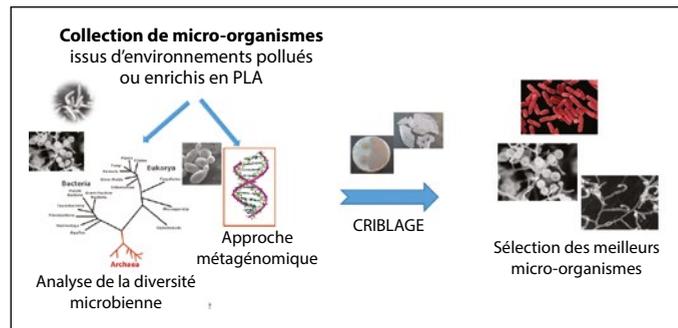
La première chose qui a été faite a été d'identifier des

micro-organismes capables de dégrader le PLA. On a utilisé soit des collections de micro-organismes provenant d'environnements pollués en plastiques, soit des environnements que nous avons nous-mêmes pollués en plastiques. On a récupéré ces micro-organismes attachés à ces plastiques, en se disant que s'ils étaient là, c'est qu'ils y avaient un intérêt, qu'ils y trouvaient du carbone. On a utilisé de la microbiologie classique, on a aussi utilisé des approches de métagénomique pour accéder à plus de diversité (Figure 10). La métagénomique consiste à partir des micro-organismes que l'on ne sait pas cultiver, à les



**Figure 9**

Peut-on mettre des enzymes dans un plastique pour le rendre biodégradable ?



**Figure 10**

Processus de sélection des meilleurs micro-organismes. Les micro-organismes sont collectés à partir de cultures sur des environnements pollués ou enrichis en PLA, une approche métagénomique et une analyse de la diversité microbienne sont ensuite menés afin de cribler les bactéries ayant le meilleur potentiel.

3. Extrudeuse : une sorte de vis que l'on chauffe afin de faire fondre le polymère.

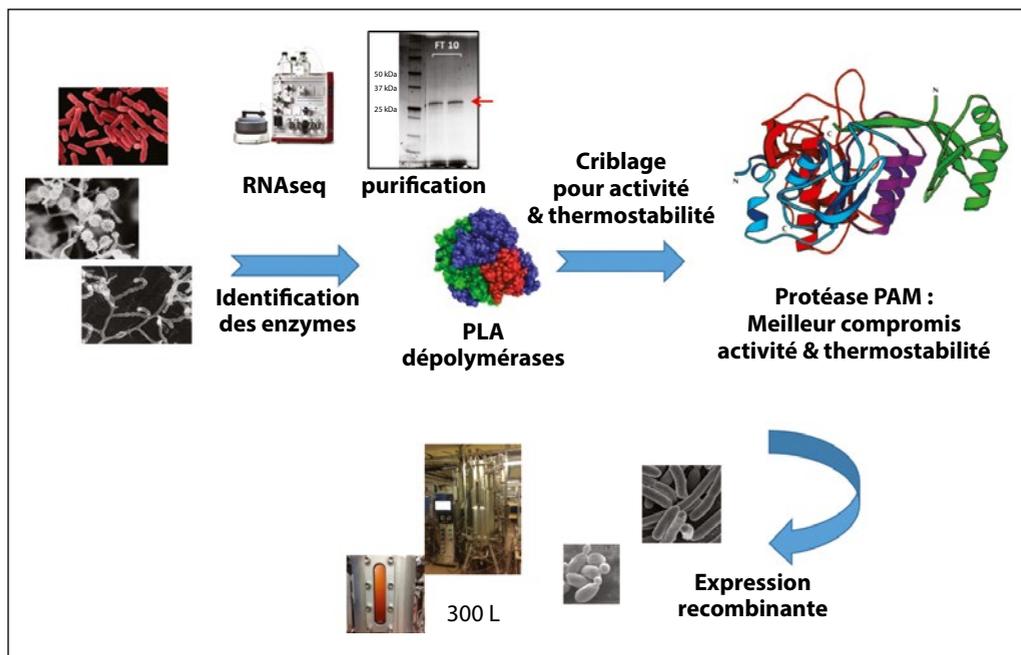


Figure 11

Processus de production d'enzyme dépolymérase PAM. Les gènes produisant les enzymes responsables de la dégradation sont identifiés et extraits par séquençage d'ADN et purification ; ces gènes seront ensuite criblés afin de sélectionner l'enzyme ayant le meilleur compromis entre son activité de dégradation et sa thermostabilité, nommée PAM. Le gène cible sera ensuite recombiné dans une bactérie performante en termes de productivité, ce qui permet aujourd'hui de produire du PAM dans des fermenteurs à une échelle de 300 litres.

couper, couper leur ADN ; cet ADN est ensuite cloné dans *Escherichia coli* par exemple, et on crible ensuite la capacité à dégrader, dans notre cas, les plastiques.

Par des techniques biotechnologiques classiques, on a ensuite identifié un certain nombre d'enzymes performantes, et puis on a fini par sélectionner une PLA dépolymérase, le meilleur compromis entre activité de dégradation et thermostabilité, puisqu'il fallait qu'elle résiste à 165 °C. Il restait à exprimer cette enzyme. À l'origine, elle était exprimée chez un micro-organisme peu performant en termes

de productivité, ce qui nous a conduits à l'exprimer de manière recombinante. Aujourd'hui on est capable de la produire dans des fermenteurs à une échelle de 300 litres, et on pourrait faire beaucoup plus (Figure 11).

### 2.3.1. Améliorer l'efficacité de l'enzyme

On a déterminé la structure de l'enzyme et de son complexe avec un brin de PLA. On a alors identifié tous les acides aminés en contact avec un brin de PLA, et la stratégie qui a été utilisée a été de re-designer complètement le site actif de cette enzyme et donc de changer

complètement la serrure de manière à l'adapter à notre clé, à favoriser l'arrimage du PLA au site actif de cette enzyme. La suite du travail a été de combiner les meilleures mutations et de construire des centaines de variants (variations de la chaîne peptidique) de cette enzyme.

À la suite de ces résultats, on est reparti vers l'extrudeuse (Figure 12), après avoir, en plus de l'enzyme, optimisé de nombreux aspects : la formulation de cette enzyme, la façon de l'introduire dans l'extrudeuse, etc. Finalement, cela a permis d'obtenir un plastique enzymé qui par exemple se dégrade à 90 % en 10 jours, ou de 80 % en deux jours (Figure 13).

À partir de ces pellets (pastilles) de plastiques, on a été capable de fabriquer des films, donc des sacs de caisse (Figure 14). On les a enfouis dans de la terre d'Auvergne qu'on est allé chercher au fond du jardin, à Clermont-Ferrand, et on a pu vérifier qu'après 7 jours la dégradation était complète (Figure 15). On obtient une dégradation complète de ces films, ce qui leur donne le caractère



Figure 12

L'extrusion à 165 °C a permis d'obtenir le plastique enzymé.

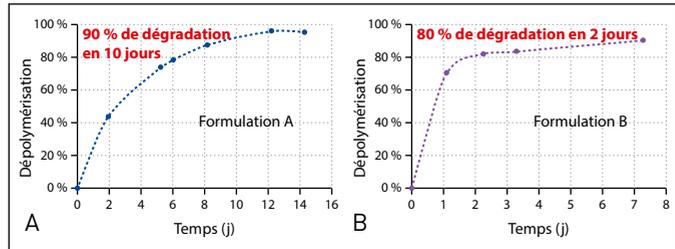


Figure 13

A) Évolution de la dépolymérisation pour le plastique enzymé de formulation A en fonction du temps. Cette formulation permet d'atteindre un taux de 90 % de dégradation en 10 jours, ce qui est très intéressant ; B) évolution de la dépolymérisation pour le plastique enzymé de formulation B en fonction du temps. Cette formulation permet d'atteindre un taux de 80 % de dégradation en 2 jours, ce qui est une dégradation presque trop rapide.

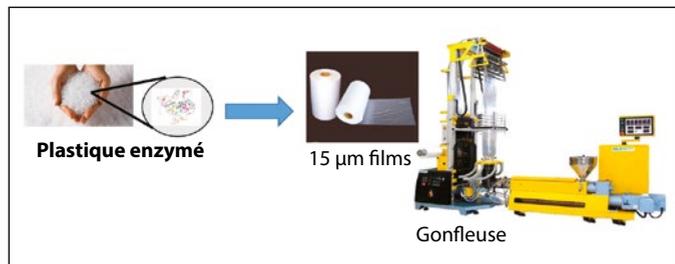


Figure 14

La production de films de 15 microns à l'aide d'une gonfieuse a permis d'obtenir du plastique enzymé.



Figure 15

Comparaison d'un échantillon de PLA et d'un échantillon de PLA enzymé après 7 jours en sol. On peut voir que le PLA ne présente aucune dégradation tandis que le PLA enzymé est presque totalement dégradé.

biodégradable à basse température.

Pour couronner ces travaux, on a fondé, en septembre 2016, la joint-venture Carbiolice, avec Limagrain Céréales Ingrédients, qui est le troisième semencier mondial, et BPI France qui est un investisseur gouvernemental (Figure 16).



Figure 16

Présentation de la joint-venture Carbiolice, en association avec Limagrain et BPI France.

### 3 Recycler les plastiques

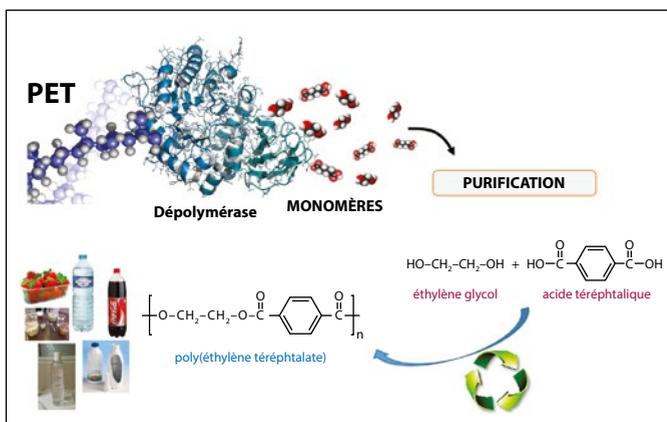
Le deuxième sujet de ce chapitre est le recyclage des plastiques – plus précisément celui du polyéthylène téréphthalate, PET. Le PET est un polymère très utilisé qui sert à faire les bouteilles d'eau, de soda, des barquettes alimentaires, des produits cosmétiques et des fibres textile (appelées communément polyester). Les nouvelles

bouteilles de lait sans opercule sont également en PET.

Comme pour l'objectif de dégradation, on veut, partant du polymère, revenir aux monomères (l'éthylène glycol qui est un diol, et l'acide téréphthalique qui est un diacide), mais à la fin les purifier. À partir de ces monomères, on pourra refaire du PET. Il ne s'agit plus de biodégradation, mais de recyclage (Figure 17).

Figure 17

Application des enzymes au recyclage du PET. Le PET serait dépolymérisé sous l'action de l'enzyme afin de restituer ses monomères initiaux, l'éthylène glycol et l'acide téréphthalique, après purification. Ces monomères pourront ensuite être réutilisés afin de synthétiser du PET à nouveau. Ce PET recyclé pourrait servir dans toutes les applications usuelles du PET : bouteilles d'eau et de sodas, barquettes alimentaires, emballages de produits cosmétiques, et bouteilles de lait... Ce procédé permettrait par la biodégradation et le recyclage, de réaliser une économie de carbone.



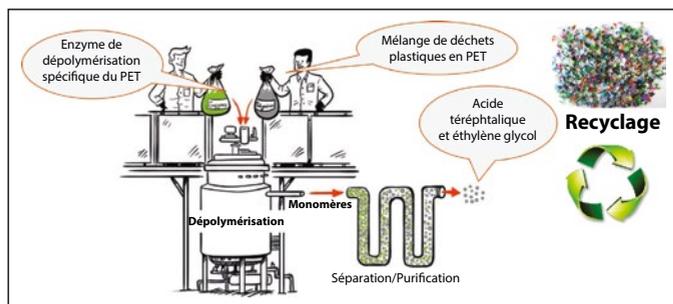


Figure 18

*Idee générale du recyclage du PET par voie enzymatique. Les déchets plastiques sont mélangés à une enzyme de dépolymérisation spécifique au PET dans un réacteur, et après dépolymérisation, séparation et purification, sont récupérés l'éthylène glycol et l'acide téréphtalique.*

Le marché du PET est colossal : 70 millions de tonnes par an. Aujourd'hui, dans le monde, on produit plus de 500 milliards de bouteilles en PET, cela représente un million de bouteilles chaque minute. Le PET pour fibres textiles est un marché encore plus colossal, c'est trois fois le marché de la bouteille.

La technique du recyclage est la suivante : on ramasse toutes les bouteilles plastiques des conteneurs, on les met dans un gros réacteur, on ajoute l'enzyme. L'enzyme fait son travail, dépolymérise, restitue les monomères (Figure 18). On va repurifier ces monomères, pour qu'on puisse re-fabriquer des bouteilles à partir d'eux.

Il existe des procédés concurrents, pas encore industriels, basés sur la chimie. La voie enzymatique présente plusieurs avantages : elle permet de travailler à relativement basse température, elle permet de recycler à peu près tous les emballages en PET, les colorés, les opaques, les mixtes... La raison en est que l'enzyme ne s'attaque qu'à un polymère spécifique, ce qui facilite les étapes de purification ultérieures. Par ailleurs, les procédés chimiques

ou thermochimiques utilisés nécessitent un tri très sophistiqué en entrée. Ici l'enzyme fait elle-même le tri.

On a utilisé exactement la même stratégie de mise en œuvre que pour la dégradation des polymères : identification des micro-organismes, puis des enzymes qu'on exprime de manière recombinante, puis que l'on optimise.

On est capable de traiter des barquettes, des bouteilles transparentes mais aussi colorées, des bouteilles opaques... On est aussi capable de traiter des matériaux plus complexes. Une bouteille de Perrier, par exemple, est souvent constituée de trois couches : deux couches externes sont effectivement en PET, et au milieu se trouve un film de polyamide<sup>4</sup>, de manière à éviter que le CO<sub>2</sub> ne fuie de la bouteille. L'enzyme va dégrader le PET, et à la fin on aura un déchet ultime qui sera le film de polyamide.

4. Polyamide (PA) : Polymère contenant des fonctions amides pouvant résulter de la polycondensation entre les fonctions acides carboxyliques et amines. Il s'agit de polymères généralement à structures semi-cristallines, qui présentent un bon compromis entre caractéristiques mécaniques et chimiques.

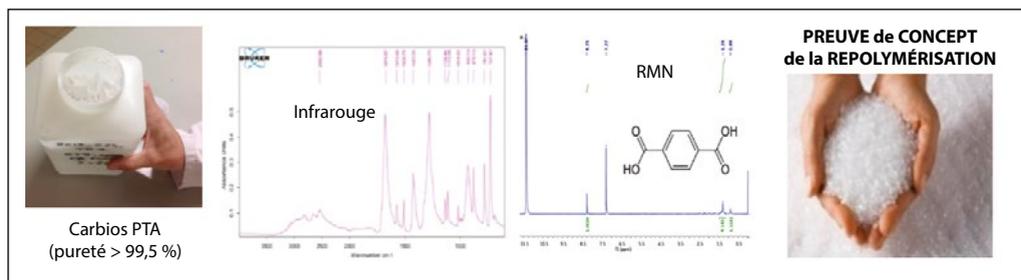


Figure 19

L'acide téréphtalique Carbios obtenu par recyclage du PET possède une pureté supérieure à 99,5 %. Il n'est pas différenciable de l'acide téréphtalique commercial, il possède le même aspect et les spectres RMN et infrarouges sont identiques. L'acide obtenu est donc d'une grande qualité.

Aujourd'hui nous sommes capables de dépolymeriser des déchets plastiques à 97 % en 16 h, de purifier les monomères et de les re-poly-mériser en PET (Figure 19). Prochaine étape : refaire une bouteille.

## Des procédés pour la vie quotidienne grâce à l'ingénierie enzymatique

Les travaux décrits dans ce chapitre illustrent la puissance des techniques d'ingénierie enzymatique pour de nouveaux domaines. Le problème actuel inquiétant que rencontre la société dans la gestion des matières plastiques et de leurs déchets, par exemple, est en voie de trouver solution grâce à ces techniques : selon les cas, on favorise la dégradation du polymère ou son recyclage.

Ce chapitre met l'accent sur la démarche qui conduit de l'invention fondamentale du laboratoire à la conception d'un procédé et à son développement qui exige souvent le retour au laboratoire.