

Recherche de microorganismes producteurs d'hémi-cellulases pour la valorisation de biomasses peu celluloses et valorisation des hémicelluloses dans les domaines des biopolymères, les fermentations non agro-alimentaires



M. GARES, S. HILIGSMANN, K. M. KARA ALI and N. KACEM CHAOUICHE,

Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne, FSNV, Université frères Mentouri, Constantine 1, Algeria
3BIO-Bio-Tech Unité de Biotechnologie et Bioprocédé, Ecole polytechnique de Bruxelles, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

Adress mail: Maroua.gares@umc.edu.dz

RÉSUMÉ

La valorisation optimale de la biomasse lignocellulosique nécessite l'utilisation de tous ses principaux composants (à savoir la cellulose, l'hémicellulose et la lignine) dans une approche intégrée de la bio-raffinerie.

Comme les hémicelluloses représentent 20 à 40% de la biomasse végétale, elles font de plus en plus l'objet d'études récentes en tant que matière première pour la production de bioéthanol

OBJECTIF

L'objectif de ce projet de thèse est de rechercher des microorganismes capables de produire l'hémicellulase dans différents écosystèmes Algériens, cela se fera dans le but de valoriser la biomasse peu cellulosique et riche en hémicellulose dans le domaine des biopolymères. L'accent sera mis, en premier lieu, sur l'identification des isolats microbiens sélectionnés comme étant producteurs de l'hémicellulase, et par la suite, l'optimisation des conditions de fermentation pour la production est envisageable.

INTRODUCTION

Les différentes exploitations industrielles des végétaux entraînent souvent la formation de quantités considérables de déchets lignocellulosiques, nommés déchets de biomasse.

La valorisation de ces déchets implique leur bioconversion en énergie comme l'éthanol, l'électricité et/ou l'hydrogène, et ainsi que d'autres bioproduits, tel que les biocarburants, qui remplacent, de plus en plus, les produits à base de combustibles fossiles.

Par ailleurs, l'augmentation du prix de pétrole et l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre comme le dioxyde de carbone justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance de ces combustibles fossiles et de protéger l'environnement. Cette biomasse est constituée principalement de lignocellulose et cette dernière est composée essentiellement de trois polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Les teneurs de différents constituants sont variables d'une espèce végétale à une autre. Les hémicelluloses, en effet, représentent en poids de 20 à 40 % de la biomasse végétale. Les hémicelluloses ont de plus en plus fait l'objet d'études récentes en tant que matière première pour la production de bioéthanol, comme des stabilisateurs d'émulsions et pour d'autres éventuelles applications

Le xylose est le deuxième sucre le plus abondant dans la biosphère après le glucose. Ces sucres polymérisés en cellulose et hémicelluloses peuvent fournir du bioéthanol après plusieurs étapes de prétraitement et d'hydrolyse physique, chimiques ou physico-chimiques.

MATERIEL ET METHODE

1- Echantillonnage et isolement

L'isolement a été fait directement sur le milieu CMC(carboxyméthylcellulose) comme seule source de carbone et d'énergie.

2- Culture liquide

Les isolats ont été testés pour leur capacité à croître dans des flacons de 250 ml en milieu liquide 863 à base de :

- sucres simples (glucose et xylose)
- Sucre complexe (Xylane de maïs).

Et la meilleure souche a été sélectionnée pour les applications ultérieure (code: S03)

3- solid state fermentation « Alfa »

Afin de reconnaître la composition biochimique de l'Alfa *stippa tinacissima*, une série d'hydrolyse chimique a été effectuée;

- l'acide chlorhydrique: la détermination de la concentration de l'amidon
- l'acide concentré: la détermination de la concentration de la cellulose
- l'acide dilué : la détermination de la concentration des hémicelluloses

Et ensuite une étude de l'impact de la teneur en humidité, le type de matière (fibre et poudre) et la durée de fermentation, sur la fermentation semi-solide (SSF) de l'Alfa comme seul source de carbone avec la souche S03 a été faite après

4- Fermentation et scale up

Des fermentation en bioréacteurs de 2 et 20 litres avec la souche sélectionnée ont été menées avec un suivi de l'évolution de pH, formation de biomasse, spore/ml, UFC et la concentration de différents substrats par HPLC.

Les mêmes analyses ont été faite pour les expériences en fioles.

Etude de l'effet de l'agitation sur le comportement de la souche et la concentration en pO2

5- hydrolyse enzymatique

Afin de tester l'activité enzymatique de la souche S03, le surnageant du bioréacteur 02 est partagé dans 06 tubes de 15ml contenant 1ml de tampon phosphate KH₂PO₄/Na₂HPO₄ avec 0.1g de substrat (Xylan beachwood, Xylan maïs) en double, et deux tubes avec du tampon seulement servant comme témoin plus 1ml d'azide de sodium 0,5 % pour empêcher la croissance microbienne.

6- La fermentation de l'Alfa (Bioréacteurs)

Deux bioréacteurs de 2 litres ont été démarrés avec les mêmes conditions et la même souche :

Vitesse d'agitation : 200 Rpm

Température : 30°C

Substrat utilisé : Alfa comme seule source de carbone

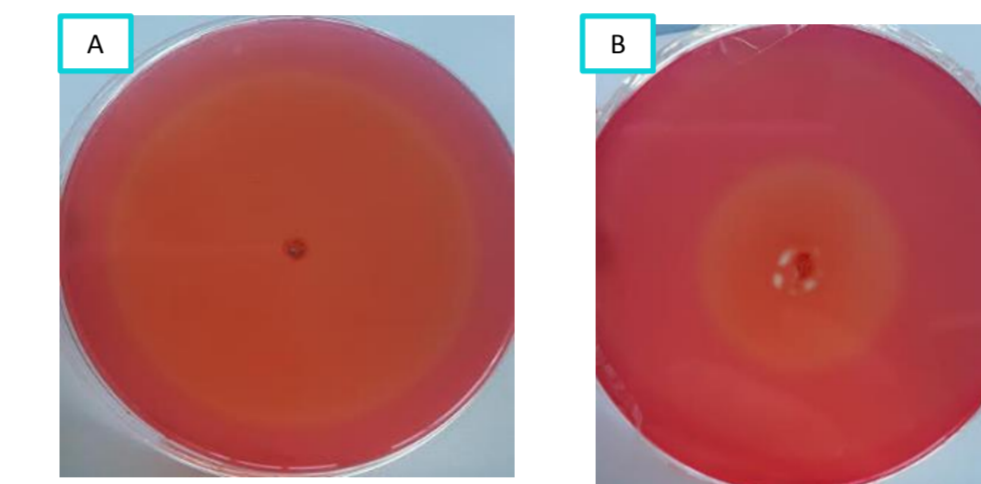
Bibliographie

- Kerbachi, R., Oucher, N., Bitouche, A., Berkouki, N., Demri, B., Boughédaoui, M., Joumard, R., 2009. Pollution par les particules fines dans l'agglomération d'Alger, in: *Environment and Transport in Different Contexts/Environnement et Transports Dans Des Contextes Différents*. ENP Alger, pp. 31-40.et l'Organisation Mondiale de la Santé l'OMS, 2016
- Kim, S., & Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 361-375.
- Palacios, Joahnn H. and Jean-pierre Larouche. 2014. "Caractérisation Des Émissions Atmosphériques Lors de La Combustion À La Ferme de La Biomasse Lignocellulosique Rapport Final Programme de Soutien À L'Innovation En Agroalimentaire."
- Ogier J.C., Ballerini D., Leygue J.P., Rigal L., Pourquie J., 1999. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *OilGasSci. Technol.* 54(1) : 67-94
- Saidur, R., Abdelaziz, E. A., Demiras, A., Hossain, M. S. et Mekhilef, S. (2011). A review on biomass as a fuel for boilers. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volume 15, p. 2262-2289.

RESULTAT

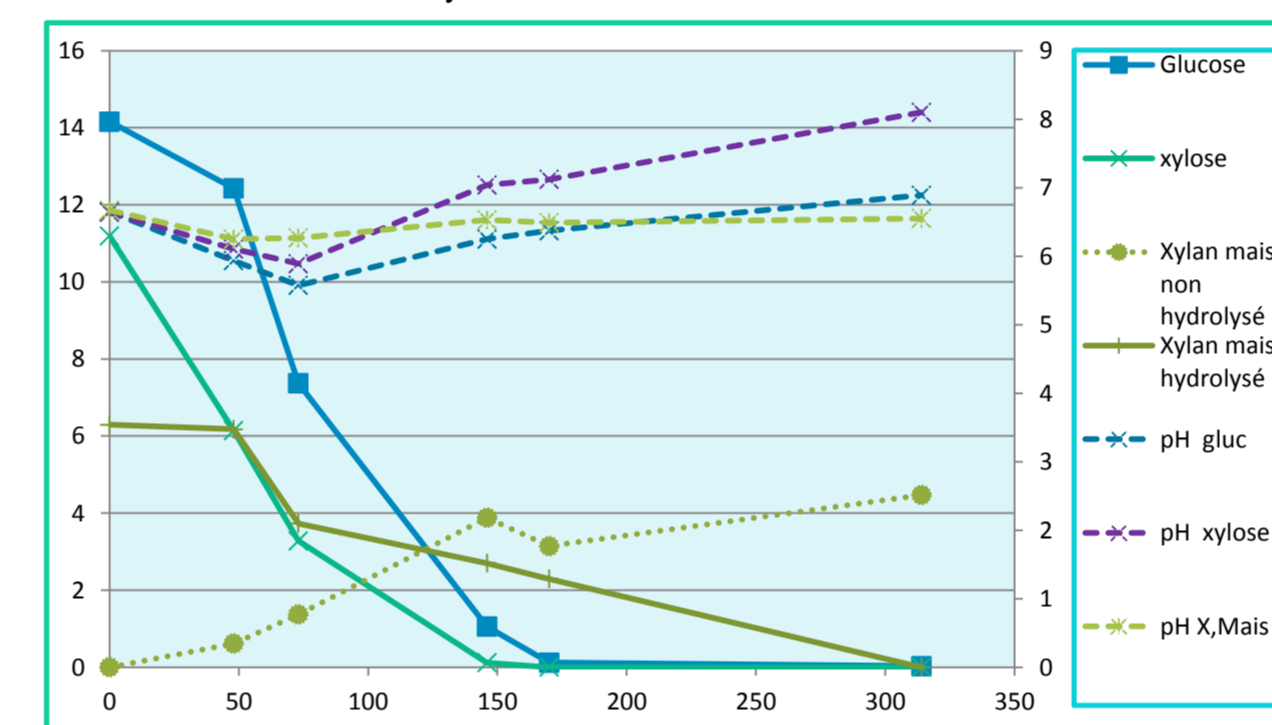
1-Echantillonnage et isolement

Le criblage a conduit à deux isolats présentant une activité endocellulase importante.



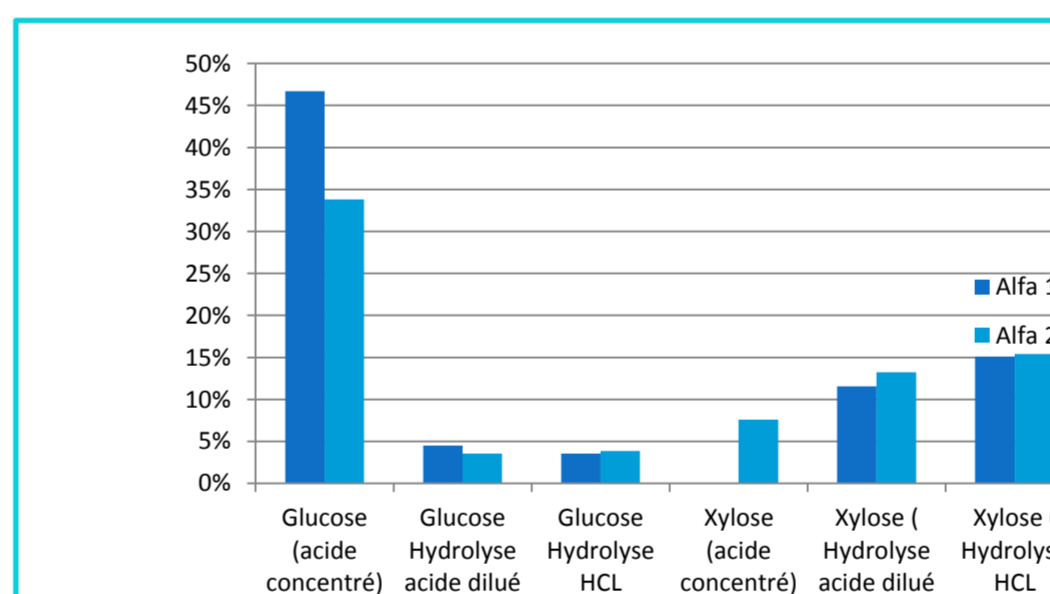
Activité CMCCase de la souche S03 (A) et S04 (B) sur gélose CMC indiquée par la zone claire entourant les colonies

2- Culture liquide en fioles

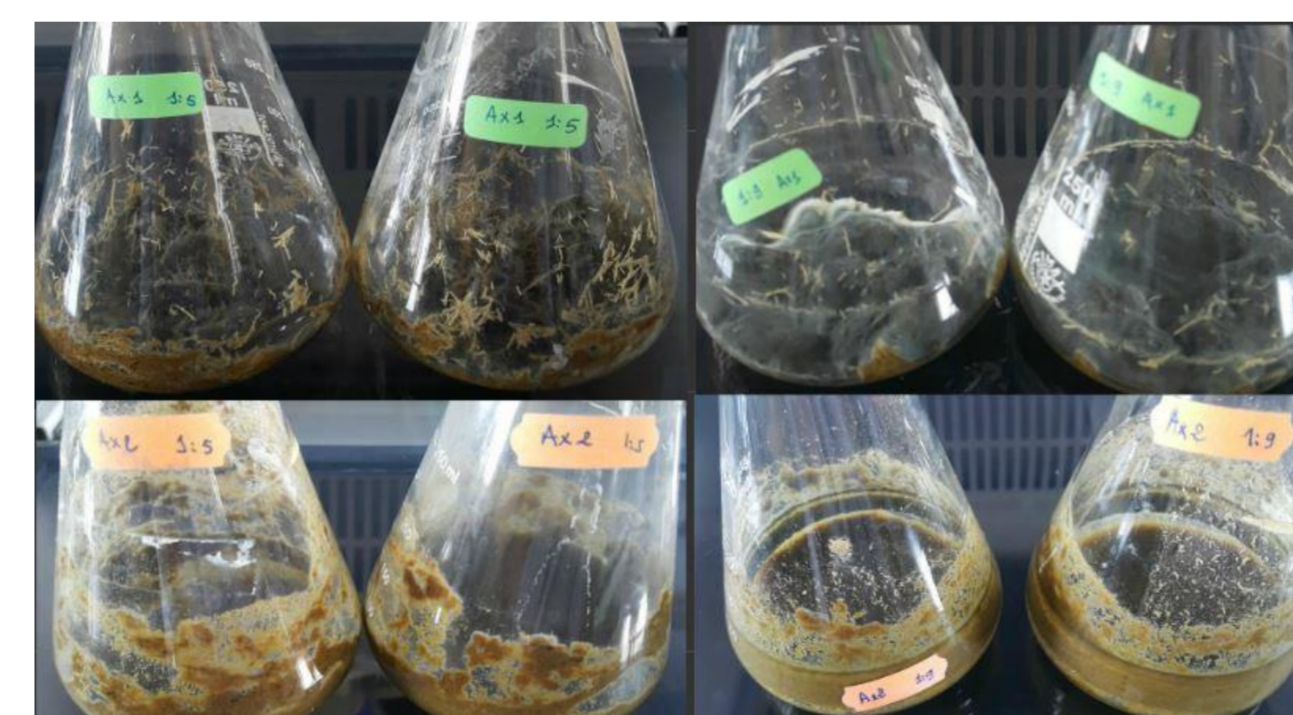


Evolution du pH et de la concentration du glucose, xylose et xylan de maïs des trois cultures

3- solid state fermentation « Alfa »



Concentration du glucose et xylose des deux échantillons d'Alfa avec les trois méthodes d'hydrolyse: acide concentré, acide dilué et hydrolyse HCL



Les fioles de SSF après 86h de fermentation

4- Fermentation et scale up

cinq bioréacteurs ont été démarrés avec la même souche; trois de 02 litres, et deux de 20 litres.

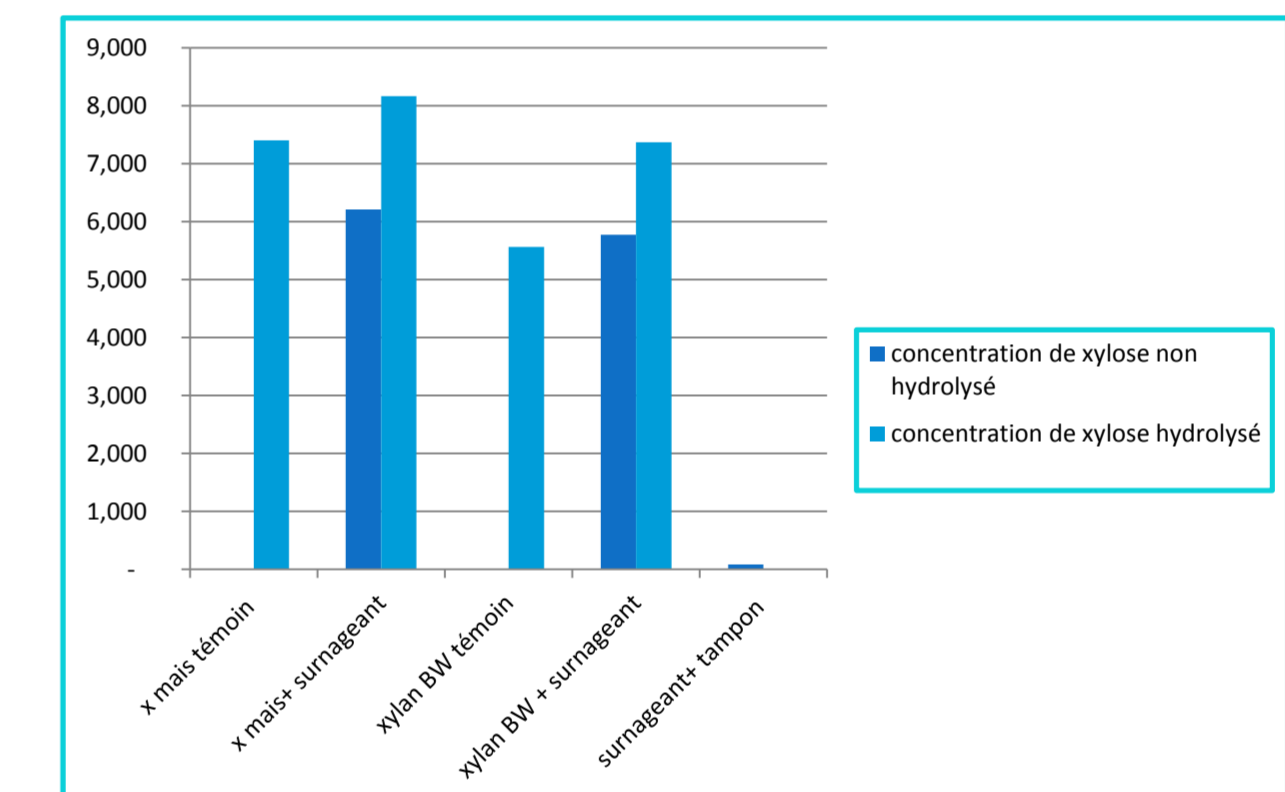
Le premier (02litres) a été démarré avec la xylose comme substrat de départ (200 Rpm, 30°C), Le deuxième bioréacteur (2 litres) est démarré avec les mêmes conditions que le premier, deux fed batch avec le Xylan de maïs ont été réalisés,

L'effet de la vitesse d'agitation sur la biomasse et la morphologie des floccs a été testé dans le troisième bioréacteur (02litres) en augmentant la vitesse de rotation jusqu'à 650 Rpm, le substrat initial qui a été utilisé est le xylan de maïs, un seul fed batch avec le même substrat a été fait durant la période de fermentation.

Ensuite un quatrième bioréacteur de 20L a été démarré avec le xylose comme substrat initiale, aucun fed batch n'a été fait, la vitesse de rotation a été fixé à 400 Rpm

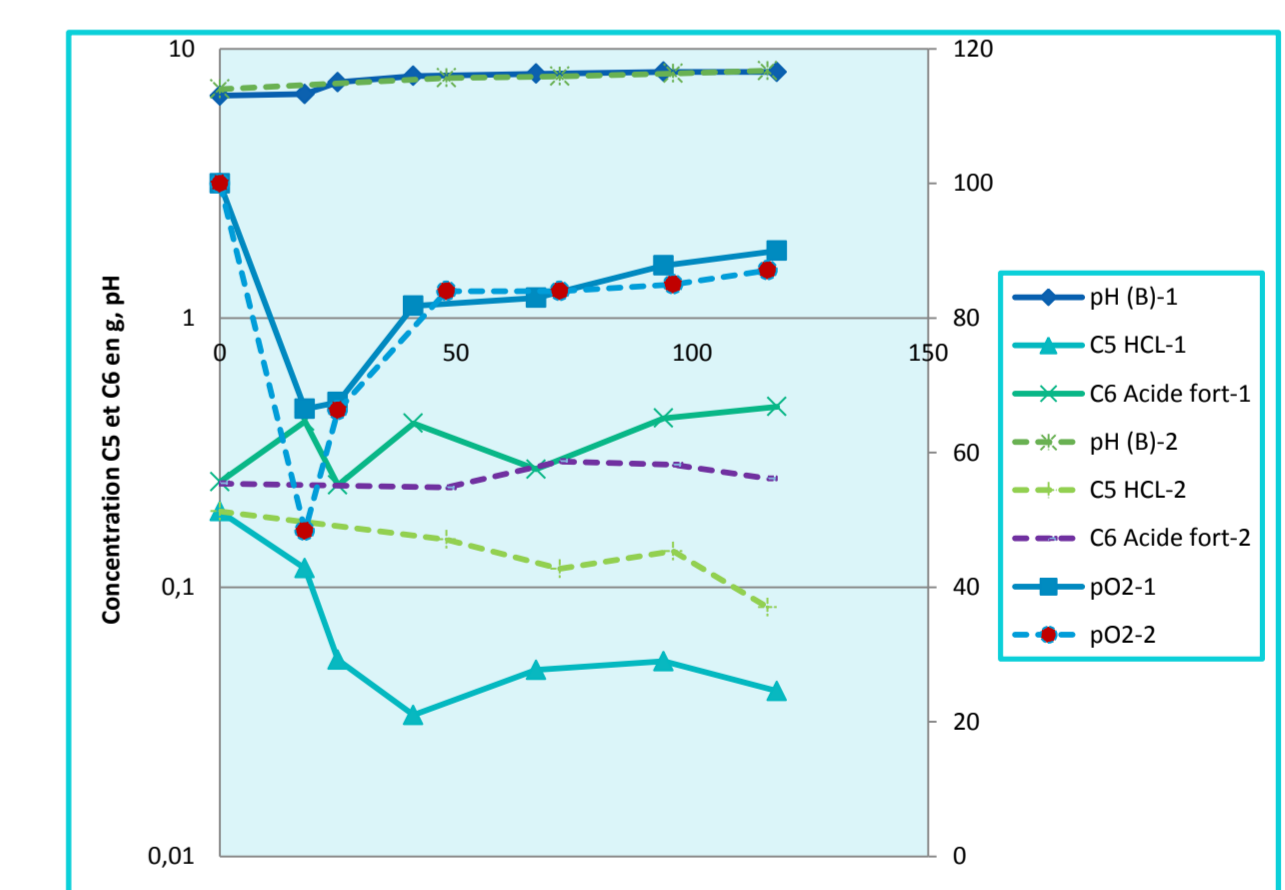
le dernier bioréacteur (20L) a été démarré aussi avec le xylose et une vitesse d'agitation de 700 Rpm et un seul Fed batch avec le même substrat.

5- hydrolyse enzymatique



concentration de xylose sans et avec l'hydrolyse HCL des échantillons xylan de maïs et xylan beechwood, leurs témoins et le surnageants +tampon

6- La fermentation de l'Alfa (Bioréacteurs)



Evolution du PO2, pH, Concentration en C6 et C5 dans les deux bioréacteurs Alfa-1 et Alfa-2

CONCLUSION

la S03 se développe dans les substrats simples (glucose et xylose) et complexes (xylan de maïs) et dans les substrat naturel (alfa) comme seule source de carbone

la S03 secrète des enzymes extracellulaire

Il est préférable d'ajuster la vitesse d'agitation et réduire la concentration initiale en substrat > quantité de biomasse formée réduite > optimisation des performances améliorée (Titica., 2004).