



HAL
open science

Etude de la production de lipides par Streptomyces à partir de résidus lignocellulosiques

Marine Froissard, Sabine d'Andrea, Stéphanie Baumberger, Valérie Méchin, Alexandre Cukier, Marie-Joëlle Virolle, Fabien Coze, Thierry Dulermo, Imen Chaieb

► **To cite this version:**

Marine Froissard, Sabine d'Andrea, Stéphanie Baumberger, Valérie Méchin, Alexandre Cukier, et al.. Etude de la production de lipides par Streptomyces à partir de résidus lignocellulosiques. [Contrat] 2012. hal-02810981

HAL Id: hal-02810981

<https://hal.inrae.fr/hal-02810981>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

RAPPORT FINAL CONTRAT ONIDOL 920P00

Etude de la production de lipides par *Streptomyces* à partir de résidus lignocellulosiques

1 CONTEXTE ET OBJECTIFS

Dans le contexte actuel d'épuisement des ressources fossiles et de protection de l'environnement, la valorisation énergétique des huiles issues de la biomasse et la chimie verte prennent de l'importance. En effet, ces huiles et leurs dérivés biodégradables peuvent venir en remplacement des produits d'origine fossile. Ils sont de plus en plus retrouvés dans les produits de grande consommation (savon, produits d'entretien) ou industriels (solvants, lubrifiants). Deux sources sont envisagées, celles des huiles végétales déjà bien implantées, et celle des huiles produites à partir de microorganismes, actuellement en plein essor. Parmi les microorganismes, *Streptomyces lividans* est une bactérie des sous-bois qui présente l'avantage d'être capable d'exploiter des matières premières ligno-cellulosiques comme source de carbone pour sa production de biomasse (Antai et al., 1981 ; Davis et al., 2010). Par ailleurs, dans certaines conditions de culture, mises au point dans l'équipe Métabolisme Énergétique des *Streptomyces*, il a été montré que cette bactérie était capable de produire de l'huile sous forme d'inclusions cytoplasmiques, les corps lipidiques (Kaddor et al., 2009). Ce travail a reçu le soutien financier du PRES Universud pour 2010 et les premiers résultats montrent que la souche *Streptomyces lividans* TK24 stocke jusqu'à 25% de sa masse sèche en acides gras (majoritairement des acides gras impairs en C15 et branchés), essentiellement sous forme de triglycérides.

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer à l'échelle du laboratoire la capacité de cette bactérie à produire ces lipides lorsque le substrat fourni est un résidu lignocellulosique d'origine agricole.

2 CONTRIBUTIONS ET COMPETENCES

Equipe Dynamique et Structure des Corps Lipidiques (DSCL) - UMR1318 IJPB	
Marine FROISSARD, CR INRA	Connaissances sur les lipides de réserve
Sabine D'ANDREA, MC AgroParisTech	Procédés d'extraction et d'analyse des acides gras totaux et des classes de lipides

Equipe Lignines et Tanins : Structures, Assemblages et Valorisation - UMR1318 IJPB	
Stéphanie BAUMBERGER, MC AgroParisTech	Connaissances sur la lignocellulose
Valérie MECHIN, CR INRA	Procédés d'extraction et d'analyse des sucres et des lignines
Alexandre CUKIER CDD ingénieur INRA	

Equipe Métabolisme énergétique des <i>Streptomyces</i> (MES) – UMR 8621 IGM	
Marie-Joëlle VIROLLE, DR CNRS	Connaissance de <i>Streptomyces</i>
Fabien COZE, Thésard	Procédés de culture de <i>Streptomyces</i> en flacons et en fermenteurs

Postes financés sur projet ONIDOL	
Thierry DULERMO, Post doctorant	
Imen CHAIEB M2 AgroParisTech	

3 PROGRAMME DE TRAVAIL

Ce rapport ne concerne que la partie A et le point 1 (substrats lignocellulosiques) du programme affiché dans le contrat et décrit ci-dessous

Partie A : PRE-TRAITEMENT DU SUBSTRAT

1. Pré-traitement de substrats et évaluation de leur utilisation par *Streptomyces lividans* :

Substrats potentiels : plantes entières de colza, tournesol, soja, rafles de colza, maïs, blé, co-produits de bioraffinerie (glycerol/acides gras).

1.1. Analyse de la composition des différentes formes de lignocellulose

1.2. Test de l'efficacité des différents pré-traitements (Moyens mécaniques, physiques et enzymatiques).

1.3. Evaluation de la croissance bactérienne sur les différents substrats pré-traités.

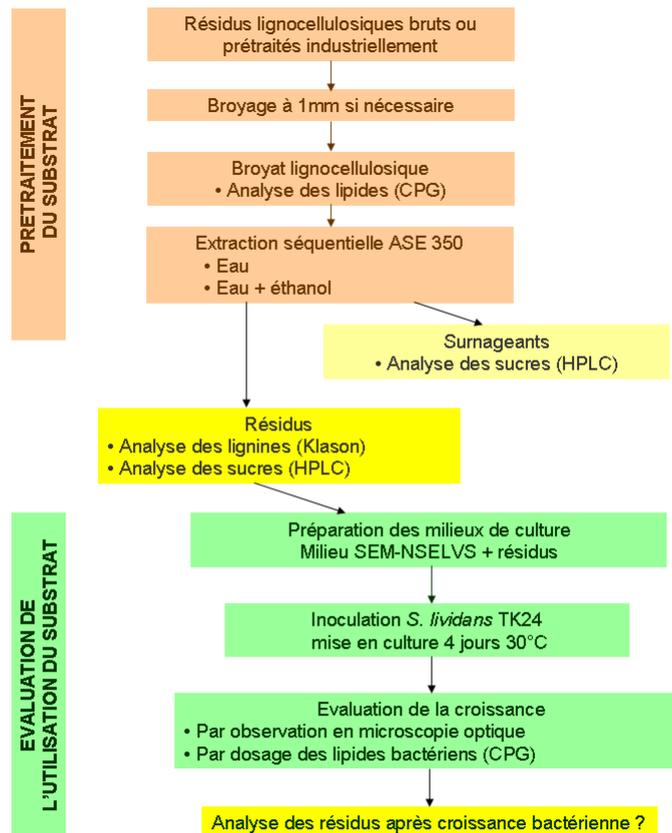
4 DEMARCHE EXPERIMENTALE MISE EN PLACE POUR LE PROJET

Pour ce projet, nous avons mis en place une démarche expérimentale comprenant 2 grandes étapes : la préparation et la caractérisation des substrats lignocellulosiques et la mise au point du suivi de croissance de *Streptomyces* sur un substrat lignocellulosique.

Etape 1 : Préparation et caractérisation des différents substrats lignocellulosiques nécessaires à l'étude. Les substrats natifs (paille de blé, tige de maïs, de colza et de tournesol) ont été soumis à une séquence d'extraction à l'eau et à l'éthanol visant à déterminer leur teneur en composés solubles et à récupérer des résidus présentant des aptitudes à la bioconversion contrastées. La composition globale des différents résidus a été déterminée par des méthodes utilisées en routine à l'IJPB (dosage gravimétrique des lignines par la méthode Klason, dosage des polysaccharides par chromatographie d'échanges d'ions après hydrolyse acide). De façon à élucider la structure des lignines de tournesol et de colza encore peu connues, les échantillons ont été analysés par dépolymérisation analytique.

Etape 2 : Mise au point du suivi de croissance de *Streptomyces* sur un résidu lignocellulosique. Le suivi a été effectué par une évaluation de la biomasse produite à partir de cultures en fioles grâce au dosage des acides gras totaux, en particulier des acides gras branchés qui sont spécifiquement retrouvés chez les procaryotes.

Ci-dessous le plan d'expérience détaillé



5 MATERIELS

5.1 La biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique est constituée de trois types de polymères pariétaux : la cellulose, les hémicelluloses, et la lignine dans des rapports différents selon les espèces.

8 types de substrats lignocellulosiques ont été utilisés pour les expériences

- Deux échantillons de maïs (sans épi ni feuilles récoltés au stade maturité) : un échantillon issu d'un maïs mutant naturel *bm3* (échantillon VM144) et un échantillon issu de son isogénique normal (échantillon VM141). Les mutations naturelles *bm* (*brown-midrib*) affectent la quantité et la composition de la lignine. La teneur faible en lignine chez le maïs mutant augmente l'accessibilité aux sucres et peut éventuellement être un avantage pour la croissance de *Streptomyces* sur ce substrat.
- Deux échantillons de paille de blé : un échantillon de paille de blé de variété Apache native lavée à l'eau (échantillon ARD) et un échantillon de paille explosée

à la vapeur lavée à l'eau obtenu à partir de la paille de blé native (échantillon PEXL).

- Deux échantillons contrastés de tiges de tournesol fournis par l'Onidol. L'échantillon 1 correspond à du matériel récolté fraîchement en jardin (tiges fines et blanches). L'échantillon 2 correspond à du tournesol agricole dont les tiges (grosses et foncées) ont été stockées en benne après récolte.
- Deux échantillons de tiges de colza agricole fournis par l'Onidol correspondant à deux années de récolte (2009 et 2010)

5.2 Souche de *Streptomyces*

Les spores de *Streptomyces lividans* TK24 ont été fournies par l'équipe Métabolisme Energétique des Streptomyces (MES).

5.3 Milieux de culture

Les pailles ont été stérilisées dans de l'eau MilliQ. Les composants du milieu Streptomyces Equilibrated Medium- Nitrogen Limitation Sulfur Excess Vitamined Saccharose (SEM-NSELVS) modifié pour cette étude ont été ajoutés à 19 mL de solution contenant les pailles

SEM-NSELVS modifié	Pour 1 L	Pour 20 mL
Solution Mix1	40 mL	800 µL
Acide citrique 1M	2 mL	40 µL
FeSO4 (30 g/L dans HCl 0.1 M)	1.275 mL	25.5 µL
Solution d'oligo-éléments	0.765 mL	15.3 µL
Thiamine-HCl (5 g/L)	1 mL	20 µL
CaCl2 (3.4 g/L)	10 mL	200 µL
Biotine (0.05 g/L)	1 mL	20 µL
NaOH 5M	3 mL	60 µL
KH ₂ PO ₄	10 mL	200 µL
Riboflavine (0.4 g/L)	5 mL	100 µL
Solution de vitamines	5 mL	100 µL

Mix1 (40 mL) : TES, 5.23 g ; (NH₄)₂SO₄, 5.69 g ; MgSO₄, 0.425 g

Solution d'oligo-éléments (1 litre) : CuSO₄, 3.9 g ; ZnSO₄, 4.4 g ; MnSO₄, 7.5 g ; Na₂MoO₄, 0.5 g ; CoCl₂, 1 g ; KI, 0.33 g ; AlCl₃, 0.4 g ; H₃BO₃, 0.2 g ; NiCl₂, 0.5 g ; HCl 32%, 10 mL

Solution de vitamines (500 mL) : HEPES, 1.192 g ; Thiamine-HCl, 0.2 g ; Acide pentothénique de Ca, 0.2 g ; Acide folique, 0.025 g ; Acide p-aminobenzoïque, 0.025 g ; Pyridoxine HCl, 0.2 g ; Nicotinamide, 0.2 g ; acide nicotinique, 0.00625 g.

6 METHODES

6.1 Broyage des substrats lignocellulosiques

Les échantillons de tournesol et de colza ont été broyés à 1mm.

6.2 Extraction des matières premières lignocellulosiques

L'objectif de cette extraction est d'obtenir des substrats contenant des teneurs et composition en composés extractibles variables et de disposer d'échantillons dépourvus d'extractibles en vue du dosage des lignines. Les échantillons ont été soumis à une extraction séquentielle par un appareil d'extraction par solvant accélérée (ASE 350, Dionex) de façon à isoler et récupérer des fractions solubles et les résidus solides correspondants (il faudra faire un schéma). La première étape consiste à extraire les composés hydro-solubles (sucres et composés azotés) par 3 cycles d'extraction à l'eau à 100°C pendant 7 min sous une pression de 110 bar. La deuxième étape consiste à extraire du résidu d'extraction à l'eau les composés plus hydrophobes (composés phénoliques, lipides polaires et protéines alcoolosolubles), par 3 cycles d'extraction à l'éthanol à 100°C pendant 7 min sous une pression de 110 bar. Les résidus solides issus de chaque étape (étape d'extraction à l'eau et étape d'extraction à l'éthanol) sont récupérés et séchés à l'étuve à 50°C pendant 48 heures (poids constant) pour la suite des analyses. Les surnageants correspondants sont stockés à -20°C pour la suite des analyses.

6.3 Dosage de la lignine

La lignine est dosée par la méthode Klason selon le protocole de Dence (1992). Cette méthode gravimétrique consiste à éliminer sélectivement les composés autres que les lignines par deux étapes successives d'hydrolyse acide puis à peser la masse de résidu solide récupéré après filtration. Elle conduit à une détermination de la lignine dite « Lignine Klason » qui ne prend pas en compte la fraction de lignine acidosoluble. Le dosage doit être conduit en absence de composés extractibles susceptibles de se condenser sur les lignines au cours de l'hydrolyse et de conduire ainsi à une surestimation de la teneur en lignine. 300 mg de résidu sont mis en suspension dans 3 ml d'une solution d'acide sulfurique concentrée (H₂SO₄, 72 % p/v) pour hydrolyser et dissoudre tous les composés autre que la lignine. La suspension est agitée toutes les demi-heures pendant deux heures à

une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, puis diluée avec 43 ml de l'eau afin d'obtenir une concentration finale de H_2SO_4 de 5 % (p/v). Elle est ensuite mise à reflux à 100°C . Le résidu insoluble correspondant à la lignine Klason (LK) est filtré sur un creuset et muni d'un filtre en fibre de verre (Whatman, glass micro fibre). L'ensemble du résidu et le filtre sont séchés une nuit à 100°C dans l'étuve. La masse du résidu est déterminée après avoir refroidi à l'abri de l'humidité. La teneur en lignine est exprimée par rapport à la masse de résidu (%LK). Pour chaque échantillon, les essais sont réalisés en double.

6.4 Dosage des sucres neutres

La méthode utilisée consiste à doser par chromatographie liquide d'échange d'ions les oses neutres libérés par hydrolyse acide de la fraction glucidique (conversion des polysaccharides en sucres simples). Le dosage est effectué par la méthode de l'étalonnage interne à l'aide d'un étalon ajouté après hydrolyse et d'une solution de référence permettant de calculer les coefficients de réponse des différents sucres. Cette méthode permet de s'affranchir des facteurs de dilution et des variations de volume injecté. Elle nécessite cependant de vérifier la linéarité du détecteur dans la gamme de concentration utilisée.

6.5 Dosage des sucres neutres contenus dans les résidus d'extraction

Un échantillon de résidu d'environ 10 mg est mis en suspension dans 125 μl d'une solution d'acide sulfurique à 72 % (p/v) pendant 1 heure à température ambiante puis pendant 2 heures au bain marie à 100°C après avoir ajouté 1,4 ml H_2O et 100 μl d'une solution de fucose (étalon interne) à 252 mg/ml. La suspension est filtrée sur membrane (0,2 μm , Anotop10 IC, Whatman) puis diluée avant injection. Le filtrat (15 μl de l'hydrolysate et 1,5 ml H_2O) est analysé par chromatographie échangeuse d'anions couplée à un détecteur ampérométrique pulsé (colonne : 4*250mm Carbopac PA1, Dionex, NaOH 4 mM, 1ml.min⁻¹, électrode d'or). Les oses neutres (glucose, mannose, arabinose, galactose et xylose) sont dosés par la méthode de l'étalonnage interne en utilisant les coefficients de réponse déterminés à l'aide d'une solution de composés de références à 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et en utilisant le fucose comme étalon interne. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique de sucre libéré par rapport au résidu analysé. Les essais sont réalisés en double.

6.6 Dosage des sucres neutres contenus dans les surnageants d'extraction à l'eau

Deux millilitres de chaque surnageant sont prélevés puis centrifugés (Centrifuge 5417 R) pendant 10 min à 4°C et à 5000 rpm, Le filtrat est analysé par chromatographie échangeuse d'anions dans les mêmes conditions que précédemment. Aucun étalon interne n'ayant été ajouté pour l'analyse des surnageants, les résultats sont exploités de façon relative.

6.7 Dosage des acides gras totaux par chromatographie en phase gazeuse

Avant toute extraction les échantillons sont placés dans un lyophilisateur pendant 3 jours puis mis en suspension avec une solution de l'étalon interne C 12:0 qui permet une quantification des acides gras, et 1 volume d'une solution d'H₂SO₄ à 2.5% dans du méthanol (volume adapté à la quantité de matériel). La suspension est placée pendant 90 min au bain marie à 80°C. Après refroidissement, 1.5 volume de NaCl 0.9% et 1/8 volume d'hexane sont ajoutés à la suspension pour extraire les esters méthyliques d'acide gras. Après centrifugation, la phase organique est récupérée et diluée si nécessaire. L'échantillon est analysé par CPG chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Agilent 7890A avec une colonne Factor Four VF-23ms 30m*0.25 mm. La quantification est effectuée par ionisation de flamme à 270 °C

6.8 Analyse structurale des lignines par thioacidolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse

L'analyse structurale des lignines a été effectuée sur les échantillons extraits (5-10 mg), par dépolymérisation analytique selon un protocole publié (Lapierre et al., 1992).

7 RESULTATS

7.1 Caractérisation des substrats lignocellulosiques

Les résultats relatifs aux graminées (paille de blé et tige de maïs) ayant fait l'objet du rapport de stage d'Imen Chaieb, nous nous focalisons ici sur les résultats relatifs aux tiges de colza et de tournesol pour lesquels peu de données sont disponibles dans la littérature. Les spécificités de ces matières premières par rapport aux substrats issus de graminées sont néanmoins discutées.

7.1.1 Composition en extractibles, lignines et polysaccharides

La teneur en composés extractibles à l'eau présente une forte variabilité (intra et inter espèce) (teneur comprise entre 16,7 et 27,3%, Tableau 1). Ces composés sont principalement des sucres, des hémicelluloses hydrosolubles et des protéines polaires. L'extraction à l'éthanol consécutive à l'extraction à l'eau ne permet d'extraire que 1 à 2% de composés supplémentaires (composés phénoliques de faibles masses et protéines alcoolosolubles). Les teneurs en lignines et en polysaccharides ont été déterminées sur chacun des résidus d'extraction et exprimés par rapport à la masse de résidu sec.

Tableau 1. Teneurs en composés extractibles (moyenne et écart-type) des échantillons de colza et de tournesol (% massique / matière initiale).

	Composés extractibles à l'eau	Composés extractibles à l'eau puis éthanol
Colza 2009	21,8 (0,3)	22,7 (1,3)
Colza 2010	16,7 (2,8)	18,8 (1,8)

Tournesol lot 1	27,3 (0,8)	28,5 (0,9)
Tournesol lot 2	24,8 (1,0)	25,6 (0,6)

Les substrats obtenus après extraction à l'eau ou à l'eau puis éthanol contiennent de 18 à 23% de lignines (Tableau 2). Les variations inter années pour le colza et inter lots pour le tournesol sont de l'ordre de 6%. Suite à la solubilisation partielle de la lignine dans l'éthanol, l'extraction à l'eau puis à l'éthanol entraîne une légère diminution de la teneur en lignines, les teneurs les plus faibles étant obtenues pour le lot 1 de tournesol (18,6%) et pour le colza 2010 (19,9%). La teneur en lignine décrite dans la littérature pour le tournesol non extrait (Caparros et al. 2008) est en accord avec la valeur obtenue pour le lot 2 de tournesol extrait à l'eau. En effet, en prenant en compte la teneur en extractible de 24,8% (Tableau 1) et le fait que la lignine n'est pas soluble dans l'eau, on calcule une teneur en lignine du matériel non extrait de 17,2%. En revanche, les valeurs obtenues pour les résidus de tiges de colza sont beaucoup plus élevées que les valeurs mentionnées dans la littérature (6,9 %, Kang et al. 2012). Cette différence peut résulter d'une différence de stade de développement du matériel récolté, de telles variations de teneur en lignines ayant été observées pour des échantillons de maïs récoltés à différents stades.

Tableau 2. Teneurs en lignines (moyenne et écart-type) des échantillons de colza et tournesol après extraction des composés solubles (% massique / résidu d'extraction)

	Extraction H ₂ O	Extraction H ₂ O puis Ethanol
Colza 2009	22,4 (0,1)	21,5 (0,2)
Colza 2010	21,1 (0,1)	19,9 (0,2)
Tournesol lot 1	19,3 (0,4)	18,6 (0,3)
Tournesol lot 2	22,9 (0,5)	22,1 (0,1)
Littérature :		
Tournesol [1]	19,9*	
Colza [2]	6,9*	

[1] Caparros et al. 2008.

[2] Kang et al. 2012.

* teneur exprimée par rapport à la matière première non extraite

Les principaux oses détectés après hydrolyse acide des échantillons de colza et de tournesol sont le xylose et le glucose (> 90% des sucres totaux, Tableau 3), respectivement issus des hémicelluloses et de la cellulose de la paroi végétale. A côté de ces principaux sucres, du mannose, du galactose et de l'arabinose issus des hémicelluloses ont été détectés dans tous les échantillons. La teneur en sucres totaux (cellulose + hémicellulose) varie de 52 à 58%. Les différences inter années et inter lots sont ici encore de l'ordre de 6%. L'extraction à l'eau puis éthanol entraîne une augmentation de la teneur en sucres en accord avec la diminution de la teneur en lignines. Les résultats obtenus par Caparros et al. (2008) pour le tournesol non extrait indiquent une plus forte proportion de xylose, donc d'hémicelluloses, en accord avec le fait qu'une partie des hémicelluloses est soluble dans l'eau. Par ailleurs, Kang et al. (2012) mentionnent des teneurs en cellulose et hémicellulose respectivement de 34% et 19% pour des tiges de colza, en accord avec nos résultats.

Tableau 3. Teneurs en sucres totaux / glucose / xylose (moyenne et écart-type) déterminées après hydrolyse acide des échantillons de colza et tournesol après extraction des composés solubles (% massique / résidu d'extraction)

	Extraction H ₂ O	Extraction H ₂ O puis Ethanol
Colza 2009	55,3 (2,6) / 35,8 (1,5) / 15,7 (1,0)	58,2 (4,0) / 37,4 (2,5) / 16,7 (1,4)
Colza 2010	53,0 (1,9) / 33,8 (1,0) / 14,9 (0,7)	54,3 (3,2) / 34,9 (2,1) / 15,4 (1,0)
Tournesol lot 1	57,5 (3,8) / 37,8 (2,3) / 16,4 (1,3)	56,6 (4,7) / 37,0 (2,7) / 16,3 (1,6)
Tournesol lot 2	52,2 (0,4) / 35,3 (0,2) / 14,4 (0,4)	56,5 (4,1) / 38,1 (2,5) / 15,5 (1,4)
Littérature :		
Tournesol [1]	48,1 (0,3) / 33,8 (0,3) / 23,9 (0,3)	

[1] Caparros et al. 2008

* teneur exprimée par rapport à la matière première non extraite

Conclusion sur la composition des tiges de colza et de tournesol :

Les échantillons présentent une forte variabilité en termes de teneur en composés extractibles à l'eau mais une composition en lignines et hémicellulose après extraction relativement constante. Les résultats concernant le tournesol sont en accord avec les rares données de la littérature. Aucune donnée n'étant disponible sur la structure des lignines de tiges de colza et de tournesol (contrairement aux tiges de graminées), nous avons effectué une analyse structurale de ces lignines par thioacidolyse de façon à évaluer la variabilité inter et intra espèce.

7.1.2 Structure des lignines

La lignine contenue dans les parois végétales est un polymère fortement branché contenant des liaisons inter-monomères de type carbone-carbone et éther. La proportion des liaisons éthers, et notamment des liaisons dites β -O-4 (par référence à la position des carbones des unités monomères impliqués dans la liaison), est connue pour conditionner de nombreuses propriétés des lignines, telles que leurs propriétés thermiques, leur réactivité au cours des traitements technologiques et leur effet barrière sur la dégradabilité enzymatique de la cellulose. Ainsi, il a été montré récemment que la présence de lignines riches en liaisons β -O-4 était corrélée à une faible dégradabilité enzymatique de la paroi végétale de la tige de maïs (Zhang et al. 2011). La thioacidolyse est une méthode chimique de dépolymérisation des lignines permettant de rompre sélectivement les liaisons de type β -O-4. Le dosage des unités monomères libérées par cette dépolymérisation permet d'évaluer la proportion de ce type de liaisons dans le polymère initial. Le rendement de thioacidolyse correspond au nombre de μ moles d'unités monomères libérées par gramme de lignine contenue dans le résidu.

Les figures 1 et 2 indiquent que le colza et le tournesol présentent des profils de lignine similaires, l'extraction à l'éthanol consécutive à l'extraction à l'eau n'ayant dans les deux cas pas d'effet sur la structure des lignines. En accord avec le fait que le colza et le tournesol sont des angiospermes, les unités contenues dans la lignine sont principalement de deux types : guaiacyle (G) et syringyle (S) (Figure 1 et Figure 2). Les unités de type *p*-hydroxycinnamyle (H) ne sont détectées qu'à l'état de trace. Les rendements totaux sont compris entre 2000 et 2500 μ mol/g, ce qui correspond à une

proportion d'unités liées uniquement en β -O-4 assez élevée comparée aux rendements obtenus pour des tiges de graminées (de l'ordre de 500 $\mu\text{mol} / \text{g}$; Zhang et al. 2011). Le rapport entre la proportion d'unités S et la proportion d'unités G est également plus élevé (1,7 contre 1,1 en moyenne). Ce profil de lignines présentant une forte proportion d'unités S et de liaisons de type β -O-4 s'apparente à celui de lignines de feuillus tels que l'eucalyptus (Baumberger et al. 2007). Les rendements légèrement plus faibles de l'échantillon de tournesol lot 2 comparé au lot 1 (Figure 1) peuvent être liés au taux de lignification plus élevé pour cet échantillon.

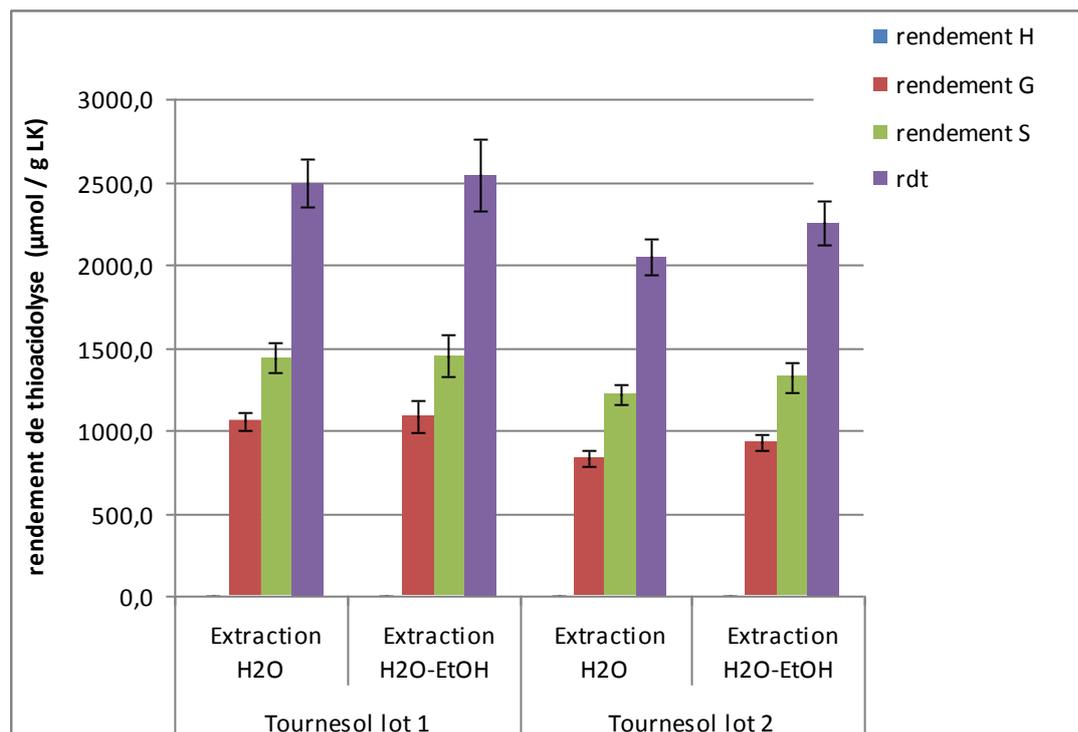


Figure 1. Rendements de thioacidolyse (unités H, G, S et rendement total (rdt)) obtenus pour les échantillons de tournesol extraits.

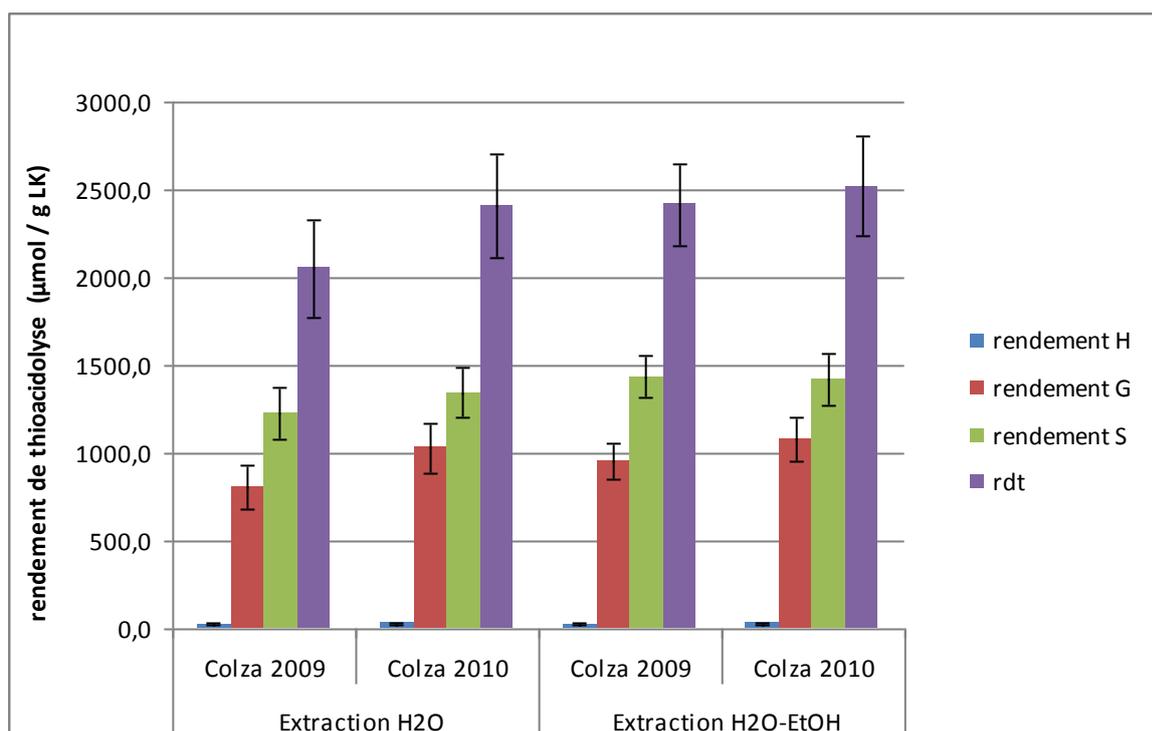


Figure 2. Rendements de thioacidolyse (unités H, G, S et rendement total (rdt)) obtenus pour les échantillons de colza extraits.

7.1.3 Acides gras totaux

Afin d'effectuer un suivi de croissance rigoureux par dosage des acides gras (AG) totaux, il est nécessaire de différencier les AG provenant des substrats de ceux spécifiques de bactéries. Pour cela la composition en AG totaux des substrats lignocellulosiques a été déterminée. Un échantillon (50 mg) de chaque substrat brut a été traité pour obtenir des esters méthyliques d'AG. Les analyses révèlent que les pailles contiennent des AG saturés et insaturés, avec un nombre de carbones pair, égal ou supérieur à 14 (en vert dans le tableau). Des résultats antérieurs, obtenus par l'équipe DSCL, ont montré que la souche TK 24 de *Streptomyces* contient des AG avec un nombre de carbones pairs mais aussi des AG impairs et branchés (en bleu dans le tableau). Cette comparaison révèle l'absence de C12 :0 dans les échantillons végétaux mais aussi chez *Streptomyces* ce qui a permis de l'utiliser comme étalon interne pour la suite du travail et de confirmer que la quantification des acide gras branchés permettra bien d'obtenir un suivi de croissance fiable.

Acide gras	Substrats lignocellulosiques	<i>Streptomyces</i>
C12 :0	Absent = étalon interne	
Iso C14 :0		
C14 :0		
C14 :1		
Iso C15 :0		
Anteiso C15 :0		
C15 :0		
Iso C16 :0		
IsoC16 :1		
C16 :0		

C16 :1		
Iso C17 :0		
Anteiso C17 :0		
C17 :0		
Iso C17 :1		
C17 :1		
C18 :0		
C18 :1		
C18 :2		
C18 :3		
C20 :0		
C22 :0		

7.2 Comparaison des substrats lignocellulosiques

Alors que les échantillons colza 2009 et colza 2010 ne présentent pas de différence significative en termes de composition et de structure des lignines, l'échantillon de tournesol lot 1 se distingue du lot 2 par une plus faible teneur en lignines, une plus forte teneur en hémicelluloses et plus forte teneur en composés extractibles qui pourraient correspondre à un stade de développement plus précoce. Les variations de composition et de structure observées au sein des différents résidus d'extraction de tournesol et de colza restent néanmoins beaucoup plus faibles que les différences entre ces échantillons et les échantillons de graminées tels que la paille et le maïs. Ces échantillons de graminées présentent plusieurs spécificités : une teneur en lignines plus faible (12-15% contre 19-23%), des lignines environ 4 fois moins riches en liaisons β -O-4 (lignines a priori moins linéaires avec un effet barrière plus faible) et la présence d'acide p-hydroxycinnamiques responsables d'une réticulation de la paroi.

7.3 Tests de croissance sur pailles de blé et maïs

7.3.1 Cultures et microscopie

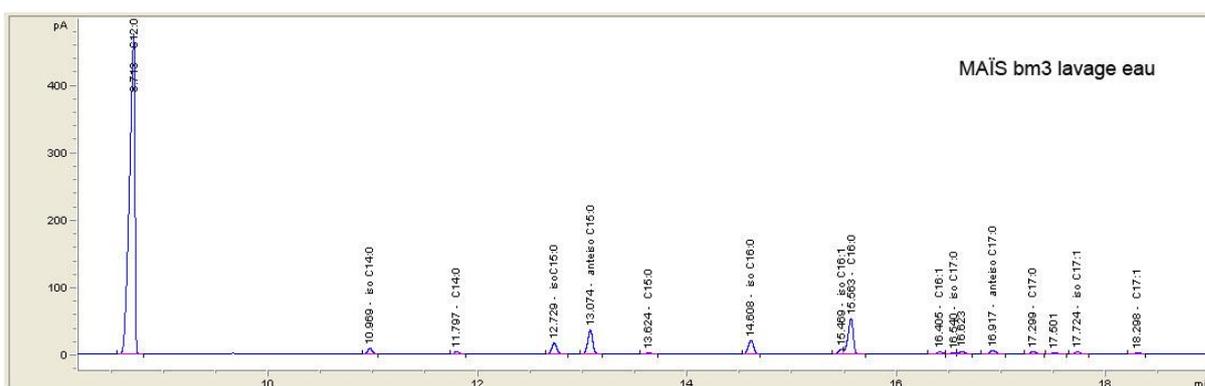
Lors de cette expérience, les pailles et résidus (1.8 g) ont été stérilisés dans 95 mL d'eau MilliQ. 19 ml de ces solutions ont été prélevés et complétés avec le mélange SEM-NSELVS modifié. L'équivalent de 0.36g de chaque paille ou résidu d'extraction était présent dans les 20 mL de culture. Ces 20 mL ont été ensemencés avec $2 \cdot 10^6$ spores et mis en culture dans des erlenmeyers de 100 mL à picots 4 jours à 30°C.

Après croissance, les cultures ont été centrifugées et la croissance a été évaluée sur un aliquote des culots par microscopie optique.

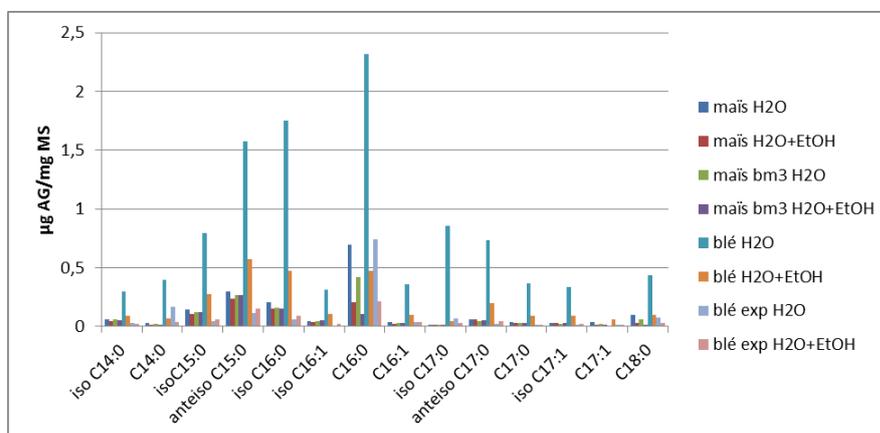
Echantillons	Croissance des Streptomyces
Paille de blé (H ₂ O)	+++
Paille de blé (H ₂ O+ETOH)	++
Paille de blé explosée à la vapeur(H ₂ O)	-
Paille de blé explosée à la vapeur (H ₂ O+ETOH)	-
Mais non mutant (H ₂ O)	++
Mais non mutant (H ₂ O+ETOH)	+
Mais bm3 (H ₂ O)	+

7.3.2 Analyse des acides gras totaux

Chaque fraction a ensuite été lyophilisée pour procéder à l'analyse des acides gras (AG) totaux. 50 mg (ou le matériel disponible : 2 mg pour la paille de blé H₂O et 25 mg pour la paille de blé H₂O+EtOH) ont été traités pour extraire les esters méthyliques d'AG en présence de 200 µg de C12 :0. Ci-dessous le chromatogramme correspondant aux AG totaux de *Streptomyces* après croissance sur le maïs *bm3* lavé à l'eau. Il est possible de détecter les pics spécifiques (formes d'AG branchées, iso et anteiso) attestant de la présence de *Streptomyces* (cf tableau ci-dessus)



Les résultats ont été traités dans un tableur et présentés sous forme de graphique ou de tableau de synthèse.



	MS	C12:0	anteisoC15	anteisoC15	isoC16	isoC16	C18:0	Ratio anteisoC15/C18	Ratio isoC16/C18
	(mg)	200µg		(µg/mgMS)		(µg/mgMS)			
maïs H2O	50	1635	122	0,30	85,00	0,21	40,00	3,05	2,13
maïs H2O+EtOH	50	1923	112	0,23	73,00	0,15	14,00	8,00	5,21
maïs bm3 H2O	50	1706	114	0,27	69,00	0,16	25,00	4,56	2,76
maïs bm3 H2O+EtOH	50	1760	118	0,27	68,00	0,15	6,00	19,67	11,33
blé H2O	2	1815	29	1,60	32,00	1,76	8,00	3,63	4,00
blé H2O+EtOH	25	1585	113	0,57	94,00	0,47	19,00	5,95	4,95

blé exp H2O	50	1804	52	0,12	27,00	0,06	35,00	1,49	0,77
blé exp H2O+EtOH	50	1638	61	0,15	37,00	0,09	14,00	4,36	2,64

7.3.3 Conclusions

Les résultats montrent une meilleure croissance de *Streptomyces* sur la paille de blé non traitée, ce qui est en accord avec la microscopie. Mais les résultats sont à interpréter avec précaution car peu de matériel était disponible après centrifugation et lyophilisation des culots. La comparaison des ratios AG branchés/C18:0 mettent en évidence une perte des acides gras du substrat au cours du lavage à l'éthanol. La comparaison des résultats sur les deux types de maïs ne révèle pas d'effet positif du mutant à faible teneur en lignine pour la croissance des bactéries. Il semble par contre que la paille explosée à la vapeur soit un mauvais substrat pour *Streptomyces*.

7.3.4 Perspectives

Le dosage des AG bactériens a été très difficile en raison du manque de matériel à analyser après culture. Il est donc nécessaire d'augmenter le volume de cultures et/ou la quantité de substrat et/ou la quantité de spores à l'ensemencement.

Afin d'obtenir une évaluation plus rigoureuse de la croissance des bactéries, il est également nécessaire d'inclure une analyse des AG d'un échantillon après ensemencement (t = 0h de culture) pour connaître la quantité d'acides gras apportée par les spores.

Afin de limiter les pertes de matériel (pailles et bactéries), aucune étape de pipetage ou de fractionnement ne devra être appliquée. En effet, nous avons pu constater que chaque substrat adopte un comportement différent à la solubilisation et à la centrifugation (exemple : pailles de blé hydrophobes restant à la surface et donc difficiles à pipeter et à culoter). De plus, *Streptomyces* adopte une croissance en mycélium avec adhésion au substrat (révélé par les observations microscopiques), donc il est probable que l'analyse des culots donne des résultats partiellement faussés

7.4 Tests de croissance sur tiges de tournesol et de maïs

7.4.1 Cultures

Pour cette deuxième série de cultures, nous avons entièrement revu le protocole afin de résoudre les problèmes soulevés ci-dessus. Seuls les substrats broyés et non lavés ont été utilisés. Les substrats (1.2 ou 0.6 g) ont été pesés directement dans les erlenmeyers à picots et stérilisés en présence de 19 mL de solution saline (0.13g de NaCl dans 950 mL d'eau). Ces solutions ont été complétées avec le mélange SEM-NSELVS modifié. Trois témoins positifs "sucres" ont été inclus contenant à la place des substrats lignocellulosiques, de l'arabinose, du glucose ou du xylose. Chaque erlenmeyer a été ensemencé avec 3.10^8 spores et mis en culture à 30°C avec agitation pendant 6 jours Un témoin

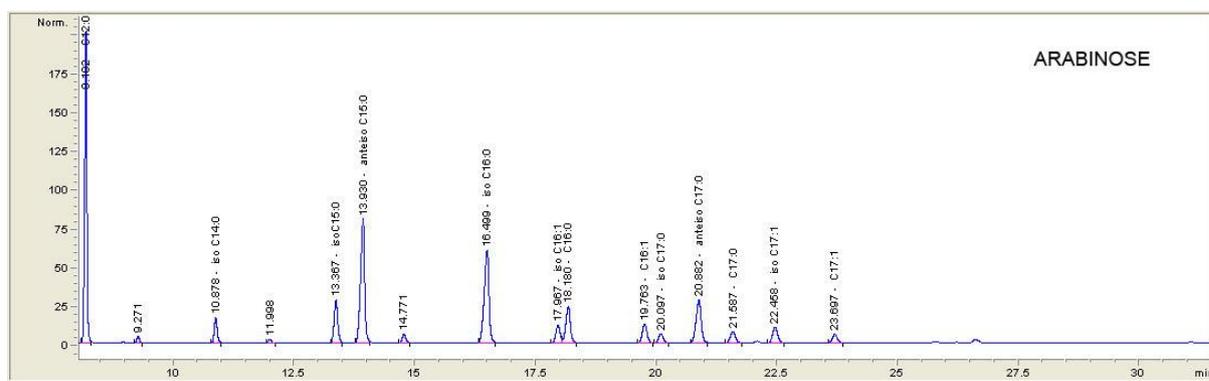
négatif de croissance a été effectué : le contenu d'un erlenmeyer a été lyophilisé après ensemencement mais avant les 6 jours de culture. Ci-dessous un tableau récapitulant l'ensemble des échantillons.

Arabinose	Tourneseol 1 (1.2g)	Colza 2009 (1.2g)
Glucose	Tournesol 2 (1.2g) t = 0	Colza 2010 (1.2g)
Xylose	Tournesol 2 (1.2g)	Colza 2010 (0.6g)
	Tournesol 2 (0.6g)	

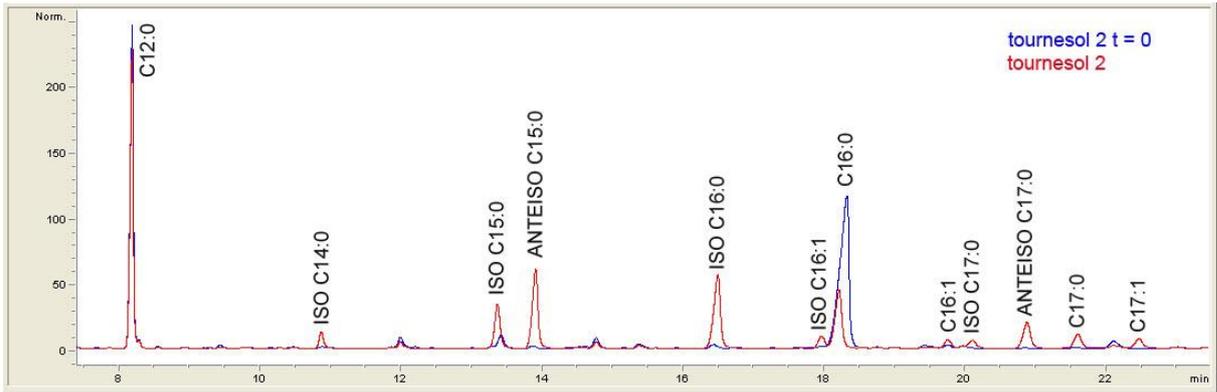
Après les 6 jours de culture, les croissances sur sucres semblent faibles. On observe une différence de coloration des *Streptomyces* en fonction du substrat : coloration blanche sur glucose et coloration rose sur arabinose et xylose. De même, la comparaison des échantillons tournesol 2 t = 0 et tournesol 2 fait apparaître un changement de couleur (brun clair à brun foncé) de l'échantillon après 6 jours de culture. Ceci peut révéler une altération des composants du substrat à 30 °C et/ou la présence de mycélium de *Streptomyces*.

7.4.2 Analyse des acides gras

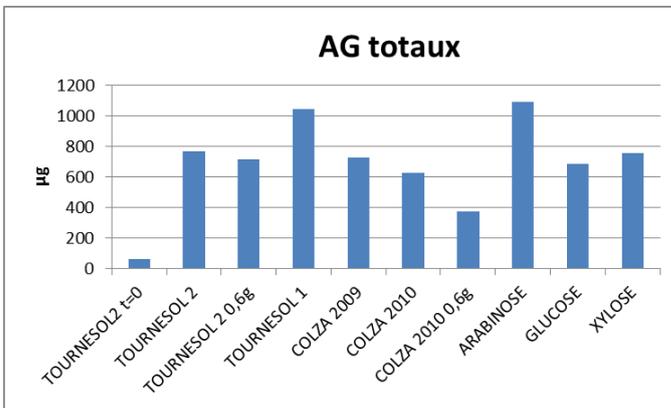
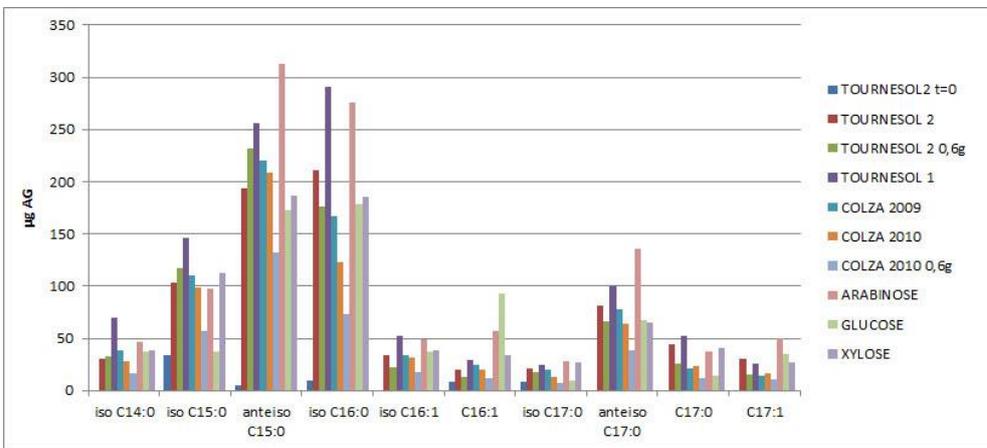
La totalité du matériel de chaque culture a été lyophilisé et traité pour l'analyse des AG totaux en présence de 424 µg de C12:0 par échantillon. La croissance sur les sucres donne un profil typique des AG de *Streptomyces* et nous n'observons pas de variation de composition en fonction du sucre substrat. Ci-dessous est affiché le chromatogramme correspondant aux AGs totaux de *Streptomyces* après croissance sur Arabinose.



La comparaison des chromatogrammes des échantillons tournesol 2 t = 0 et tournesol 2, présentée ci-dessous, permet de visualiser très nettement l'apparition de pics spécifiques des AG de *Streptomyces* uniquement dans l'échantillon tournesol 2. Ces observations montrent très clairement que *Streptomyces* a été capable d'utiliser ce substrat pour se développer.



De plus, les résultats de quantification, présentés ci-dessous, révèlent que les croissances sur substrats lignocellulosiques sont équivalentes à celles observées sur sucres.



En ce qui concerne le tournesol, on observe des différences fortes entre les lots avec une très bonne croissance sur le lot 1 qui est plus importante que sur glucose et xylose et se rapproche de ce qui est obtenu sur arabinose. Il n'y a pas de différence de croissance liée à la quantité de substrat apporté (comparaison tournesol 2 et tournesol 2 0.6g). Pour le colza, nous ne mettons pas en évidence de différence entre les lots, par contre il y a un effet de la quantité de matière apportée avec une différence claire entre colza 2010 et colza 2010 0.6g. On remarque une perte de croissance lorsque la quantité de colza apportée dans la culture est divisée par deux. Les variations de croissance entre

échantillons semblent donc refléter les variations de composition : échantillons de colza similaires et différence entre les deux lots de tournesol. L'échantillon de tournesol le moins lignifié et le plus riche en composés extractibles conduit à une plus forte croissance. Ce résultat suggère que les hémicelluloses contenu dans les résidus et les sucres solubles sont plus facilement convertis en biomasse bactérienne que les lignines, ce qui est en accord avec le fait que la souche utilisée n'a pas d'activité lignolytique connue.

7.4.3 Conclusions

Les changements de protocole effectués et la mise en place de témoins positifs et négatifs ont permis d'obtenir des résultats fiables. Il est maintenant possible de conclure clairement que les tiges de colza ou de tournesol ont été utilisées comme source de carbone par *Streptomyces* pour sa croissance. Les croissances observées sont de l'ordre de celles obtenues sur sucres seuls. Néanmoins, le milieu SEM-NSELVS modifié pour le projet, habituellement utilisé en fermenteur, ne semble pas le plus pertinent pour des croissances en fioles car même les croissances sur sucres ne semblent pas bonnes. Il est nécessaire de faire une comparaison des rendements obtenus dans les conditions de cette étude avec ceux obtenus sur milieu R2YE (milieu utilisé pour études génétiques, voir rapport du laboratoire de MJ Virolle).

7.4.4 Perspectives

Il semble qu'une optimisation du milieu de culture doit être envisagée pour améliorer la croissance de *Streptomyces* en présence de substrats lignocellulosiques. Néanmoins, les résultats positifs obtenus démontrent que *Streptomyces* est capable d'utiliser des résidus lignocellulosiques bruts pour sa croissance. Il s'agit maintenant de déterminer quelles sont les fractions utilisées par la bactérie, sucres solubles, polysaccharides et/ou lignines.

8 CONCLUSIONS DE L'ETUDE

8.1 Validation de la démarche expérimentale

Cette étude démontre qu'il est possible de faire pousser la bactérie filamenteuse *Streptomyces* sur des substrats lignocellulosiques. Au travers de ce travail, nous avons validé la démarche expérimentale développée par les partenaires du projet et en particulier, nous avons prouvé qu'il est possible d'effectuer un suivi de croissance grâce au dosage des acides gras branchés.

8.2 Validation des substrats

Nous avons également démontré que les substrats lignocellulosiques bruts fournis par l'Onidol (tiges de colza et de tournesol, broyées à 1 mm), dans les conditions de cultures de cette étude, sont de très bons substrats pour la croissance de *Streptomyces* (comparaison avec les résultats obtenus sur

sucres simples). Nous avons en outre obtenus des données originales sur la composition et la structure de ces substrats encore peu connus.

9 PERSPECTIVES

9.1 Identification de la fraction valorisable

Une meilleure connaissance des mécanismes mis en jeu lors de la croissance de *Streptomyces* sur ces résidus lignocellulosiques est nécessaire pour améliorer les rendements de culture et de production de lipides. Il est donc essentiel de comprendre quelles sont les fractions utilisées par *Streptomyces* pour croître et cela passe par des tests de croissance sur substrats prétraités (lavage eau et eau+éthanol) qui permettent d'éliminer séquentiellement certains composés en particulier les sucres solubles. Nous envisageons donc une dernière expérience de culture de *Streptomyces* sur les résidus pariétaux de colza et tournesol obtenus lors de cette étude.

La caractérisation des substrats après croissance, et leur comparaison avec les substrats avant culture, peut aussi être une bonne source d'information pour identifier les composants utilisés par *Streptomyces*.

9.2 Changement d'échelle

Avec les résultats positifs obtenus dans cette étude, un changement d'échelle est envisageable afin de s'orienter vers une production industrielle. Ceci nécessite de travailler sur la préparation du substrat et la composition du milieu de culture afin d'améliorer la production de biomasse bactérienne mais surtout le rendement en acides gras branchés.

9.3 Publication scientifique

Les résultats obtenus lors de cette étude permettent d'envisager une publication dans un journal scientifique. Pour cela une dernière expérience de culture de *Streptomyces* sur résidus pariétaux est nécessaire et devrait être conduite avant la fin de l'année 2012.

10 BIBLIOGRAPHIE

Antai et al. (1981). Degradation of softwood, hardwood, and grass lignocelluloses by two streptomyces strains. *Appl Environ Microbiol.* 42, 378-80

Baumberger et al. (2007). An overview of the analytical tools in the qual/quantitative analysis of functional groups and interunit bondings in lignin. II. Interunit bondings characterisation. COST E41 Meeting Roma (Italy), May 7-8, Proceedings.

Caparros et al. (2008). Hydrothermal treatment and ethanol pulping of sunflower stalks. *Biores. Technol.*, 99(5), 1368-1372.

Davis et al. (2010). Regulation of genes in *Streptomyces* bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86, 921-9.

Kaddor et al. (2009). Analysis of neutral lipid biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* MA-4680 and characterization of an acyltransferase involved herein. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84, 143-55

Kang et al. (2012). Pretreatment of rapeseed straw by sodium hydroxide. *Bioprocess; Biosyst. Eng.* 35, 705-713.

Lapierre et al. (1992). The determination of lignin. In *Methods in lignin chemistry*, Dence, C., Lin, S.Y. (Eds) pp. 33-36.

Zhang et al. (2011). Impact of lignin structure and cell wall reticulation on maize cell wall degradability. *J. Agric Food Chem.* 59, 10129-10135.