

# Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de *Trichoderma harzianum*

Claude VIDAUD\*, Sévastianos ROUSSOS\*\* (1),  
Maurice RAIMBAULT\*\* (2), François DESCHAMPS\*

---

## Résumé

Nous avons comparé l'efficacité de divers traitements physiques et chimiques permettant d'augmenter l'accessibilité des polysaccharides contenus dans la paille à l'hydrolyse enzymatique. Parmi ceux-ci, le broyage suivi d'un traitement thermique (110 °C pendant 30 min) de pailles imprégnées à 70 % d'humidité améliorent nettement l'accessibilité de la cellulose aux enzymes cellulolytiques.

**Mots-clés :** Cellulase — Dégradabilité — Paille — Prétraitements — *T. harzianum*.

---

## Summary

We have compared the efficiency of various physical and chemical treatments allowing to increase the accessibility of cellulose contained in straw to enzymatic hydrolysis. Among them, the grinding followed by a thermal treatment (110 °C during 30 min) of straw permeated with 70 % moisture improved largely the accessibility of cellulose to cellulolytic enzymes.

**Key words :** Cellulase — Straw — Degradability — Treatment — *T. harzianum*.

### 1. Introduction

Les hémicelluloses (polymères de pentoses et d'hexoses), les lignines (macro-molécules polyphénoliques) et la cellulose (polymère linéaire d'unités  $\beta$ -D-glucose) sont les constituants majeurs des matériaux lignocellulosiques. La résistance de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique s'explique d'une part par la présence d'une matrice formée par les hémicelluloses et la lignine qui entoure la cellulose, cet ensemble constituant un système de hauts polymères étroitement imbriqués; d'autre part par la structure hautement ordonnée de la cellulose qui lui confère une certaine cristallinité.

L'accessibilité de la cellulose aux cellulases dépend des propriétés de surface des fibres, des liaisons entre les divers constituants, de la taille des particules, tandis que sa dégradation est liée à son degré de cristallinité. L'accessibilité peut être augmentée par des traitements, qui se subdivisent en deux catégories :

— des traitements physiques comme l'utilisation des broyeurs à marteau (vibratory ball milling), le broyage (grinding), les irradiations ou les effets thermo-mécaniques;

— des traitements chimiques par les agents alcalins « gonflants » (swelling agents) tels que

---

\* Laboratoire de Biotechnologie de l'IRCHA, B.P. n° 1, 91710 Vert-le-Petit.

\*\* Laboratoire de microbiologie O.R.S.T.O.M., Centre de recherche IRCIIA, B.P. n° 1, 91710 Vert-le-Petit.

(1) Adresse actuelle : Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée, O.R.S.T.O.M., B.P. n° 81, 97201 Fort-de-France.

(2) Adresse actuelle : UAM-Iztapalapa, Dép<sup>t</sup> Biotechnology, AP 55-535, Mexico 13, DF, Mexique.

l'ammoniaque, la soude ou la potasse et les acides. Ces traitements se font également à chaud (traitements à la vapeur).

Tous ces procédés ont été étudiés notamment par SATTER *et coll.* (1976), GRAM *et coll.* (1978), TANAKA et TANIGUCHI (1979), PEITERSEN (1975), TOHRAI et TORASHIMA (1978) et par GHOSE (1977).

L'efficacité d'un traitement se mesure par la dégradabilité de la cellulose que l'on peut notamment apprécier par la détermination des sucres réducteurs libérés après action des cellulases (MANDELS et WEBER, 1969, MANDELS *et coll.* 1976, TOHRAI et TORASHIMA, 1978).

Notre travail a porté sur divers prétraitements de la paille de blé destinés à améliorer l'accessibilité de la cellulose aux cellulases.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. MICROORGANISME

Le champignon imparfait *Trichoderma harzianum* CCM F-470 (Czechoslovak Collection of Microorganisms) a été utilisé pour la production de cellulases employées pour la mesure de la dégradabilité après traitement de la paille.

### 2.2. PRODUCTION DES CELLULASES

La culture a été réalisée dans un fermenteur Biolafitte (Poissy, France) de 2 litres contenant un litre de milieu de MANDELS et WEBER (1969), dans lequel l'extrait de levure et les peptones ont été remplacés par 2 g de son de blé et la cellulose Avicel par 8 g de paille de blé. Les conditions de culture sont celles définies par ROUSSOS et RAIMBAULT (1982 b).

### 2.3. MESURE DE L'ACCESSIBILITÉ AUX CELLULASES

Le mélange réactionnel est le suivant : 50 mg de paille traitée, 1 ml de tampon citrate-phosphate 0,05 M, pH 4,8 et 1 ml d'une dilution de surnageant de la culture de *T. harzianum* renfermant 0,01 UI d'Activité Papier Filtre (APF). Incubation 24 h à 50 °C. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes 3 mn dans un bain-marie à 100 °C. Les sucres réducteurs libérés sont dosés au DNS selon MILLER (1959).

### 2.4. DOSAGE DES CONSTITUANTS DE LA PAILLE

La méthode de VAN SOEST (1963) a été utilisée. Le principe de cette méthode repose sur l'extraction

successive des principaux constituants des matériaux lignocellulosiques. Après chaque extraction, le produit retenu sur le filtre est séché et pesé.

## 2.5. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS DE PAILLE

Les traitements étudiés sont de deux sortes : Physiques et Chimiques.

### 2.5.1. Traitement physique

La paille est broyée dans un broyeur à marteau type ELECTRA, puis tamisée pour obtenir cinq fractions homogènes variant de 2 mm à 0,1 mm de longueur (A, B, C, D, E).

### 2.5.2. Traitement chimique

Deux types de traitements ont été étudiés : alcalins et acides.

*Traitements acides*: 10 g de paille sont placés dans 100 ml d' $H_3PO_2$  à 76 % à 0 °C pendant des temps variant de 5 à 20 mn. La suspension est ensuite filtrée sur verre fritté, lavée abondamment à l'eau distillée et neutralisée par la soude. Le séchage est effectué à 100 °C pendant 48 h.

*Traitements alcalins*: deux sortes de traitements ont été expérimentés :

a. Traitement de paille en suspension : 10 g de paille sont placés dans 100 ml de la solution alcaline (à 1, 2, 3, et 4 % de soude ou d'Ammoniaque) et autoclavés à 110 °C pendant 30 mn. Ensuite on filtre sur verre fritté puis on neutralise et lave par une série de rinçages successifs avec des solutions d'HCl et d'eau distillée bouillante jusqu'à neutralité des eaux de lavage.

b. Traitement de paille imprégnée : 10 g de paille sont amenés à 70 % d'humidité avec une solution alcaline (à 1, 2, 3 et 4 % de NaOH ou de  $NH_4OH$ ) puis autoclavés à 110 °C pendant 30 mn.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1. TRAITEMENT PHYSIQUE - BROYAGE

Au tableau I, sont rapportées les proportions des divers constituants dans chacune des différentes fractions : résultats donnés par le dosage de VAN SOEST (1963). Pour l'échantillon A on observe une perte très importante au niveau de l'action du NDS (1); considérant ce dosage avec réserve, nous

(1) NDS = Neutral Detergent Solution.

TABLEAU I  
Accessibilité du substrat aux cellulases en fonction de la taille des brins de paille

Echantillon	Taille en mm	CONSTITUANTS DE LA PAILLE EN %				Dégradabilité en % de paille
		Cellulose	Hémicellulose	Lignine	Autres	
A	< 0,1	23	20	15	42	1,54
B	0,1-0,5	28	24	26	22	1,06
C	0,5- 1	31	26	24	19	0,94
D	1 -2	43	19	16	22	0,84
E	< 2	43	25	12	20	0,60
Valeur moyenne		36	24	20	20	1,00
Témoin d'activité Papier Filtre = 0,122 mg sucres réduits/ml/h.						

Dégradabilité = mg de sucres réducteurs libérés/24 h/100mg de paille en présence de cellulases (0,02 U1 APF) de *T. harzianum*.

TABLEAU II  
Variation de la composition des différents constituants de la paille au cours des traitements acides. Influence sur l'accessibilité aux cellulases

Echantillon	Temps de traitement en mn	CONSTITUTION DE L'ECHANTILLON TRAITÉ %				Pertes en poids %	Dégradabilité en % de paille
		cellulose	Hémicellulose	Lignine	Autres		
Paille Témoin	0	36	24	20	20	0	1,06
P <sub>1</sub>	5	32	25	26	17	48	1,78
Δ %		14	7	2	9		
P <sub>2</sub>	10	28	20	30	19	50	2,04
Δ %		17,3	11	0	7,3		
P <sub>3</sub>	15	44	15	28	13	40	2,40
Δ %		4	14	0	11		
P <sub>4</sub>	20	44	20	20	16	42	2,40
Δ %		5	10	6	9		

n'avons pas tenu compte des valeurs obtenues pour le calcul de la valeur moyenne des différents constituants de la paille. La cellulose et les hémicelluloses représentent donc en moyenne pour les quatre échantillons restants 60 % du poids de la paille.

Il est vraisemblable cependant que la précision de la méthode de Van SOEST (1963) appliquée au dosage des constituants est très faible. De plus, des réactions ont pu se produire pendant le séchage de l'échantillon et fausser l'estimation des lignines. En outre, les tanins, les pectines et les cires présents peuvent également interférer avec le dosage des hémicelluloses. Cependant cette technique de dosage donne une estimation sur la nature des composants d'un matériau lignocellulosique et peut servir d'analyse complémentaire des effets du traitement sur les pailles.

Sur chaque échantillon de paille broyée et tamisée, l'accessibilité de la cellulose à la dégradation

enzymatique est mesurée par la dégradabilité d'un substrat cellulosique exprimée en mg de sucres réducteurs libérés en 24 h à 50° C en présence de cellulases (0,02 UI APF) pour 100 mg de substrat (tabl. I). L'accessibilité aux enzymes cellulolytiques est nettement améliorée par le broyage. Pour l'échantillon A, on observe la présence d'une quantité de sucres réducteurs, spontanément libérés par le substrat, nettement supérieure à celle des autres échantillons. Ceci peut être rapproché des résultats relatifs au dosage des constituants et permet de supposer que le broyage rompt une partie des molécules de cellulose, augmentant ainsi le nombre de fonctions réductrices libres, et provoquant la formation de polysaccharides de faible poids moléculaire beaucoup plus hydrosolubles.

Pour la suite de notre étude, nous avons donc utilisé de la paille de blé broyée de taille comprise entre 0,1 et 0,5 mm.

TABLEAU III

Influence des traitements alcalins en milieu liquide sur la composition des pailles : incidences sur l'accessibilité aux cellulases

Echantillon	Concentration en NaOH ou NH <sub>4</sub> OH %	CONSTITUTION DE L'ECHANTILLON TRAITÉ %				% Pertes en Poids	Dégradabilité en % de paille
		cellulose	Hémicellulose	Lignine	Autres		
S 0	NaOH 0	53	27	6	14	30	2,16
S 1	NaOH 1%	66	20	4	10	44	4,60
S 2	NaOH 2%	66	23	4	7	58	2,20
S 4	NaOH 4%	15	27	40	18	80	1,70
A 0	NH <sub>4</sub> 0%	53	27	6	14	30	2,16
A 1	NH <sub>4</sub> 1%	53	26	11	10	30	2,22
A 2	NH <sub>4</sub> 2%	48	30	14	8	30	2,0
A 4	NH <sub>4</sub> 4%	60	32	6	2	30	2,40
Paille non traitée	0	36	24	20	20	30	1,06

3.2. TRAITEMENTS CHIMIQUES

3.2.1. Traitement à l'acide orthophosphorique

Les paramètres suivants ont été étudiés : perte en poids au cours du traitement, composition du produit résiduel et accessibilité aux cellulases. Les résultats sont rapportés au tableau II. Nous pouvons constater que les pertes en poids subies au cours de différents prétraitements sont importantes et sensiblement identiques : elles sont de 40 à 50 % du poids du produit initial.

La composition du produit résiduel est déterminée sur échantillon séché après traitement et lavage. Compte tenu de la perte de poids résultant

du traitement elle permet de déterminer le pourcentage d'élimination de chacun des constituants par le traitement.

Les pertes en hémicellulose varient de 7 à 14 %, en cellulose de 4 à 21 % et en lignine de 0 à 6 %. Il semble donc qu'il y ait une meilleure résistance des lignines à l'attaque des acides. Une partie des hémicelluloses et les constituants solubles dans l'eau disparaissent avec les eaux de lavage. Cependant la cellulose de la paille ainsi traitée est plus accessible. Sa dégradabilité est augmentée de 50 %.

3.2.2. Traitements alcalins en milieu liquide

Les résultats sont rapportés au tableau III.

TABLEAU IV

Influence des traitements alcalins en imprégnation sur la composition des pailles : incidence sur l'accessibilité aux cellulases

Echantillon	Concentration en NaOH ou NH <sub>4</sub> OH %	CONSTITUTION DE L'ECHANTILLON TRAITE %				Dégradabilité en % de paille
		Cellulose	Hémicellulose	Lignine	Autres	
SI 0	NaOH 0	36	30	5	29	4,02
SI 1	" 1	38	25	7	30	3,50
SI 2	" 2	38	22	7	33	3,25
SI 3	" 3	43	8	9	40	3,10
SI 4	" 4	40	23	6	31	3,50
AI 0	NH <sub>4</sub> OH 0	36	30	5	29	4,02
AI 1	" 1	16	25	26	33	3,50
AI 2	" 2	36	30	26	8	3,70
AI 3	" 3	43	29	21	7	3,60
AI 4	" 4	35	23	32	10	3,90
Paille brute non traitée	0	36	24	20	20	1,06

Nous observons tout d'abord que la perte en poids varie linéairement avec les concentrations en soude (de 30 à 80 %), alors que le traitement à l'ammoniaque semble sans effet.

Les résultats rapportés dans le tableau III correspondent à la composition de 1 g du produit résiduel après prétraitement de la paille. Il semble que le traitement à la soude jusqu'à la concentration 2 % provoque une dissolution des hémicelluloses et des constituants solubles dans le NDS (HAN et CALLAHAN, 1974) puis de la cellulose lorsque la concentration s'élève à 4 %. Le traitement comporte vraisemblablement deux actions simultanées : en premier lieu, le gonflement des parties cristallines sous l'effet de la température rendant la cellulose plus amorphe donc plus accessible, puis une dégradation du substrat par la soude. Le traitement optimal semble être représenté par une action de 30 mn de la soude à 1 %. Dans le cas du traitement à l'ammoniaque, la seule action apparente est celle de la température.

### 3.2.3. Traitements alcalins en imprégnation

La composition et la dégradabilité des échantillons ainsi traités sont rapportées au tableau IV. L'observation que l'on peut faire sur ce type de traitements avec la soude est une diminution sensible de la fraction correspondant à la lignine, et une augmentation parallèle de la fraction soluble dans le NDS. Un résultat opposé est observé après action de l'ammoniaque qui provoque peut-être une complexation de certains des constituants se retrouvant à la fin du dosage dans la fraction correspondant à la lignine.

L'action des agents alcalins n'augmente pas la dégradabilité de la paille par les cellulases de

*T. harzianum* par rapport au simple effet de la température.

## 4. Conclusions

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de conclure que le broyage est un bon moyen d'améliorer l'accessibilité de la cellulose des pailles aux enzymes cellulolytiques. En ce qui concerne les traitements chimiques, l'efficacité des agents alcalins n'a pu être mise clairement en évidence dans la mesure où seul le traitement thermique en milieu aqueux donne des résultats de même ordre de grandeur. Les études de l'efficacité de divers traitements physiques et chimiques sur l'accessibilité des constituants polysaccharidiques de la paille à l'hydrolyse enzymatique avaient pour objectif de déterminer les conditions de prétraitement pour obtenir un substrat préconditionné pour la fermentation en milieu solide. Les conditions optimales de mise en œuvre de ce nouveau procédé sont donc :

- utilisation de paille broyée (taille < 1 mm);
- traitement de la paille en milieu imprégné de façon à éviter les pertes importantes de matière par ailleurs source de pollution;
- traitement de la paille soit uniquement par la chaleur à 110 °C pendant 30 mn, soit dans les mêmes conditions mais en présence de soude à 1 %;
- utilisation de la souche de *T. harzianum* dont la croissance apicale, la capacité de production de cellulases et le rendement de sporulation sont tout à fait satisfaisants (ROUSSOS et RAIMBAULT, 1982 a).

Manuscrit reçu au Service des Éditions le 21 juin 1982

## BIBLIOGRAPHIE

- GHOSE (T. K.), 1978. — Enzymatic hydrolysis of cellulosic substances. In: « utilisation industrielle du carbone d'origine végétale par voie microbienne ». Colloque de la Microbiologie Industrielle; 9-10 mars 1978 — I.N.S.A. Toulouse — Édité par la Société Microbiologique de France.
- GRAY (P. P.), HENDY (N. A.) et DUN (N. W.), 1978. — Digestion by cellulolytic enzymes of alkali pretreated bagasse. *J. Aust. Inst. Agric. Scienc.*, Sept. Dec. : 210-212.
- HAN (Y. W.) et CALLAHAM (C. D.), 1974. — Cellulose fermentation : effect of substrate pretreatment on Microbial growth. *Appl. Microbiol.*, 27 : 159-165.
- MANDELS (M.) et WEBER (J.), 1969. — The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, 95 : 391-414.
- MANDELS (M.) et STERNBERG (D.), 1976. — Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.*, 54 : 267-286.
- MILLER (G. L.), 1959. — Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31 : 426-428.
- MILLET (M. A.), BAKER (A. J.) et SATTER (L. D.), 1976. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnol. Bioeng. symp.*, 6 : 125-153.
- PEITERSSEN, 1979. — Mathematical model for enzymatic hydrolysis and fermentation of cellulose by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng.*, 21 : 997-1017.
- ROUSSOS (S.) et RAIMBAULT (M.), 1982 a. — Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I. — Screening des souches cellulolytiques. *Annal. Microbiol.* (Paris), 133 B : 455-464.
- ROUSSOS (S.) et RAIMBAULT (M.), 1982 b. — Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. II. — Production de cellulases de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu liquide. *Annal. Microbiol.* (Paris), 133 B : 465-474.
- TANAKA (M.), et TANIGUCHI (M.), 1979. — Effects of chemical treatment on solubilisation with *Pellicularia flamenlosa* cellulase. *J. Ferment. Technol.*, 57 : 186-190.
- TOHRAI (N.) et TORASHIMA (Y.), 1978. — Effects of ammonia treatment on cellulase digestion and sugar production of the low quality roughage. *Jap. J. Zootechnol. Sci.*, 50 : 189-194.
- VAN SOEST (P. J.), 1963. — Feeds : Use of detergents in the analysis of fibrous feeds I et II. *Ass. offic. Anal. Chem. J.*, 46 : 825-835.