

Valorisation de la cossette de betterave par culture de trichoderma harzianum en milieu liquide et solide

par SEVASTIANOS ROUSSOS J.L. GARCIA et M. RAIMBAULT*

RESUME

La cossette de betterave épuisée a été utilisée comme substrat pour le développement de *T. harzianum* en milieux solide et liquide. Après 60 h de culture, la cossette ne renferme plus que la moitié de la cellulose qu'elle contenait initialement et le milieu de culture est enrichi en protéines et enzymes cellulolytiques.

Mots clés : *Trichoderma harzianum*, cossette de betterave, cellulases, protéines, fermentation liquide et solide.

ABSTRACT :

Leached sugar-beet cassettes were used for culture of *Trichoderma harzianum* in liquid or solid media. After 60 h period of incubation, the cassette content of cellulose was half than initial content and culture media were enriched with protein and cellulases.

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 15 787, ex 1

Cote : B

Introduction

La bioconversion des sous-produits agricoles principalement celluloseux et lignocelluloseux a attiré ces dernières années l'attention des pouvoirs publics. En effet, ces produits sont disponibles en grande quantité et peuvent être transformés en sucres, protéines, enzymes, alcool ou biogaz.

La France figure parmi les grandes puissances sucrières. Ses sucreries sont alimentées avec des betteraves en métropole et de la canne dans les départements d'Outre-Mer. Dans les départements du Nord, la culture de la betterave sucrière tient la première place des cultures industrielles. Les sous-produits sont diversement utilisés : les mélasses servent à la fabrication de levures et de métabolites ; les pulpes, sous-produits solide, riche en cellulose, sont utilisées après ensilage pour la nutrition des animaux digastriques. Elles sont rajoutées en faibles quantités dans les rations alimentaires. L'utilisation de ce sous-produit comme substrat pour la croissance des

champignons filamenteux cellulolytiques pourrait amener de nouveaux débouchés.

Dans ce but, nous avons étudié, dans un premier temps, la production d'enzymes (cellulases) et de protéines par une culture de *Trichoderma harzianum* (1). Ce microorganisme utilise, en effet, la cellulose et les produits celluloseux, comme source de carbone et d'énergie pour sa croissance. Il synthétise pour cela des enzymes cellulolytiques extra-cellulaires qui transforment la cellulose en glucose, qui peut lui-même être métabolisé en d'autres composés. Des études récentes (2) ont démontré l'utilisation possible pour l'alimentation des poulets d'aliments fermentés enrichis en protéines de *T. harzianum*.

La présente étude analyse la croissance de *T. harzianum* sur cossette de betterave épuisée, cultivé en milieu solide selon une technique déjà décrite (3,4) et en milieu liquide.

* Laboratoire de microbiologie orstom centre de recherche Ircha B.P. n° 1, 91710 Vert-le-Petit - France

Adresse Actuelle : Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa Departamento de Biotecnologia A.P. 55. 535 - MEXICO 13, D.F. - Mexico

Matériel et méthodes

1. Microorganisme :

Un champignon imparfait *Trichoderma harzianum* (CCM F-470) provenant de la Czechoslovak Collection of Microorganisms (CCM) a été utilisé.

2. Milieux de culture :

T. harzianum est cultivé sur Malt-Extract-Agar Difco (B 112) à pH = 5,6 et 29° C puis conservé à + 4° C. Pour l'inoculation des cultures on utilise une suspension de spores dans de l'eau distillée stérile additionnée de 1 % de Tween 80, avec une concentration de 3×10^7 spores/g de substrat (1).

3. Composition de la cossette épuisée de betterave :

La composition moyenne minérale et organique est rapportée au Tableau I.

Tableau I - Composition moyenne des pulpes de betteraves

Matière sèche	20 %		
dont Cendres	5 %		
Matières volatiles	95 %		
Eau	80 %		
Analyse élémentaire (rapportée à la matière sèche)		Analyse Organique (rapportée à la matière sèche)	
Carbone	40 %	Cellulose	20 %
Phosphore	0,37 %	Hemicellulose	15 %
Azote	1,80 %	Sucres simples	30 %
C/N	22	Pectines	10 %
		Protéines	10 %
		Lipides	8 %

4. Conditions de culture :

4.1. Fermentation liquide.

Les cultures sont réalisées dans un fermenteur BIOLAFITTE de 2 litres contenant 1 250 ml du milieu suivant : $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,975 g ; urée, 0,238 g ; KH_2PO_4 , 0,50 g ; Cossette épuisée de betterave à 98 % de matière sèche, 10 g ; Eau distillée, 1 000 ml ; pH : 5,6. Le milieu est autoclavé dans le fermenteur à 110° C pendant 1 h.

Régulation des paramètres : température, 29° C ; aération, 10 l/h ; agitation, 500 t/mn ; antimousse, huile de colza ; le pH n'est pas régulé.

Des prélèvements de 20 ml sont effectués tout au long de la culture et les échantillons sont congelés pour être ensuite analysés simultanément.

4.2. Fermentation solide.

Les cultures sont réalisées en colonnes selon une technique décrite par ailleurs (3,4). La solution minérale pour

100 g de cossette sèche contient : $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 9,75 g ; urée, 2,38 g ; KH_2PO_4 , 5,0 g ; Eau distillée, 100 ml. Le pH de la solution est ajusté à 4,2.

La solution minérale est ajoutée à la cossette sèche, finement broyée (taille inférieure à 0,5 mm) puis le mélange est homogénéisé et autoclavé à 110° C pendant 1 h. Il est ensuite, inoculé avec la suspension de spores ; l'humidité du produit ainsi obtenu est ramenée à 70 %. On introduit 20 g de ce produit dans chacun des incubateurs qui sont placés dans un bain-marie à 29° C ; de l'air comprimé saturé en eau assure l'aération du milieu de culture avec un débit de 7 l/h.

Des prélèvements de 10 g sont effectués tout au long de la culture et les échantillons sont congelés. Le poids sec de chaque prélèvement est mesuré avant congélation.

Sur les échantillons décongelés et homogénéisés par passage dans un Potter, les dosages suivants sont réalisés : sucres réducteurs au DNS (5), sucres totaux à l'anthrone (6), protéines au Folin (7), activités cellulases : Activité Papier Filtre APF et Activité Carboxyméthylcellulose ACMC (1,8).

Les résultats sont exprimés en g de produit formé ou disparu pour 100 g de substrat poids sec (SPS). Les activités enzymatiques sont exprimées en UI/100 g SPS (1 UI est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer à partir du substrat une micro-mole de glucose par minute).

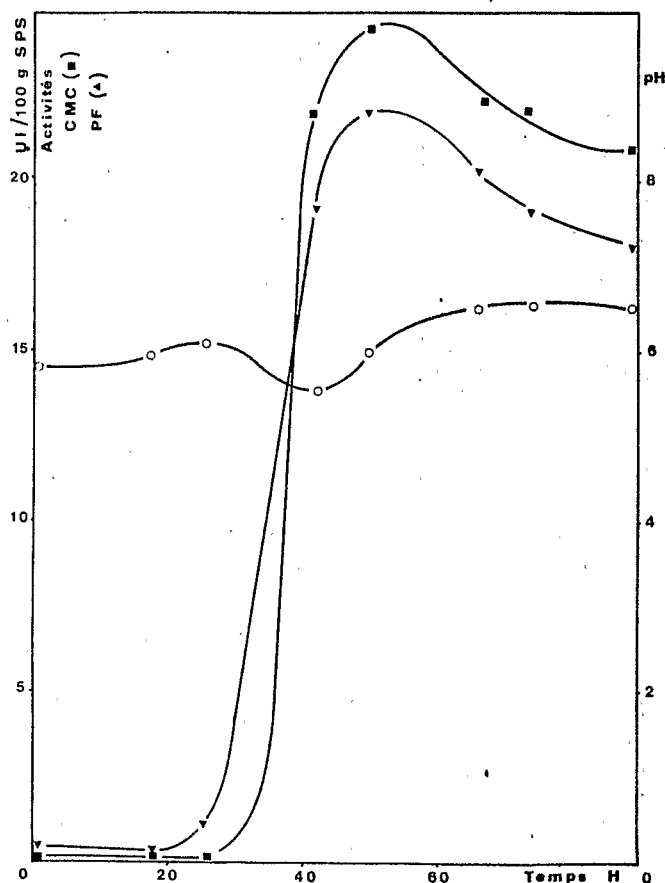


Fig. 1. B. Culture de *T. harzianum* en milieu liquide. Evolution du pH (● - ●) ; Evolution des cellulases ; ACMC $\times 1000$ UI (■ - ■) ; APF $\times 100$ UI (▼ - ▼).

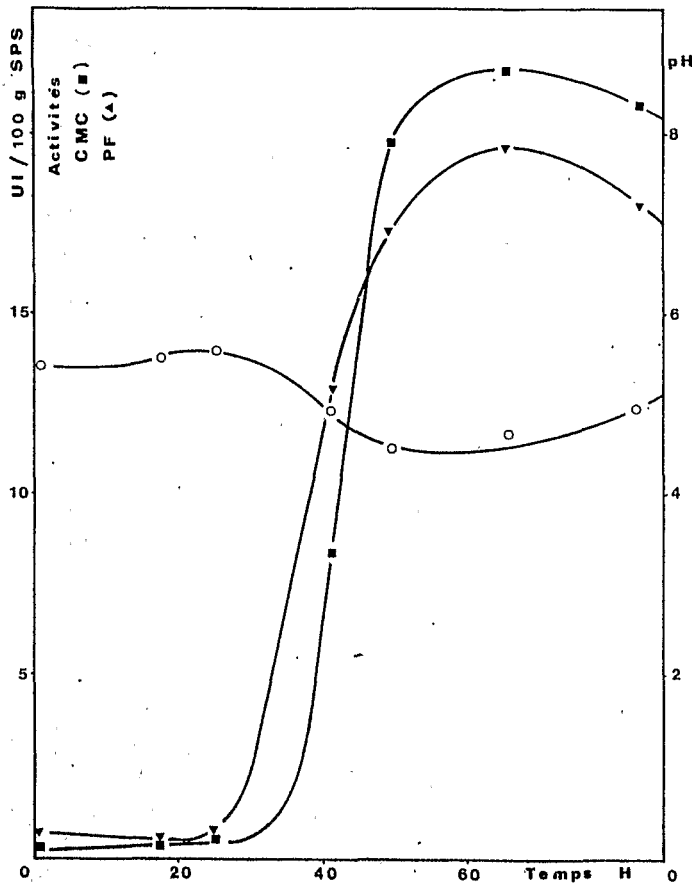


Fig. 2 B. Culture de *T. harzianum* en milieu solide. Evolution du pH (● - ●); Evolution des cellulases : ACMX × 1000 UI (■ - ■); APF × 100 UI (▼ - ▼).

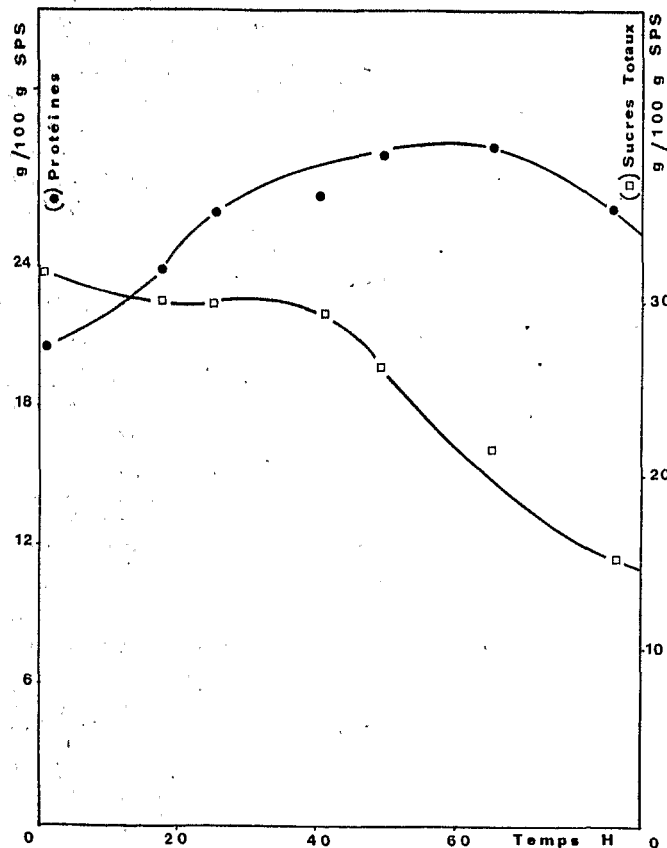


Fig. 2 A. Culture de *T. harzianum* en milieu solide. Evolution des protéines (● - ●); Evolution des Sucres Totaux (□ - □).

Résultats et discussion

Sur les figures 1 et 2 sont respectivement portés les résultats concernant l'évolution du pH, des protéines, des sucres totaux et des activités cellulases au cours de la croissance de *T. harzianum* cultivé en milieux liquide et solide.

Au cours des 10 premières heures de fermentation, qui correspondent à la phase de latence, les spores doublent de volume puis donnent un tube germinatif qui va former le mycélium. En présence des inducteurs (cellulose ou cellobiose), les cellules mycéliennes synthétisent des cellulases qui sont libérées dans le milieu où elles apparaissent après 20 h de culture.

Le pH évolue au cours de ces étapes ; ses variations ne sont cependant pas très importantes. Sa lente remontée en début de croissance est principalement due à l'hydrolyse de l'urée tandis que sa diminution pendant la phase de croissance active du mycélium est provoquée par l'assimilation des ions NH_4^+ sous forme NH_3 qui entraînent l'accumulation d'ions H^+ (9). Lors d'une étude précédente sur la production de cellulases par *T. harzianum* cultivé sur cellulose microcristalline en fermentation liquide il avait été observé une diminution rapide du pH. Cette chute du pH provoquait un arrêt de croissance du mycélium et les auteurs avaient proposé de réguler le pH au cours de la fermentation (1). Dans le cas présent il n'est pas nécessaire de réguler le pH car la pulpe de betterave exerce un effet tampon (Fig. 1B et 2B).

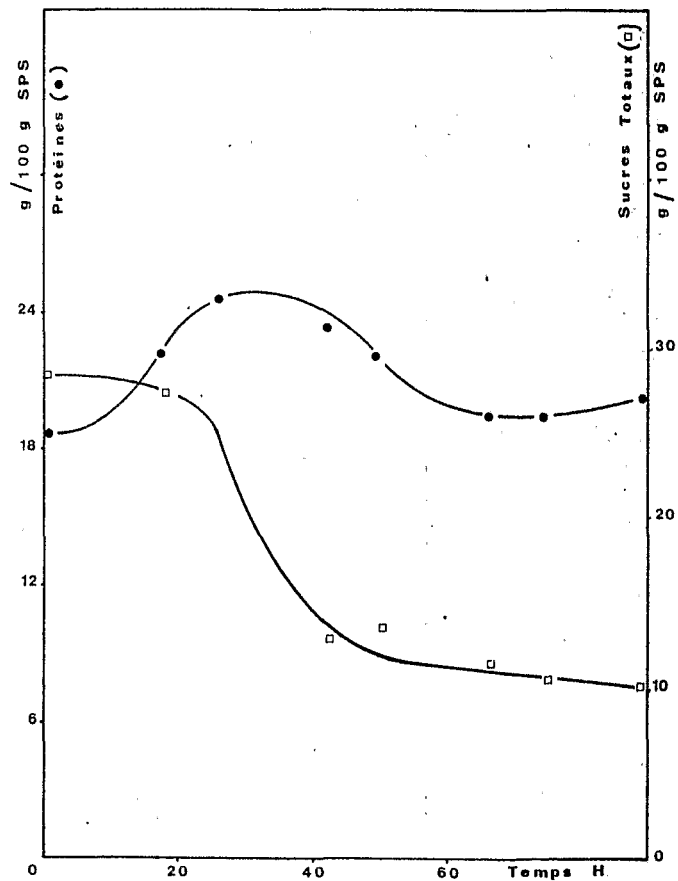


Fig. 1 A. Culture de *T. harzianum* en milieu liquide. Evolution des protéines (● - ●); Evolution des Sucres Totaux (□ - □).

L'évolution de la production de protéines est différente en milieu liquide et en milieu solide. En milieu liquide, la synthèse des protéines a lieu pendant la première phase de croissance active du mycélium ; après 40 h de culture, la teneur en protéines diminue (Fig. 1A). Par contre, en milieu solide, le taux de protéines augmente régulièrement pour atteindre un palier après 60 h de culture (Fig. 2A). La quantité maximale de protéines est de 24,5 g pour 100 g de substrat initial, poids secs (SPS) en fermentation liquide et de 29,0 g/100 g SPS en fermentation solide. Ces teneurs sont respectivement atteintes après 30 h et 47 h de culture et correspondent à un enrichissement en protéines de la cossette de 6 à 10 %.

Si l'on considère que *T. harzianum* utilise des sucres (principalement de la cellulose) au cours de sa croissance, le rendement de transformation de la cellulose de la cossette en protéines est de 28,9 % pour la fermentation en milieu liquide. Ce rendement est en accord avec les résultats obtenus par différents auteurs avec une souche de *T. harzianum* (2,10). Par contre, pour la fermentation en milieu solide, le rendement de transformation en protéines de la cellulose de la cossette est de 60 %. Cette valeur relativement élevée, démontre que les champignons filamenteux sont mieux adaptés pour ce type de fermentation.

L'étude comparative de la cinétique d'apparition et de production de cellulases en milieux solide et liquide ne fait pas apparaître de différence importante concernant les quantités d'enzymes synthétisées si ce n'est qu'en milieu liquide la germination des spores ainsi que la production de protéines et de cellulases se font avec quelques heures d'avance (Fig. 1B et 2B). Mais il n'y a pas de différence significative entre les deux types de culture. Les cellulases apparaissent dans le milieu après 24 h de culture. Les valeurs maximales sont atteintes après 50 ou 60 h de croissance. La nature des cellulases est identique si l'on considère que le rapport $\frac{\text{Activité Carboxyméthylcellulose}}{\text{Activité Papier Filtre}}$ est voisin de 10 dans les deux cas. Cependant, les cellulases obtenues à partir d'une culture en milieu solide paraissent moins sensibles à l'action des protéases ; en fin de croissance, leur production présente un palier alors qu'en milieu liquide, elle chute sensiblement.

Le bilan global pour la production de cellulases est le suivant : Pour 100 g de cossettes poids sec initial ont été obtenues 2.000 UI APF et 22.000 UI APMC pour une culture en milieu solide et 2.200 UI APF et 24.000 UI APMC pour une culture en milieu liquide.

Conclusion

Cette étude préliminaire permet donc d'envisager un nouveau procédé de valorisation pour la pulpe de betterave. Ce sous-produit agricole peut être en effet utilisé pour la culture d'un champignon filamenteux cellulolytique pour la production de protéines et de cellulases par la technique de croissance en milieu solide.

La cinétique comparée de biosynthèse des cellulases en milieu solide et en milieu liquide ne montre pas de différence importante. Par contre, les protéines produites par

T. harzianum en milieu solide sont plus stables car cette souche semble mieux adaptée à ces conditions de culture.

La cossette épuisée de betterave paraît être un excellent substrat pour la croissance de *T. harzianum* qui se développe en utilisant préférentiellement la cellulose contenue dans les cossettes et non pas les protéines. En effet, en fin de fermentation, la teneur en cellulose diminue de 50 % et celle des protéines augmente de 9 %. En outre, grâce au pouvoir tampon des cossettes, il n'est pas nécessaire de réguler le pH pendant toute la durée des cultures.

Ce nouveau produit fermenté enrichi en protéines et en cellulases pourrait donc être utilisé en alimentation animale (2) mais également pour la production de cellulases (11).

Bibliographie

- (1) - ROUSSOS S., RAIMBAULT M. - Hydrolyse de la cellulose par les moisissures II. Production de cellulases par *Trichoderma harzianum* cultivé en milieu liquide. *Ann. Microbiol.* (PARIS) sous presse.
- (2) - MUINDI P.J., HANSEN J.F. - Nutritive value of cassava root meal enriched by *Trichoderma harzianum* for chickens. *J. Sci. Food Agric.* 1981. **32** : 647-654.
- (3) - RAIMBAULT M., ALAZARD D. - Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1980. **9** : 199-209.
- (4) - RAIMBAULT M. - Fermentation en milieu solide : croissance de champignon filamenteux sur substrat amylicé. *Thèse Doct. d'Etat. Université Paul SABATIER - TOULOUSE.* 291 p - Ed. ORSTOM 1980.
- (5) - MILLER G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 1959. **31** : 426-428.
- (6) - ASHWELL G. - Colorimetric analysis of sugar - In « *Methods in Enzymology* », Acad. Press. New-York p 84-85 - 1957.
- (7) - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., and RANDALL R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. **193** : 265-275.
- (8) - MANDELS M., ANDREOTTI R., and ROCHE C. - Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* n° 6, 1976 : 21-33.
- (9) - STERNBERG D. - Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* n° 6, 1976 : 35-53.
- (10) - GEETHADEVI B.R., SITARAM N., MOHAMMAD KUNJI A.A., and RAMACHANDRA RAO T.N. - Screening of fungi single cell protein and cellulase production. *Ind. J. Microbiol.* 1978. **18** : 85-89.
- (11) - CONTRERAS I., GONZALEZ R., RONCO A. and ASENJO J.A. Cellulolytic enzymes for the hydrolysis of leached beet cossette. 1982. *Biotechnol letters* **4** : 51-56.