Gembloux Agro-Bio Tech
Université de Liège

Unité de Bio-Industries

PRINTEMPS DES SCIENCES 2015

DE L'ÉNERGIE DE LA LUMIÈRE À L'ÉNERGIE DES BIOCARBURANTS

RÉSUMÉ DE L'ATELIER :

L'atelier proposé se place dans le domaine des bio-carburants et plus particulièrement des bio-carburants de deuxième génération. Ceux-ci sont produits à partir de biomasse végétale provenant de l'agriculture et de la foresterie. Le bioéthanol est produit par la fermentation de sucres par la levure. Ceci n'est possible qu'à partir de sucres simples. Or, la biomasse végétale est composée de glucides complexes, comme la cellulose ou le xylose. Pour transformer le substrat complexe en substrat simple, des enzymes microbiennes peuvent être utilisées. Celles présentées lors de l'atelier proviennent de microorganismes isolés dans le système intestinal des termites. Ces enzymes sont efficaces pour transformer la cellulose ou le xylose en glucose, utilisable par la levure pour produire de l'éthanol. Pendant l'atelier, les participants observeront ces microorganismes au microscope. Ensuite, des tests sur boîte contenant des milieu spécifique aux enzymes étudiées seront réalisés pour mettre en évidence la production d'enzymes par les microorganismes. Enfin, ils réaliseront une fermentation de sucre par la levure. Un test colorimétrique rapide permettra d'observer la production d'éthanol par la levure.

DESCRIPTION DES ACTIVITÉS PROPOSÉES :

- DÉCOUVERTE DES MICROORGANISMES

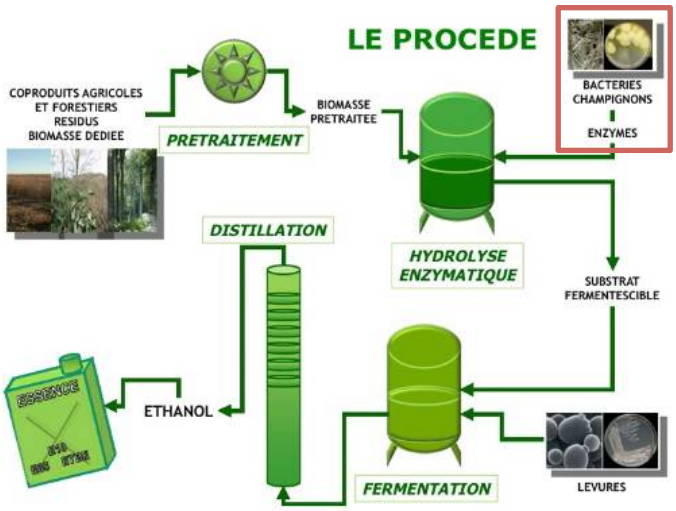
De tout temps, les microorganismes ont été utilisés par l'homme. D'une utilisation traditionnelle et empirique (fabrication de pain, de vin, de légumes fermentés,…), nous sommes passés à une utilisation contrôlées (processus industriel) jusqu'à aboutir au concept de « microb'usines » qui permet de produire, grâce aux microorganismes, des molécules qu'ils ne font pas forcément partie de leur métabolisme (production d'insuline, de vaccins,…). Les domaines d'application des microorganismes sont nombreux et comprennent outre l'alimentaire et la santé, les domaines de l'environnement (épuration des sols, récupération des métaux lourds) ainsi que le domaine de l'énergie (production de bioéthanol) qui nous occupe aujourd'hui. Le monde des microorganismes est vaste et varié : bactéries, levures, moisissures, micro-algues,… font partie de ce groupe.

MANIPULATION : observation au microscope de différents microorganismes

Différents microorganismes sont présentés sur boîte. Il s'agit des microorganismes utilisés dans la suite de l'atelier. Il s'agit de deux moisissures, *Trichoderma virens* et *Sarocladium kiliense*, et de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*. Un troisième type de microorganisme est également présenté : *Bacillus subtilis*. Il s'agit d'une bactérie pouvant être utilisée comme biopesticide. Elle est présentée ici pour montrer les 3 grands types de microorganismes que nous étudions au laboratoire.

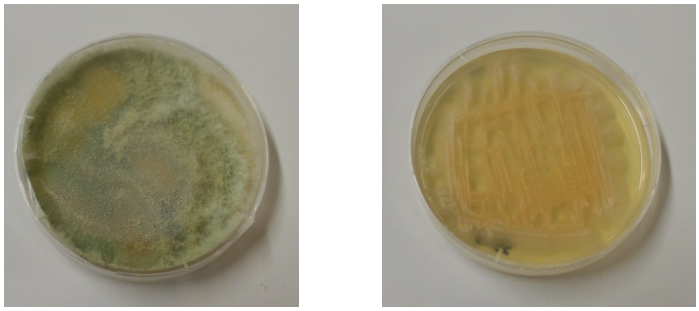
- MISE EN ÉVIDENCE DE LA PRODUCTION D'ENZYMES PAR LES MICROORGANISME

Le cas qui nous occupe aujourd'hui est les production de bioéthanol de deuxième génération, dont le schéma de production est présenté à la figure suivante. La différence avec le bioéthanol de première génération est la source de carbone utilisée. Les résidus de l'agriculture et des activités forestières sont préférés aux céréales et jus dérivé de la betterave.



Source : http://www.bioethanolcarburant.com

La partie qui nous intéresse dans ce schéma est la partie encadrée, à savoir la production d'enzymes par des bactéries et des moisissures. Ces enzymes vont permettre de transformer le substrat carboné complexe (cellulose, hemicellulose, xylane,…) en sucres plus simples assimilables par les levures dans un procédé de fermentation. Les microorganismes présentés ici ont été extraits de termites (voir atelier dédié). En effet, les termites sont connues pour leur capacité à dégrader le bois. C'est pourquoi des recherches ont été menées de manière à trouver quels microorganismes se trouvant naturellement dans l'intestin des termites étaient responsables de cette dégradation. De nombreux microorganismes ont pu être isolés et produits. Parmi ceux-ci, deux moisissures présentent de bonnes capacités enzymatiques, il s'agit de *Trichoderma virens* et *Sarocladium kiliense*.

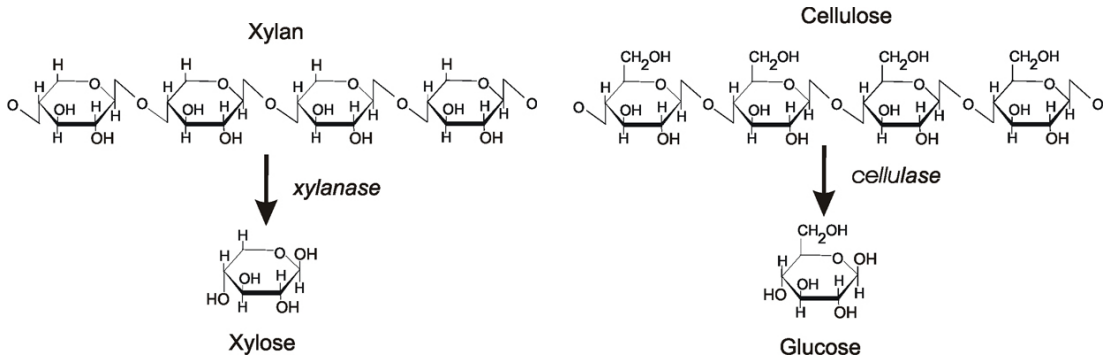


Photos de culture sur milieu gélose de *Trichoderma virens* (à gauche) et de *Sarocladium kiliense* (à droite)

Les enzymes sont des protéines, jouant le rôle de catalyseurs de réaction. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines (secteur des détergent, de la papeterie, de l'alimentaire,…) et

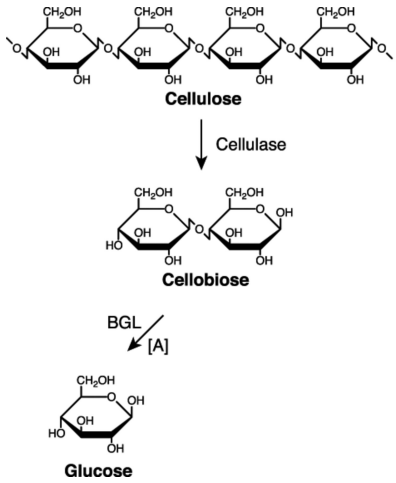
peuvent être d'origine animale, végétale ou microbienne. Elles sont classées selon la réaction qu'elles catalysent. Pour exemple, une protéase est une enzyme qui dégrade les protéines.

Les enzymes que nous allons étudier ici sont la xylanase, la cellulase et la β-glucosidase. La xylanase est responsable de la dégradation du xylane en xylose. La cellulose est un polymère complexe de glucose et le principal constituant de la paroi des végétaux. La dégradation de la cellulose en molécule de glucose est réalisée par la cellulase.



Source : www.biotek.com

Au cours de la dégradation de la cellulase, des molécules de glucose peuvent restées liées. Ce dimère de glucose est appelé cellobiose. La β-glucosidase permet d'obtenir des molécules de glucose libre du cellobiose.



Source : http://femsle.oxfordjournals.org/content/235/1/177

MANIPULATION : test du boîte avec milieu spécifique

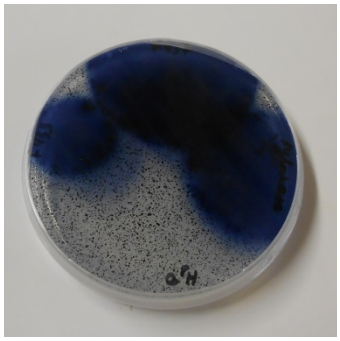
Trois milieux gélosés ont été préparés. Dans chacun d'eux, un substrat particulier de l'enzyme a été ajouté :

- milieu xylane pour la mise en évidence de l'activité xylanase
- milieu cellulose pour la mise en évidence de l'activité cellulase
- milieu esculine (molécule à base de glucose). pour la mise en évidence de l'activité β-glucosidase

Sur chacun des milieux, 4 produits vont être testés :

- Culture liquide de *Trichoderma virens*
- Culture liquide de *Sarocladium kiliense*
- Enzyme commerciale correspondant au milieu (xylanase, cellulase ou β-glucosidase) ➔ témoin positif
- Eau distillée ➔ témoin négatif

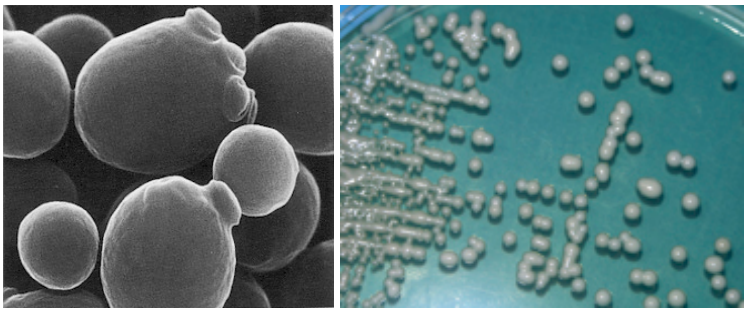
L'enzyme, en dégradant son substrat va libérer dans le milieu un colorant. L'activité enzymatique pourra donc être facilement détectable grâce à l'apparition d'un halo coloré à l'endroit où le produit testé aura été déposé. Le milieu restera inchangé à l'endroit où la goutte d'eau aura été déposée.



Mise en évidence de l'activité xylanase avec en haut : *Trichoderma virens*, à gauche : *Sarocladium kiliense*, à droite : xylanase commerciale et en bas : eau distillée

- <u>FERMENTATION DU SUCRE EN ÉTHANOL PAR LA LEVURE</u>

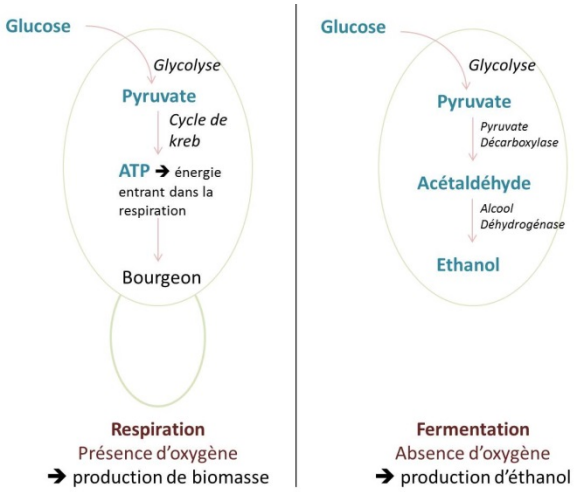
La levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée dans le domaine agro-alimentaire mais également dans le domaine de la santé puisque certains vaccins sont produits grâce aux levures. Il s'agit d'un microorganisme modèle. Son génome a été entièrement séquencés, ce qui permet de lui faire produire un grand nombre de molécule (essentiellement des protéines) qu'elle ne produit pas naturellement par modification de son génome.



Source : www.pixgood.com (à gauche) et image personnelle (à droite)

Elle possède un métabolisme particulier vis-à-vis du glucose. Elle peut, en présence d'oxygène, se multiplier par bourgeonnement grâce au glucose. On dit qu'elle produit de la biomasse. Par contre, en l'absence d'oxygène, le glucose est utilisé par la levure pour produire

de l'éthanol. Cette molécule est toxique pour la levure qui ne peut plus se développer lorsque la concentration en éthanol dans le milieu est de 15% (pour les souches les plus résistantes).



Comparaison entre les processus de respiration et de fermentation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Après fermentation, le milieu est centrifugé. L'éthanol se trouve dans le surnageant. Il est récupéré par distillation. Il peut alors entrer être mélangé à de l'essence et être vendu comme bioéthanol.

MANIPULATIONS :

- FERMENTATION DE SUCRES PAR LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Dans un erlenmeyer, 5 grammes de levure et 5 grammes de saccharose vont être mis en solution dans 100 ml d'eau distillée. Après mise en solution, l'erlenmeyer est laissé sur la paillasse, sans agitation.

- MISE EN ÉVIDENCE DU DÉGAGEMENT GAZEUX PAR UN BALLON

Un ballon est placé à l'embouchure de l'erlenmeyer. Lors de la fermentation, la levure va dégager du CO_2, celui-ci va faire gonfler le ballon.

- MISE EN ÉVIDENCE DE LA PRODUCTION D'ÉTHANOL PAR RÉACTION AU CHROMATE

La présence d'éthanol en fin de fermentation est mise en évidence par un test colorimétrique utilisant le chromate de potassium. Ce test est celui utilisé dans les éthylotests (voir photo).

Source : www.moniteurautomobile.be

Ce test se base sur la réaction chimique suivante :

$$3\ CH_3CH_2OH + 2\ Cr_2O7_2^- + 16\ H^+ \rightarrow 3\ CH_3COOH + 4\ Cr^{3+} + 11\ H_2O$$

Ethanol | Ion Chromate | Milieu Acide | Ion Chrome (III)

L'éthanol présent dans le milieu de fermentation réagit avec les ions chromate, de couleur orange, qui se transforme, en milieu acide en ions chrome de couleur verte. La réaction est illustrée par la photo suivante.

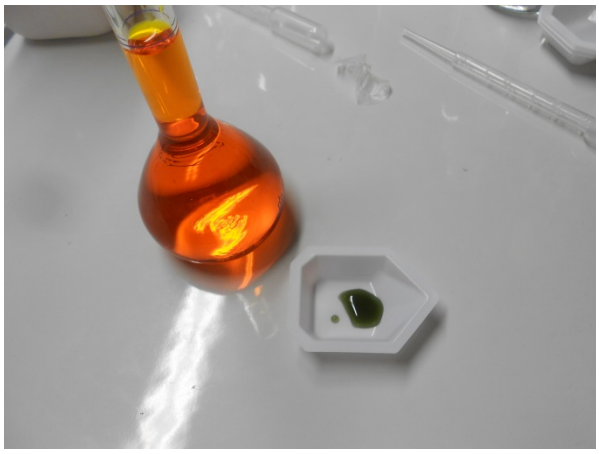


Illustration de la réaction entre l'éthanol et le chromate de potassium

Pour réaliser la réaction, 6 goutes de l'échantillon sont mises en relation avec 6 gouttes de $K_2Cr_2O_7$ 4% et 3 gouttes de H_2SO_4 98%. Après quelques secondes, le mélange se colore en vert, signe de la présence d'éthanol.