UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET DE CHIMIE
ICPEES, UMR 7515

THÈSE présentée par :

Flavie Prévot

soutenue le : **11 mars 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : **Chimie physique**

Valorisation de déchets végétaux pour la bioproduction de poly(acide lactique)

THÈSE dirigée par :

M. PHALIP Vincent	Maitre de Conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. DUCHIRON Francis	Professeur,Université de Reims Champagne Ardennes
M. BOURBIGOT Serge	Professeur, Université de Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. AVEROUS Luc	Professeur, Université de Strasbourg
Mme. HUSSON Florence	Maitre de Conférences, Université de Dijon
M. POLLET Eric	Maitre de Conférences, Université de Strasbourg

« Je ne veux pas être le produit de mon environnement, je veux que mon environnement soit mon produit à moi. »

Martin Scorsese

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Monsieur Vincent Phalip, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce projet. Je souhaite également le remercier pour sa disponibilité et pour tout le temps qu'il a mis à ma disposition pour diriger ce travail. Je suis vraiment très reconnaissante pour tout cela et je souhaiterais souligner le fait que j'ai vraiment apprécié son engagement et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Je pense être ressortie bien plus grande et forte de cette thèse par le fait d'avoir appris à être pluridisciplinaire et « multitâches », merci de m'avoir accompagnée dans ce parcours pas si facile.

Je souhaiterais également remercier Monsieur Eric Pollet et Monsieur Luc Avérous, pour toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter lors de cette thèse en particulier en ce qui concerne la dernière partie de ce travail de recherche.

Je souhaiterais remercier Madame Anne Forster, avec qui j'ai eu la joie de partager la première partie de mon doctorat. Ton aide m'a été précieuse dans de nombreux domaines. Merci d'avoir partagé tes connaissances avec moi et de m'avoir formée sur de nombreux concepts de microbiologie que je ne connaissais pas. Merci également à Olivier et Cédric qui ont aussi grandement participés à mon apprentissage durant les tous premiers mois.

J'ai une pensée toute particulière pour les anciens et les actuels doctorants du laboratoire de l'ICPEES avec qui j'ai eu l'occasion de partager mes joies et mes déceptions. Et je remercie aussi toutes les personnes du laboratoire qui m'ont aidée à un moment ou à un autre, qui m'ont aussi soutenue, et celles qui ont partagé mon bureau, les pauses clopes et les pauses colonnes aussi… Un merci tout particulier aux deux super chouettes nanas qui ont partagées ma dernière année de thèse. Amparo, je n'aurais pas assez de papier pour te dire à quel point ma thèse aurait été différente si tu n'étais pas arrivée, je n'aurais pas pu rêver mieux. Je pourrais citer pleins d'anecdotes ou de mots comme YumYum, déménagement, The strain, review, Jäger Bong, macaron, deltoïde… pour décrire tous les fous-rires ou grandes discussions que nous avons pu avoir mais comme je l'ai dit plus haut pas assez de papier… alors juste merci ! Constance, merci à toi aussi pour ta bonne humeur, ton empathie, ton soutien et toutes les longues discussions (drôle ou pas) que nous avons pu avoir. Les filles, les

repas Yum Yum vont presque me manquer, il faudra absolument trouver une nouvelle coutume !!!

Merci à mes amis qui m'ont toujours soutenue. Pauline, ma confidente, merci pour ta disponibilité dans les bons comme dans les mauvais moments. On peut dire qu'on en aura écrit des thèses et des mémoires ensembles… si on m'avait dit ça il y a 18 ans je n'y aurais pas cru ! Merci à ma précieuse équipe, Rabah, Antoine, Lara, Pierre, Céline (+1), Jeff, Marine Alex, Julie. Vous êtes une équipe « bluffante » comme dirait certains ! Merci à chacun de vous, vous avez tous quelque part participer à ma thèse, que cela soit en m'écoutant, en m'aidant (à dessiner par exemple), ou même encore en me supportant dans mes moments craquages ! Merci à vous tous pour toutes les belles soirées, vacances, fou-rires que nous avons partagés durant ces dernières années! La machine à écrire est prête pour les nouvelles histoires !

Merci à ma famille et mes proches de m'avoir soutenue. Merci Maman d'avoir toujours cru en moi! Merci Mamie ! Merci Sophie ! Merci Alain ! Merci Babette ! Merci Gilles ! Et merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui sauront lire entre les lignes.

Enfin, le meilleur pour la fin, merci à l'amour de ma vie, Julien. Merci pour ton soutien sans faille, ton amour et surtout pour arriver, en toutes occasions, à me voler un sourire !

Tables des matières

Remerciements 4
Tables des matières 6
Abréviations 7
Introduction générale 11
I. Revue bibliographique 15
A. "Bioproduction of organic acids building blocks from lignocellulosic ressources – Towards biobased polymers" .....Publication soumise à droit d'auteur 15
B. Les fermentations 16
1. La fermentation en milieu liquide 16
2. La fermentation en milieu solide (FMS) 17
3. Comparaison du contrôle des paramètres environnementaux en FMS et FML 19
Références : 20
C. Objectif de la thèse 22
II. "Screening of biomass, microorganisms and fermentation processes in biomass valorization through lactic acid production" 26
A. Résumé et perspectives 26
B. Article ..... Publication soumise à droit d'auteur 31
III. "From lignocellulosic biomass to biodegradable polymers: production of polylactic acid by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii* from wheat bran hydrolysate" 32
A. Résumé 32
B. Article .....Publication soumise à droit d'auteur 36
C. Résultats complémentaires 38
IV. Conclusion générale 42

Abréviations

A.

A.tubingensis: *Aspergillus tubingensis*

AFEX: Ammonia fiber explosion

ARP: Ammonia recycle percolation

Aw: water Activity

B.

BB: Building Block

BDO: 1,4-butanediol

C.

CNE: European commits for normalization

D.

DA: Dilute acid pretreatment

DEAE-Sepharose: Diethylaminoethyl–Sepharose

DOE: Department of Energy

E.

E.coli: *Escherichia coli*

EPFBF: Empty palm fruit bunch fibers

ESO: Epoxidized soyban oil

F.

FAO: Food and Agriculture Organization

FDCA: 2,5-Furandicarboxylic

FML : Fermentation en milieu liquide

FMS : Fermentation en milieu solide

FS: 2,5-furandimethylene succinate

G.

GA: Glucaric acid

GBL: ɣ-butyrolactone

GHG: Greenhouse gas

GRAS: Generally recognized as safe

I.

IEA: International Energy Agency

IA: Itaconic acid

IAn: Itaconic anhydride

L.

L.casei: Lactobacillus casei

L.delbrueckii: Lactobacillus delbrueckii

LAB: Lactic acid bacteria

LA: Lactic acid

LAd: Lactic acid duplicate

LAlb: Lactic acid from lignocellulosic biomass

$LA_{L/D}$: Lactic acid (L/D racemic mixture)

LHW: Liquid hot water

LP: Lime pretreatment

LSF: Liquid state fermentation

M.

MRS: Man, Rogosa, Sharpe

MSA: Methylsuccinate acid

MSW: Municipal solid waste

O.

OD: Optical density

OMMT: Organo-modified montmorillonite

P.

PA: Polyamide

PAA: Polyacrylic acid

PBS: Polybutylene succinate

PBMS: polybutylene 2-methyl succinate

PCL: Polycaprolactone

P[CL-co-LA]: Poly(ε-caprolactone-co-D,L-lactide)

PDA: Potato dextrose agar

PDB: Potato dextrose broth

PDO: Propylene glycol; 1,2-Propanediol

P[FS-co-BS]: Poly(2,5-furandimethylene succinate-co-butylene succinate)

PE: Polyethylene

PEP: Phosphoenolpyruvate

PET: Polyethyleneterephtalate

PGS: Polyglycerol-succinate

PHAs: Polyhydroxyalcanoates

PHB: Polyhydroxybutyrate

PIA: Polyitaconic acid

PLA: Polylactic acid

PLLA: L-Polylactic acid

R.

ROP: Ring opening polymerization

R.oryzae: Rhizopus oryzae

S.

S1: LSF on diluted acid hydrolysate

S2: SSF on diluted acid solid biomass

S3: LSF on enzymatic hydrolysate

S4: Simultaneous saccharification and fermentation

SA: Succinic acide

SE: Steam explosion

SSF: Solid state fermentation

SMPs: Shape-memory polymers

T.

TCA: Tricarboxylic pathway

Tg: Glass transition temperature

THF: Tetrahydrofuran

TPS: Thermoplastic starch

Introduction générale

L'augmentation des gaz à effet de serre, l'amoindrissement et la forte variation du coût des ressources fossiles, l'impact de plus en plus néfaste de notre système de production et de consommation sur l'environnement ainsi que la santé sont aujourd'hui des enjeux économiques et environnementaux au cœur des préoccupations de la société. Les domaines basés sur la valorisation des ressources renouvelables issues du végétal tel que la production de produits biosourcés et la chimie verte sont en voie de devenir une nécessité pour palier la diminution des ressources fossiles que va connaître le XXI^{ème} siècle. Le respect et la valorisation de la nature sont devenus des aspects déterminants pour la réalisation des futurs projets économiques et des projets de développement de produits finis. La chimie verte est un secteur d'ores et déjà considéré comme primordial et déterminant pour l'avenir de la planète. Les enjeux de la chimie verte sont multiples et ont notamment pour but de réduire l'impact de l'industrie chimique sur l'environnement, développer des technologies plus propres, valoriser les déchets et établir des prévisions de fin de cycle des produits manufacturés. L'un des principaux challenges actuels est donc de s'affranchir de l'utilisation massive du pétrole. Les ressources renouvelables issues du végétal constituent une bonne source de matières premières pour répondre à nos besoins qu'ils soient d'ordre énergétique ou pour la production de produits finis. Permettant d'obtenir le même panel de produits, c'est à dire les carburants et les molécules plateformes (« Building Block »), les raffineries pourraient à moyen terme être totalement remplacées par les bioraffineries utilisant la biomasse comme matière première. Il est important de distinguer deux types de bioraffineries, celles de première génération utilisant des plantes alimentaires comme les graines de céréales ou l'amidon, et celles de deuxième génération utilisant la biomasse lignocellulosique. Présentant la qualité indéniable de respecter l'environnement comparativement aux méthodes issues de la pétrochimie, la première génération présente néanmoins un grand problème éthique dû à l'utilisation de ressources alimentaires. Les recherches actuelles s'orientent donc vers la deuxième génération de bioraffineries. La biomasse lignocellulosique représente l'une des ressources naturelles la plus abondante sur terre et a pour avantage d'avoir un prix de revient extrêmement faible par rapport aux ressources fossiles. On estime à environ 180 milliard de tonnes par an, la production annuelle de la biomasse végétale terrestre or seulement 5% est actuellement utilisée par l'homme. On la retrouve partout autour de nous, de l'herbe aux résidus agricoles

et forestiers ainsi qu'aux sous-produits de transformation du bois. La biomasse lignocellulosique est constituée d'un réseau tridimensionnel de polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. La cellulose et l'hémicellulose sont des sources abondantes de sucres fermentescibles (hexoses et pentoses). De nombreux microorganismes utilisent ces sucres comme source d'énergie et en fonction de leur métabolisme permettent la production de produits divers comme l'éthanol, l'acide lactique, l'acide itaconique, l'acide succinique et autres. Le travail de cette thèse consiste à valoriser la biomasse lignocellulosique afin d'obtenir un produit biosourcé, le Poly(acide lactique)(PLA). Pour développer un procédé entier, plusieurs étapes clés ont été étudiées. Dans le but de produire de l'acide lactique avec un bon rendement, plusieurs stratégies de fermentation ont été évaluées en réalisant un criblage de plusieurs microorganismes et de plusieurs biomasses lignocellulosiques. Les autres étapes clés du procédé, l'extraction et la purification de l'acide lactique biosourcé issue du milieu de fermentation, ont également été abordées dans le but de produire le PLA.

Ce manuscrit est divisé en quatre parties. La première partie décrit la recherche bibliographique effectuée sur l'état de l'art du sujet. Ce chapitre a pour objectif de présenter les différents enjeux s'articulant autour de la valorisation de la biomasse lignocellulogique jusqu'à l'obtention de polymères biosourcés. Pour cela, une revue a été écrite. Après une description des prétraitements pouvant être utilisés sur la biomasse lignocellulosique, la notion et l'importance des « building blocks » ont été introduites. Aujourd'hui, l'importance de pouvoir les produire via l'utilisation de biomasse lignocellulosique au lieu de sucres et d'amidon semblent être au cœur des préoccupations. La production de quatre acides organiques « building blocks » d'intérêt particulier a été décrite (fermentation, microorganismes, biomasse lignocellulosique…) et leur potentialité en tant que plateforme de molécules chimiques a été mentionnée. Enfin, la production actuelle des biopolymères issus de ces quatre acides organiques et de leurs dérivés a été étudiée, en mentionnant la possibilité d'une future production issue de la biomasse lignocellulosique. La revue intitulée «Bioproduction of organic acids building blocks from lignocellulosic ressources - Towards biobased polymers» a été écrite en anglais et insérée telle que nous souhaitons la soumettre. Différents types de fermentation sont ensuite décrits en vue de compléter l'état de l'art du sujet évoqué dans la revue. Enfin, compte tenu des éléments bibliographiques, l'objectif de la thèse est décrit.

La deuxième partie de ce mémoire est consacrée à l'optimisation des choix de la biomasse lignocellulosique et du microorganisme en vue d'obtenir un bon rendement de

production d'acide lactique. Afin d'effectuer ce criblage, plusieurs stratégies de fermentation et de prétraitement de la biomasse lignocellulosique sont discutées. Après avoir décrit le contexte de l'étude et ses perspectives, les recherches sont présentées sous forme d'un article, intitulé « Screening of biomass, microorganisms and fermentation processes in biomass, valorization through lactic acid production », rédigé en anglais et retranscrit tel que nous souhaitons le soumettre.

La troisième partie du manuscrit est consacrée à l'étude du procédé dans sa globalité partant de la biomasse lignocellulosique jusqu'à l'obtention du PLA. Les choix du couple microorganisme/biomasse lignocellulosique et de la stratégie de fermentation ont été réalisés grâce aux résultats établis dans la partie précédente. Une optimisation du procédé de production d'acide lactique a été menée à plus grande échelle. Puis, l'extraction et la purification de l'acide lactique biosourcé a été étudié pour aboutir au PLA par polymerisation par ouverture de cycle « ring opening polymerization ». Après avoir décrit le contexte de l'étude, les recherches sont présentées sous forme d'un article, intitulé « From lignocellulosic biomass to biodegradable polymers: Production of polylactic acid by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii* from wheat bran hydrolysates », rédigé en anglais et soumis dans le journal « Industrial Crops and Products », accompagnés de résultats complémentaires.

Enfin la dernière partie retrace l'ensemble du procédé établi sur la valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de PLA biosourcé et servira de conclusion générale.

I. Revue bibliographique

A. “Bioproduction of organic acids building blocks from lignocellulosic ressources – Towards biobased polymers”

Publication soumise à droit d'auteur

B. Les fermentations

La fermentation est une technique utilisée depuis des millénaires par l'homme. Sa première fonction est d'assurer la conservation de denrées alimentaires comme les boissons alcoolisées ou encore le vinaigre. Cette conservation est possible grâce à deux types de fermentation, la fermentation alcoolique et la fermentation lactique également appelé lacto-fermentation. Il faudra néanmoins attendre le milieu du XIXème siècle pour voir une première avancée dans le domaine des fermentations et celui de leur maîtrise technologique. Pasteur a en effet porté ces travaux sur les ferments : il étudie alors la formation du vinaigre et la transformation de l'alcool en acide acétique grâce aux microorganisme *Mycoderma aceti* (Brown 1886). La fermentation industrielle commence à se développer entre 1900 et 1940 avec la production de nombreuses molécules telles que l'acétone, le butanol, le glycérol, l'acide nitrique et l'acide lactique. Les fermentations industrielles concernent aujourd'hui de nombreux secteurs comme l'alimentaire, la chimie fine mais aussi la cosmétologie et l'agro-industrie. Il existe plusieurs types de fermentation : la fermentation en milieu solide (FMS), la fermentation en milieu liquide (FML) et la fermentation submergée. La différence entre ces trois fermentations réside dans la variation des proportions des phases solide, liquide et gazeuse. En fermentation liquide, le milieu nutritif est complétement solubilisé dans l'eau tandis qu'en fermentation submergée, le milieu nutritif est sous la forme de fines particules en suspension dans la phase liquide. La sélection du milieu de culture, la stérilisation des équipements et du milieu de culture, la préparation de l'inoculum, la production en elle-même ainsi que la facilité d'extraction et de purification du produit sont des étapes très importantes et peuvent être déterminantes pour la sélection du type de fermentation. Le choix du microorganisme se doit d'être compatible avec le substrat sélectionné. Le contrôle ainsi que la régulation d'une fermentation sont effectués grâce aux paramètres environnementaux suivants : la température, l'aération (oxygène), le pH, l'agitation, l'emploi d'anti-mousse et la stérilité (Sargantanis, Karim et al. 1993).

1. La fermentation en milieu liquide

La fermentation en milieu liquide est actuellement la méthode la plus utilisée pour la production d'acide lactique à partir de différentes sources carbonées comme le lactose, le saccharose, les mélasses (Ohashi, Yamamoto et al. 1999) mais aussi à partir de l'amidon (Ohkouchi and Inoue 2006) et de la cellulose (Abe and Takagi 1991). C'est une fermentation favorable aux organismes unicellulaires tels que les bactéries et les levures. Ce type de

fermentation est adapté aux souches mutées ou modifiées génétiquement (Stephanopoulos 2007). Les cultures pures sont davantage adaptées, les cultures mixtes présentant de nettement moins bon résultats (contrairement à la FMS). L'inoculation des microorganismes se fait en cellules ou en volume de culture. La culture est homogène en tout point du substrat qui est aussi homogène. Les milieux de culture sont souvent des matières premières coûteuses, solubles ou sous forme de fines particules en suspension. Des prétraitements sont fréquemment employés (particulièrement pour la biomasse lignocellulosique) afin d'atteindre un milieu de culture liquide (Sun and Cheng 2002, Talebnia, Karakashev et al. 2010). Au sein du substrat, la quantité d'eau est non limitée et la quantité d'air est limitée contrairement au substrat employé en FMS. Le produit de fermentation qui est dilué au sein du substrat, demande des traitements important en vue de son extraction. En revanche, le produit présente un taux d'impuretés modéré contrairement à la FMS. Le procédé est relativement aisé en FML contrairement à la FMS. Le contrôle et la régulation des paramètres environnementaux sont aisés et des capteurs en ligne sont disponibles. Ce procédé génère néanmoins un volume important d'effluent à traiter.

2. La fermentation en milieu solide (FMS)

La fermentation en milieu solide est beaucoup moins utilisée pour la production d'acide lactique même si des travaux sont de plus en plus menés. Industriellement, la FMS est utilisée pour la production de biomasse, la production d'enzymes, la production de métabolites secondaires ou encore la production de spores (Couto and Sanromán 2006). En 2000, la FMS a été définie comme étant la croissance de microorganismes sur des substrats solides en absence ou presque d'eau libre (Pandey, Soccol et al. 2000). En 1980, Raimbault and Alazard, ont différencié deux types de FMS : la première étant une culture solide sur une phase substrat-support (assurant à la fois le support et la source de nutriments nécessaire aux microorganismes) et la deuxième étant une culture solide avec une phase support imprégnée d'un milieu liquide nutritif (Raimbault and Alazard 1980, Chen and He 2012). La FMS est donc un procédé constitué de trois phases : une phase solide, une phase liquide (absorbée ou complexée par le substrat) et une phase gazeuse piégée dans les particules (ou entre ces dernières). Pour permettre une bonne croissance des microorganismes et une bonne expression de leur métabolisme, la phase solide doit présenter une Activité de l'eau (Aw) optimale (Pandey 2003). La capacité en rétention d'eau des substrats solides peut varier de 12 à 90%, ce qui correspond à une Aw comprise entre 0.65 et 0.98 (Assamoi, Destain et al.

2009). Les champignons filamenteux FMS, comme *Rhizopus oryzae* sont des microorganismes très plébiscités en FMS, en raison de leur résistance à une faible Aw et à pression osmotique élevée. La FMS est considérée comme un procédé technologique reproduisant les conditions naturelles de vie des microorganismes, en permettant leur adhésion à la surface d'un support organique (Hölker and Lenz 2005). Par conséquent, la FMS est particulièrement adaptée aux organismes pluricellulaires et aux souches sauvages. Ce type de culture est hétérogène et l'inoculation se fait en conidies ou en mycélium. Les cultures peuvent être pures ou au contraire mixtes (synergie possible des métabolismes) (Brijwani, Oberoi et al. 2010). Un regard tout particulier doit être apporté au choix du substrat. Deux catégories de support sont distinguées : les supports inertes et les supports organiques. La première catégorie comprend les matériaux synthétiques comme la mousse de polyuréthane et les matériaux dits minéraux comme les granulés d'argile et les perlites. Ces matériaux ne constituent alors que des supports inertes et nécessitent l'apport d'un milieu nutritif (sel minéraux, source de carbone et d'azote). La deuxième catégorie est constituée des matériaux organiques naturelles de type amylacé ou lignocellulosique. Ce sont des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes tel que le son de blé, les rafles de maïs, la bagasse de canne à sucre, etc. Elles sont considérées comme des matières premières abondantes et par conséquent bon marché. Ces matériaux constituent à la fois le support et le substrat de la FMS (Durand 1998). Lors du choix du substrat, plusieurs facteurs rentrent en jeu : la taille des particules, la porosité, sa capacité de rétention d'eau (ou sa capacité à contenir des éléments nutritifs), son coût et sa disponibilité (Manpreet, Sawraj et al. 2005). De plus, la sélection du substrat doit se faire en affinité avec les microorganismes choisis. En effet, sa composition biochimique dans le cas d'un support organique aura une incidence directe sur les microorganismes et sur le profil enzymatique. Les procédés utilisés en FMS posent de nombreux problèmes dus à un contrôle et une régulation difficile des paramètres environnementaux tels que la température, le pH, l'agitation, etc. L'impossibilité de contrôler certains de ces paramètres à l'aide de capteurs en ligne lors de la fermentation est aujourd'hui un facteur limitant pour l'évolution des procédés de FMS (Bellon-Maurel, Orliac et al. 2003). Ce problème se retrouve lors d'un changement d'échelle (« scale up ») où les dispositifs sont encore en voie d'optimisation. Le besoin d'ingénierie et de conception de bioréacteurs à l'échelle industrielle pour la FMS est grand (Couto and Sanromán 2006). Cela est principalement dû à une faible standardisation de ce type de système, une hétérogénéité du substrat, à une reproductibilité limitée et à des problèmes pour miniaturiser des bioréacteurs (Bellon-Maurel, Orliac et al. 2003). L'extraction du produit fermenté en FMS représente un

avantage puisqu'elle nécessite en fonction de l'application aucune extraction ou l'utilisation d'un faible volume de solvant. Néanmoins le produit présente généralement un haut niveau d'impureté.

3. Comparaison du contrôle des paramètres environnementaux en FMS et FML

Le tableau ci-dessous (Tableau 1) compare le contrôle des différents paramètres environnementaux des procédés de FMS et FML. (Sargantanis, Karim et al. 1993, Raimbault 1998, Hölker and Lenz 2005, Manpreet, Sawraj et al. 2005, Duchiron 2011,Prévot, Lopez et al. 2013)

	Fermentation en milieu solide (FMS)	**Fermentation en milieu liquide (FML)**	**Avantage**
Température	Transfert de chaleur limité Risque de formation de gradient de température dans le milieu	Température Homogène	FML
pH	Régulation partielle et compliqué (ajout de solutions acides ou basiques, utilisation de systèmes tampon en solution ou via le support inerte)	Régulation simple (ajout de solution acide ou basique)	FML
Agitation	Absente, discontinue ou continue Contrainte de cisaillement limitée en raison des microorganismes employés (Champignons filamenteux)	Nécessaire (homogénéisation du milieu + aération pour les cultures aérobies) Contrainte de cisaillement élevée	/
Aération et oxygène	Pas ou peu de contraintes d'oxygénation, mycélium directement en contact avec l'air (cela peut néanmoins poser des problèmes en couche profonde)	Nécessaire en cas de cultures aérobies Peut-être compliquée en fonction de la viscosité du milieu et de la température	FMS
Anti-mousse*	Inutile	Nécessaire	FMS
Stérilité	Possibilité de travailler en condition non stérile / semi-stérile, lorsque la fermentation est lancée Risque de contamination faible	Nécessaire Risque de contamination élevé	FMS

Tableau 1: Comparaison du contrôle des paramètres environnementaux entre FML et FMS

*Chaque fois que l'on agite une solution contenant une impureté (tensioactif), l'apparition de mousse est automatique et immédiate. Cela peut dégrader les performances du produit fabriqué et/ou altérer les conditions opératoires.

Références :

A.

Abe, S.-i. and M. Takagi (1991). "Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid." Biotechnology and Bioengineering **37**(1): 93-96.

Assamoi, A. A., J. Destain and P. Thonart (2009). "Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo-beta-1, 4-xylanases de moisissures: le cas de Penicillium canescens." Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement **13**(2): 281-294.

B.

Bellon-Maurel, V., O. Orliac and P. Christen (2003). "Sensors and measurements in solid state fermentation: a review." Process Biochemistry **38**(6): 881-896.

Brijwani, K., H. S. Oberoi and P. V. Vadlani (2010). "Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran." Process Biochemistry **45**(1): 120-128.

Brown, A. J. (1886). "XIX.—The chemical action of pure cultivations of bacterium aceti." J. Chem. Soc., Trans. **49**: 172-187.

C.

Chen, H. z. and Q. He (2012). "Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **87**(12): 1619-1625.

Couto, S. R. and M. A. Sanromán (2006). "Application of solid-state fermentation to food industry—a review." Journal of Food Engineering **76**(3): 291-302.

D.

Duchiron, F., Copinet, Estelle. (2011). "Fermentation en milieu solide (FMS).", from http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/concepts-equipements-et-reglementations-des-biotechnologies-42164210/fermentation-en-milieu-solide-fms-bio620/#.

Durand, A. (1998). "La fermentation en milieu solide." Biofutur **1998**(181): 41-43.

H.

Hölker, U. and J. Lenz (2005). "Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages?" Current Opinion in Microbiology **8**(3): 301-306.

M.

Manpreet, S., S. Sawraj, D. Sachin, S. Pankaj and U. Banerjee (2005). "Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation." Mal J Microbiol **1**(2): 1-9.

O.

Ohashi, R., T. Yamamoto and T. Suzuki (1999). "Continuous production of lactic acid from molasses by perfusion culture of Lactococcus lactis using a stirred ceramic membrane reactor." Journal of Bioscience and Bioengineering **87**(5): 647-654.

Ohkouchi, Y. and Y. Inoue (2006). "Direct production of l(+)-lactic acid from starch and food wastes using Lactobacillus manihotivorans LMG18011." Bioresource Technology **97**(13): 1554-1562.

P.

Pandey, A. (2003). "Solid-state fermentation." Biochemical Engineering Journal **13**(2): 81-84.

Pandey, A., C. R. Soccol and D. Mitchell (2000). "New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products." Process Biochemistry **35**(10): 1153-1169.

Prévot, V., M. Lopez, E. Copinet and F. Duchiron (2013). "Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis." Bioresource technology **129**: 690-693.

R.

Raimbault, M. (1998). "General and microbiological aspects of solid substrate fermentation." Electronic Journal of Biotechnology **1**(3): 26-27.

Raimbault, M. and D. Alazard (1980). "Culture method to study fungal growth in solid fermentation." European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology **9**(3): 199-209.

S.

Sargantanis, J., M. Karim, V. Murphy, D. Ryoo and R. Tengerdy (1993). "Effect of operating conditions on solid substrate fermentation." Biotechnology and bioengineering **42**(2): 149-158.

Stephanopoulos, G. (2007). "Challenges in engineering microbes for biofuels production." Science **315**(5813): 801-804.

Sun, Y. and J. Cheng (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." Bioresource technology **83**(1): 1-11.

T.

Talebnia, F., D. Karakashev and I. Angelidaki (2010). "Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation." Bioresource Technology **101**(13): 4744-4753.

C. Objectif de la thèse

Le projet s'inscrit dans la problématique du développement durable. Il a pour but de produire du poly(acide lactique) à partir de biomasse lignocellulosique en utilisant des procédés les plus respectueux possible de l'environnement. La production industrielle de l'acide lactique utilise déjà un procédé basé sur l'emploi des ressources végétales (amidon). Néanmoins, l'utilisation de l'amidon pour cette production entre en compétition avec son usage alimentaire. Ce procédé pose aujourd'hui un problème éthique dans un monde où 868 millions de personnes ont un apport énergétique insuffisant (Food and Agriculture Organization (FAO, 2013)). Par conséquent, le développement d'un procédé utilisant la biomasse lignocellulosique comme matière première permettrait une production plus respectueuse de notre environnement.

Dans ce travail, la production d'acide lactique s'effectue en plusieurs étapes clés. Au préalable, la biomasse lignocellulosique doit être prétraitée afin de déstructurer et d'hydrolyser la paroi végétale. Cette étape est nécessaire car elle permet la libération des sucres fermentescibles nécessaires aux microorganismes pour produire l'acide lactique. Ensuite vient la fermentation en elle-même. Elle nécessite la sélection de biomasse, des microorganismes et la mise en place de différentes stratégies de fermentation. L'acide lactique produit est ensuite extrait et purifié. La dernière étape consiste à polymériser cet acide lactique en PLA. Les techniques utilisées dans chaque étape ont été choisies afin de répondre aux critères d'un procédé engagé dans le développement durable. Le schéma ci-dessous illustre les étapes clés du projet de production d'un PLA bio-sourcé (Figure 1).

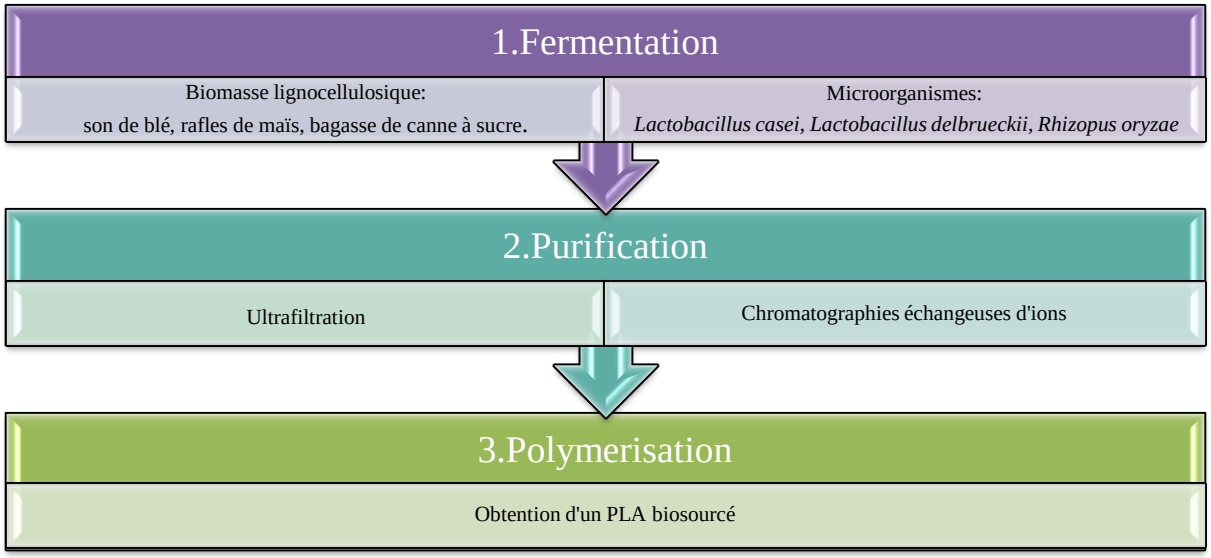


Figure 1 : Description du projet de thèse

Pour cette étude, trois biomasses lignocellulosiques ont été utilisées : le son de blé, les rafles de maïs et la bagasse de sucre de canne. Trois microorganismes ont été sélectionnés pour leur métabolisme permettant la production d'acide lactique. *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus delbrueckii* (bactéries lactiques) ont été choisis en raison de leur production majoritaire de L-lactique acide et D-lactique acide respectivement. *Rhizopus oryzae* (champignon filamenteux) a été sélectionné pour sa capacité à produire exclusivement du L-lactique acide et son aptitude à coloniser les substrats solides. Dans un premier temps, un criblage biomasse/microorganisme a été réalisé pour déterminer le couple permettant la meilleure conversion des sucres fermentescibles en monomère (D-lactique acide et/ou L-lactique acide) et pour déterminer le meilleur rendement d'acide lactique par rapport à la quantité de biomasse lignocellulosique utilisée. Afin d'optimiser le criblage, quatre stratégies de fermentation ont été mise en place grâce à l'utilisation de deux types de prétraitements (hydrolyse à l'acide dilué et hydrolyse enzymatique) et de deux types de fermentations (FML et FMS). Le prétraitement, une hydrolyse à l'acide diluée (1% H_2SO_4, 30 min, 150°C) est un procédé commun à toutes les stratégies établies et permet une prédigestion de la biomasse lignocellulosique, en particulier de l'hémicellulose. L'hydrolyse enzymatique, utilisant un cocktail enzymatique *Aspergillus tubingensis* / son de blé, complète dans certains cas l'hydrolyse acide afin d'améliorer la dégradation de la cellulose. Les prétraitements de la biomasse sont utilisés dans le but de faciliter l'accès aux sucres fermentescibles (hexoses et pentoses) pour le microorganisme augmentant ainsi le rendement de production du monomère lactique non seulement par rapport à la quantité de biomasse lignocellulosique utilisée mais

aussi par rapport à la conversion des sucres fermentescibles. La durée de la fermentation, la durée des prétraitements nécessaires à la biomasse, la quantité de biomasse utilisée, la concentration de production du monomère et la facilité de mise en œuvre du procédé à grand échelle sont des éléments qui ont été pris en compte pour notre sélection. La stratégie de fermentation choisie a alors été soumise à un « scale-up » avec les couples biomasse lignocellulosique / microorganismes présentant les meilleures résultats. Lors du passage à grande échelle, la stratégie a été optimisée afin d'augmenter la production d'acide lactique et ainsi accéder à la deuxième partie du projet. Cette deuxième partie consiste à développer une technique qui permet de purifier le milieu issu de la fermentation pour isoler ainsi l'acide lactique pur. Pour cela, un protocole en plusieurs étapes a été mis en place permettant ainsi une purification optimale. La première étape consiste en une ultrafiltration du milieu de fermentation afin d'éliminer les plus grandes impuretés du milieu telles que les particules en suspension, les bactéries, les protéines, etc. La deuxième étape utilise un procédé de chromatographie par échange d'ions afin de purifier l'acide lactique. La dernière partie du projet est axée l'élaboration d'un produit biosourcé : le PLA. Toutes les réactions ont été réalisées en masse, oligomérisation de l'acide lactique par polycondensation, puis une cyclisation pour l'obtention du lactide et enfin une polymérisation par ouverture de cycle « ring opening polymerization » pour l'obtention du PLA.

Toutes les démarches entreprises dans ce projet ont pour but de respecter les principes de la chimie verte tels que la valorisation de la biomasse végétale non-alimentaire, l'emploi de méthode entraînant peu/pas de déchets, la production de produits biosourcés et la diminution des coûts énergétiques.

II. “Screening of biomass, microorganisms and fermentation processes in biomass valorization through lactic acid production”

A. Résumé et perspectives

Dans ce chapitre, la valorisation de la biomasse lignocellulosique a été étudiée en vue de produire de l’acide lactique. Pour cela plusieurs biomasses lignocellulosiques ont été étudiées, plusieurs microorganismes sélectionnées et plusieurs stratégies de fermentation, basées sur différents prétraitements, ont également été mises en place. Le son de blé (Comptoir Agricole de Hochfelden), les rafles de maïs (Comptoir Agricole de Hochfelden) et la bagasse de sucre de canne (Syral) sont les substrats lignocellulosiques qui ont été utilisés durant cette étude. Les microorganismes suivants ont été sélectionnés sur leur capacité à produire de l’acide lactique : *Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii et Rhizopus oryzae.*

L. casei et *L. delbruckii* sont des bactéries lactiques productrices de L (+) et D (-) acide lactique. Les espèces de *Lactobacillus* sont considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe). Elles ont été en premier lieu classées en trois genres (*Therbacterium, Betabacterium et Streptobacterium*) selon des critères de température optimale de croissance et de produit de fermentation des sucres par Orla-Jensen en 1919. Néanmoins en 1986, suite à leurs travaux de taxonomie moléculaire, Kandler et Weiss (1986) ont revu cette classification en trois groupes : Groupe I, Groupe II et Groupe III correspondant respectivement au genres précédemment énoncés. *L. casei* appartient au Groupe III, qui comprend les espèces à métabolisme hétérofermentaire facultatif. Les hexoses sont fermentés par la voie d’Emden-Meyerhof en acide lactique tandis que les pentoses peuvent l’être également en empruntant la voie hétérofermentaire. *L. casei* a été sélectionné pour son aptitude à produire majoritairement du L (+) acide lactique. *L. delbrueckii* appartient au Groupe I, qui comprend les lactobacilles au métabolisme strictement homofermentaire, a été sélectionné pour son aptitude à produire majoritairement du D(-) acide lactique. *R. oryzae* est un champignon filamenteux utilisant également la glycolyse dans son intégralité pour la production d’acide lactique. Contrairement aux bactéries lactiques, il possède uniquement le gène l-ldh codant la L-lactate

déshydrogénase et par conséquent il produit exclusivement du L(+) acide lactique. Ce microorganisme a été sélectionné parce qu'il est filamenteux et possède donc la capacité de coloniser efficacement les substrats solides.

Cette étude se concentre sur le criblage des différents couples microorganisme/biomasse et sur les différentes stratégies de fermentation afin d'identifier le meilleur microorganisme, la meilleure biomasse et la meilleure stratégie. Afin de libérer les sucres fermentescibles, la biomasse lignocellulosique brute a été prédigérée. Pour cela deux prétraitements ont été testés: l'hydrolyse à l'acide dilué et l'hydrolyse enzymatique. Ces prétraitements ont permis de développer quatre stratégies de fermentation. Chaque stratégie a été réalisée sur chaque biomasse et avec chaque microorganisme.

Un premier prétraitement, l'hydrolyse à l'acide dilué a été effectuée sur les biomasses brutes. Ce prétraitement permet de fractionner, solubiliser et hydrolyser l'hémicellulose, la cellulose et la lignine. L'hémicellulose est mieux dégradée par ce type de prétraitement. Ce prétraitement a donné lieu à l'élaboration de deux stratégies de production d'acide lactique. La stratégie 1 (S1) correspond à une fermentation en milieu liquide sur l'hydrolysat acide issu de chaque biomasse. S2 correspond à une fermentation en milieu solide sur chaque biomasse prétraitée suite à l'hydrolyse acide et adaptée aux conditions optimales de chaque microorganisme.

Un deuxième prétraitement, l'hydrolyse enzymatique a été réalisée sur chaque biomasse prétraitée. Ce prétraitement est préconisé en ajout à l'hydrolyse acide pour une hydrolyse plus complète des polysaccharides de la biomasse, en particulier ceux issus de la dégradation de la cellulose. Dans un premier temps, afin d'effectuer l'hydrolyse enzymatique, une étude rapide a été menée afin d'élaborer un cocktail enzymatique adéquat. Ce dernier a été obtenu suite à une fermentation en milieu solide sur le son de blé non prétraité. Plusieurs microorganismes (*Aspergillus tubingensis, Trichoderma sp, Rhizopus oryzae, Fusarium venenatum*) ont été testés afin de sélectionner le cocktail le plus performant. Le couple *Aspergillus tubingensis/* son de blé a été choisi suite à l'analyse des résultats obtenus lors des dosages des activités enzymatiques des cocktails. Chaque biomasse prétraitée à l'acide dilué a subi une hydrolyse enzymatique avec ce cocktail enzymatique. Suite à ce prétraitement, deux autres stratégies de fermentation ont été réalisées. La stratégie S3 correspond à une fermentation en milieu liquide sur l'hydrolysat enzymatique issu de chaque biomasse devenant le milieu de fermentation après avoir été traité pour permettre la croissance de

chaque microorganisme dans des conditions optimales. S4 correspond à une saccharification et fermentation solide simultanées. Cette fermentation en milieu solide s'effectue sur chaque biomasse prétraitée à l'acide dilué en présence du cocktail enzymatique pour humidifier le substrat. Toutes ces stratégies ont été menées sans aucun ajout de sucres ou de nutriments. En effet, les milieux de fermentation utilisés (liquide ou solide) proviennent directement des prétraitements réalisés sur la biomasse lignocellulosique et ont été substitués au milieu de fermentation standard.

Les résultats obtenus grâce aux quatre stratégies mises en place montrent que la production d'acide lactique diffère en fonction du substrat lignocellulosique utilisé. Les biomasses lignocellulosiques ne se comportent pas de la même manière lors de prétraitement visant à digérer la paroi lignocellulosique et par conséquent ne libère pas la même quantité de sucres fermentescibles. En effet, les biomasses étudiées ne possèdent pas la même proportion de chaque polymère constituant le complexe lignocellulosique et donc ne répondent pas de la même manière aux prétraitements. Le son de blé est la biomasse lignocellulosique ayant eu les meilleurs résultats avec toutes les stratégies mises en place et avec tous les microorganismes étudiés. Cela s'explique en partie par sa structure, avec un pourcentage de lignine faible et un pourcentage d'hémicellulose plus élevé que celui de cellulose. Cette biomasse répond bien aux prétraitements mises en place et est celle qui permet d'obtenir le meilleur rendement de conversion du glucose en acide lactique et le meilleur rendement d'acide lactique par rapport à la quantité de biomasse lignocellulosique utilisée.

Les bactéries lactiques présentent les meilleurs résultats dans toutes les stratégies sauf dans le cas de S1 où le champignon filamenteux montre des résultats légèrement supérieurs. Les bactéries lactiques s'adaptent donc à tous les types de stratégies misent en place puisqu'elles produisent dans tous les cas de l'acide lactique. Dans le cas du champignon filamenteux, la faible quantité de glucose semble être un facteur limitant à la production d'acide lactique. En effet, malgré l'observation de la croissance, le champignon sporule très vite dans chaque stratégie et produit rarement de l'acide lactique. Il n'y a qu'en FML que ce dernier produit de l'acide lactique et cela uniquement sur les hydrolysats issus du prétraitement du son de blé. L'existence chez ce champignon d'une lactate déshydrogénase, potentiellement régulée de manière différentielle par des éléments des hydrolysats, capable de fonctionner dans le sens de la consommation de l'acide lactique pour former du pyruvate dans des conditions de déficit en glucose pourrait expliquer ces observations.

S3 a obtenu les meilleurs résultats sur toutes les biomasses utilisées avec les bactéries lactiques en termes de rendement d'acide lactique par masse de substrat lignocellulosique utilisé. Le meilleur rendement est obtenu avec le couple *L. casei* / son de blé, il atteint 72mg/g soit presque sept fois plus que le rendement obtenu avec le même couple dans toutes les autres stratégies. Néanmoins S1 a obtenu les meilleurs rendements de conversion de glucose en acide lactique et cela avec toutes les biomasses (sauf dans le cas du couple *L. casei* / bagasse de canne à sucre qui atteint un rendement légèrement meilleur en S3). Le meilleur rendement est obtenu avec le couple *R. oryzae* / son de blé (77%), alors qu'avec S3, le rendement est de 6% seulement. Il est suivi de près par les couples *L. casei* / son de blé et *L. delbrueckii* / son de blé qui atteignent respectivement 73% et 52% avec S1 (comparativement à 63% et 21% avec S3).

Cette étude a été menée dans le but de choisir les microorganismes, la biomasse lignocellulosique et la stratégie de fermentation la plus adaptée à une production d'acide lactique. Suite aux différents résultats obtenus, les bactéries lactiques (*L. casei* et *L. delbrueckii*), le son de blé ont été sélectionnés. La FML sur hydrolysat enzymatique (S3) semble être plus adaptée pour la conversion en termes de quantité de son de blé tandis que la FML sur hydrolysat acide (S1) semble plus adaptée pour la conversion du glucose en acide lactique (Tableau 2).

	S1 (fermentation liquide sur hydrolysat acide)		**S2** (fermentation solide sur hydrolysat acide)		**S3** (fermentation liquide sur hydrolysat enzymatique)		**S4** (saccharification et fermentation solide simultanées)	
	L.casei	*L.delbrueckii*	*L.casei*	*L.delbrueckii*	*L.casei*	*L.delbrueckii*	*L.casei*	*L.delbrueckii*
Rendement (% glc)	73.2	51.8	-	-	62.9	20.9	-	-
Rendement (mg/g)	9.9	7.0	12.6	14.9	72.3	24.0	11.7	15.6
Nombre d'étapes	1		1		2		2	

Tableau 2 : Production d'acide lactique en utilisant les différentes stratégies de fermentation

Pour la suite de l'étude, la FML sur hydrolysat acide a été privilégiée, pour des raisons qui seront explicitées dans le prochain chapitre. Celui-ci décrit le « scale up » de la stratégie choisie. Les paramètres sélectionnés ont été optimisés afin d'atteindre une production d'acide lactique plus élevée en vue d'une extraction/purification de l'acide lactique et d'une polymérisation pour permettre la synthèse de poly(acide lactique) (PLA) à partir de biomasse lignocellulosique.

Dans la partie suivante se trouve l'article issu de ces recherches, intitulée « Screening of biomass, microorganisms and fermentation processes in biomass, valorization through lactic acid production », rédigé en anglais et retranscrit tel que nous souhaitons le soumettre.

B. Article

Screening of biomasses, microorganisms and fermentation processes in biomass valorization through lactic acid production.

Flavie Prévot[1], Anne Forster[2], Eric Pollet[1], Luc Avérous[1], Vincent Phalip[1, 2]

Author's information:

[1] Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé, UMR 7515, Université de Strasbourg, ECPM, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France.

[2] Ecole de Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Université de Strasbourg, ESBS, 300 boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch Cedex, France.

Corresponding author: V. Phalip, E-mail: phalip@unistra.fr, Phone: +33(0)3 68 85 48 20

Publication soumise à droit d'auteur

III. “From lignocellulosic biomass to biodegradable polymers: production of polylactic acid by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii* from wheat bran hydrolysate"

A. Résumé

Dans ce chapitre, la mise en place d’un procédé complet débutant de la biomasse lignocellulosique et allant jusqu’à l’obtention du poly(acide lactique) a été étudié. Lors du précédent chapitre, il a été mis en évidence que les couples LAB / son de blé présentent les meilleurs résultats pour la production d’acide lactique. Il a également été mis en évidence que la stratégie de fermentation en milieu liquide sur hydrolysat enzymatique (S3) présente les meilleurs résultats pour la conversion d’acide lactique vis à vis de la quantité de son de blé employée tandis que la FML sur hydrolysat acide (S1) semble être plus adaptée pour la conversion du glucose en acide lactique.

En se basant sur ces conclusions, S1 a été privilégiée et développée afin d’augmenter la production d’acide lactique. En effet, sa mise en œuvre en termes de gain de temps et de manipulations est beaucoup plus avantageuse. S3 nécessite deux prétraitements de la biomasse lignocellulosique et la préparation d’un cocktail enzymatique alors que S1 nécessite un seul prétraitement. De plus, le fait que la conversion du glucose en acide lactique soit plus importante avec S1 a également été un argument déterminant pour la sélection de cette stratégie. Lors du « scale-up », deux optimisations ont été effectuées. L’hydrolysat acide a été dilué au quart dans de l’eau ultra-pure afin de limiter la concentration des inhibiteurs de croissance potentiels. Il a également a été supplémenté en glucose (100g/l) afin d’augmenter la concentration finale d’acide lactique au sein du milieu de fermentation.

Le fermenteur BIOSTAT®B (B. Braun Biotech International) d’un volume utile de 1.6L a été utilisé. Contrairement aux expériences menées lors du 2ieme chapitre, le passage à l’étape pilote a permis un suivi permanent des paramètres environnementaux au sein du substrat comme le pH, la température, la pO_2. L’optimisation de la stratégie S1 (dilution de l’hydrolysat et ajout de glucose) ainsi que le suivi des précédents paramètres ont permis

d'obtenir un rendement de la production d'acide lactique par rapport au glucose d'environ 60% concernant *L. casei* (majoritairement du L-acide lactique) en quinze jours (avec une concentration en acide lactique de 63.5g/l) et d'environ 33% pour *L. delbrueckii* (majoritairement du D-acide lactique) en trois semaines (avec une concentration de 35g/l). Les rendements obtenus sont comparables à ceux atteint lors de la fermentation à petite échelle qui étaient de 73% et 52% respectivement pour *L. casei* et *L. delbrueckii*. La dilution au quart de l'hydrolysat et l'addition de glucose ont permis d'obtenir des rendements d'acide lactique par rapport à la masse de son de blé utilisée de 0.9g/g pour *L. casei* et de 0.5g/g pour *L. delbrueckii.* Comparativement à la fermentation non optimisée sur hydrolysat acide (S1) à petite échelle, où les rendements été de 9mg/g et de 7mg/g pour *L. casei* et *L. delbrueckii*, il est évident que l'optimisation a été effectuée avec succès.

La deuxième partie du travail a constitué à purifier l'acide lactique contenu dans le milieu de fermentation. Un protocole en plusieurs étapes permettant une purification optimale a été mis en place. Dans un premier temps, le milieu de fermentation subit une ultrafiltration (VIVACELL 100, Sartorius, cut off : 10 kDa) afin de clarifier le milieu. Puis dans un second temps, l'acide lactique contenu dans le milieu de fermentation clarifié est purifié grâce à la chromatographie par échange d'ions (des colonnes cationiques et anioniques sont successivement utilisées). La colonne échangeuse de cations choisie est une colonne acide forte : S-Sépharose Fast-Flow (Pharmacia). Les fractions ayant un pH inférieur au pKa de l'acide lactique (3.8) sont récoltées dans le but de passer dans la colonne échangeuse d'anions basique faible : DEAE-Sepharose Fast-Flow (Pharmacia). Cette colonne permet principalement d'éliminer toute trace de chlorures et de phosphates. Suite à ces étapes de purification, on obtient une solution aqueuse contenant l'acide lactique pur. L'acide lactique est ensuite isolé sous la forme d'une huile jaune clair par évaporation de l'eau grâce au rotavapor. Les rendements de purification obtenus sont 40.7% pour l'acide lactique issu du couple *L.casei* / son de blé et 34% pour l'acide lactique issu du couple *L. delbrueckii* / son de blé. Cette étape s'est avérée être l'étape limitante de notre procédé à cette échelle (un grand nombre de répétitions des manipulations a été nécessaire). L'acide lactique obtenu a été dosé afin d'évaluer leur proportion en isomère : l'acide lactique issu de la fermentation *L.casei* / son de blé possède en moyenne 93.5% L- acide lactique et 6.5% D- acide lactique, tandis que l'acide lactique issu de la fermentation *L.delbrueckii* / son de blé possède en moyenne 11% L-acide lactique et 89% D-acide lactique. Ces résultats correspondent bien aux résultats attendus et obtenus sur milieu riche MRS (chapitre 2). La polymérisation de l'acide lactique issu de la

fermentation avec *L. casei* a ensuite été réalisée. Cette polymérisation a été menée en trois étapes. La première étape a consisté en une polycondensation en masse sans catalyseur pour obtenir les oligomères (180°C, 25mmHg, 24h). Ensuite une dépolymérisation en masse avec l'octanoate d'étain (0.2 % en masse par rapport aux oligomères) a été réalisée afin d'obtenir le lactide (200°C, 2mmHg). Cette étape a été effectuée à l'aide d'un Kügelrohr. Enfin la dernière étape a consisté en une polymérisation par ouverture de cycle « ring opening polymerisation » (ROP) avec l'octanoate d'étain comme catalyseur (2.5 % en masse par rapport au lactide) (160°C, Patm, 3h). La dernière étape de polymérisation n'a pu être conduite totalement avec l'acide lactique purifié en raison de l'étape limitante que représente la purification. Par conséquent, les dernières étapes de polymérisation de l'acide lactique en PLA ont été effectuées en utilisant des mélanges d'acides lactiques commerciaux mimant le plus fidèlement possible les mélanges biosourcés dans le but d'obtenir les principales caractéristiques du PLA attendu. La quantité d'acide lactique purifié issue du couple *L. casei* / son de blé a permis de réaliser les deux premières étapes de la polymérisation permettant ainsi de valider la cohérence entre l'acide lactique produit et celui reconstitué avec les produits commerciaux. Le PLA obtenu présente les caractéristiques suivantes : Mn : 6000 g/mol, Mw : 14700 g/mol et un indice de polydispersité de 2.9.

Des résultats complémentaires à la publication concernant la polymérisation avec l'acide lactique issu de la fermentation avec *L. delbrueckii* sont présentés dans une troisième sous-partie. Cette partie a été effectuée avec un mélange racémique commercial d'acide lactique et par conséquent ne mime pas les caractéristiques que le polymère issu du couple *L. delbrueckii* / son de blé aurait pu avoir. Le PLA obtenu présente les caractéristiques suivantes : Mn : 2200 g/mol, Mw : 10000 g/mol et un indice de polydispersité de 4.55.

Toutes les démarches qui ont été entreprises dans ce projet ont pour but de répondre au mieux aux différents principes de la chimie verte comme la valorisation de la biomasse végétale non-alimentaire, l'emploi de méthode entraînant pas ou peu de déchets, la production de produits biosourcés et la diminution des coûts énergétiques.

Les perspectives résident essentiellement dans le changement d'échelle du protocole ici mis en place. Les rendements de purification présentés pourraient sans doute être augmentés en augmentant l'échelle de purification, particulièrement celle effectuée lors de la première étape de manipulation avec la colonne cationique.

Dans la partie suivante se trouve l'article issu de ces recherches, intitulé « From lignocellulosic biomass to biodegradable polymers: production of polylactic acid by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii* from wheat bran hydrolysate », rédigé en anglais et soumis dans le journal « Industrial Crops and Products ».

B. Article

From lignocellulosic biomass to biodegradable polymers: Production of polylactic acid by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii* from wheat bran hydrolysates.

Flavie Prévot, Eric Pollet, Luc Avérous, Vincent Phalip

Author information:

[1] Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé, Université de Strasbourg, ECPM, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France.

[2] Ecole de Supérieur de Biotechnologie de Strasbourg, Université de Strasbourg, ESBS, 300 boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch Cedex, France.

Corresponding author: V. Phalip, E-mail: phalip@unistra.fr
Phone: +33(0)3 68 85 48

Publication soumise à droit d'auteur

C. Résultats complémentaires

Cette partie est consacrée à des résultats expérimentaux supplémentaires non inclus dans la publication présentée ci-dessus. Cela concerne la polymérisation effectuée à partir du D-acide lactique produit par la fermentation du couple son de blé / *Lactobacillus delbrueckii*. Néanmoins en raison d'un faible rendement de purification, la quantité d'acide lactique récupérée ne permet pas d'effectuer la polymérisation dans des conditions satisfaisantes. Les résultats montrent que l'acide lactique produit par ce couple *L. delbrueckii* / son de blé est constitué d'environ 90% de D-acide lactique et 10% de L-acide lactique. Il a été difficile de reproduire un mélange identique (comme celui effectué pour simuler l'acide lactique issu de la fermentation avec le couple *L. casei* / son de blé) avec les solutions commerciales. Les études ont donc été menées avec un mélange commercial racémique de L/D acide lactique. Pour cela, la solution L/D acide lactique (SIGMA) a été évaluée de manière à connaître exactement les proportions des racémiques. Les résultats sont les suivants : 52% L- acide lactique et 48% D- acide lactique. Puis, suivant le même mode opératoire que précédemment décrit au début du chapitre pour la polymérisation de l'acide lactique obtenu avec le couple *L. casei* / son de blé, le mélange L/D acide lactique a été polymérisé en 3 étapes : polycondensation en masse pour obtenir les oligomères, cyclisation pour obtenir le lactide et enfin polymérisation par ouverture de cycle pour obtenir le PLA.

<u>Résultats et discussions :</u>

Le matériel et les méthodes mises en œuvre dans cette partie sont identiques à celle citées dans la publication ci-dessus.

- Formation du lactide issu d'un mélange racémique d'acide lactique

Une polycondensation en masse sans catalyseur a été conduite en premier lieu avec 50g de L/D acide lactique ($LA_{L/D}$). Grâce à cette étape, des oligomères ont été produit avec un rendement d'environ 85-90%. La conversion des monomères a été calculée grâce à la comparaison des intégrales des pics des protons du groupe méthylène (4,3 ppm) et des protons du groupe carbonyle dans les oligomères (5,2 ppm) et est d'environ 95% (Figure 2).

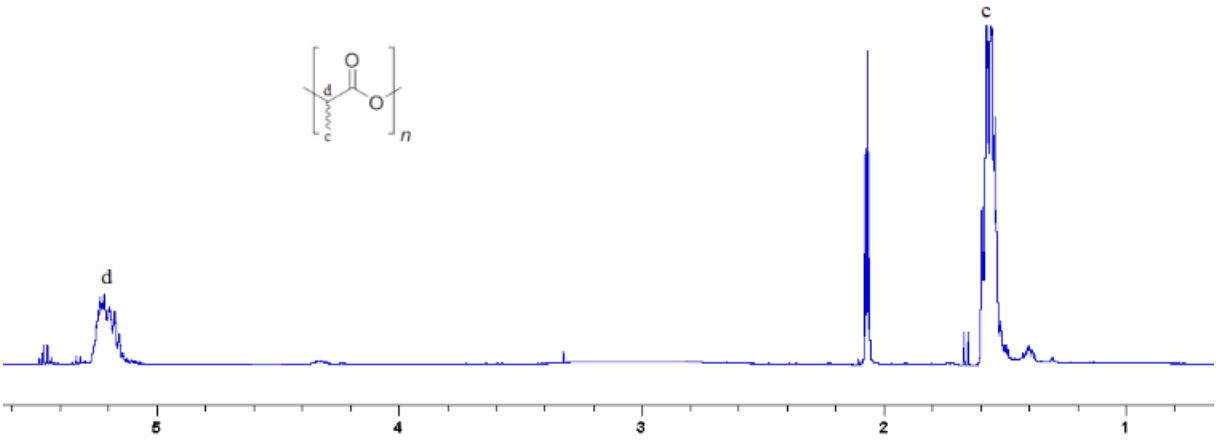


Figure 2 : RMN des oligomères issus de $LA_{L/D}$

Dans un second temps, les oligomères subissent une dépolymérisation en masse avec l'octanoate d'étain comme catalyseur (0.2 % en masse par rapport aux oligomères) pour former le lactide. La manipulation débute avec 10g d'oligomères. La conversion des oligomères est vérifiée par RMN en utilisant la même méthode que décrit précédemment sauf que le groupe méthyl est comparé au groupe carbonyle du lactide (5,4 ppm). La conversion des oligomères est d'environ de 85% (Figure 3). Le lactide produit n'a pas été purifié. Toutefois, malgré l'absence de purification, les analyses RMN ont montré que le lactide produit était relativement pur. Le lactide produit est ensuite séché sous vide afin de s'assurer du bon contrôle de la qualité et de la longueur des chaines du PLA.

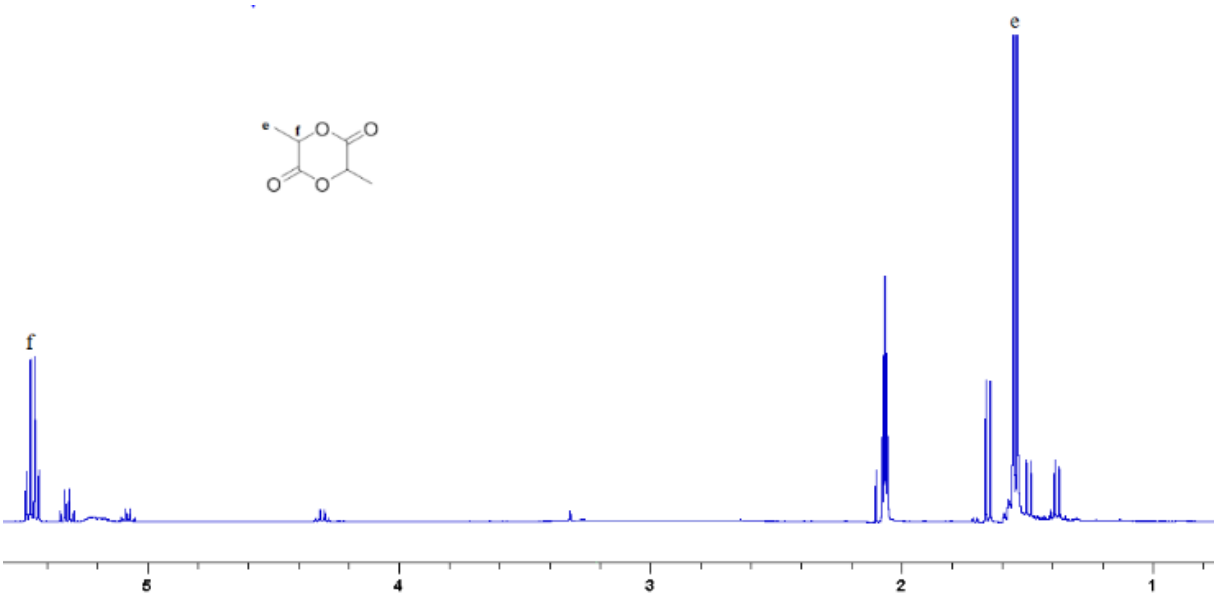


Figure 3 : RMN du lactide issu des oligomères de $LA_{L/D}$

- Formation du PLA par polymérisation par ouverture de cycle

La ROP a été effectuée en masse avec l'octanoate d'étain comme catalyseur (2.5 % en masse par rapport au lactide). Les résultats issus des analyses RMN montrent que la conversion du lactide en PLA est d'environ 95% (Figure 4). De plus, le degré de polymérisation a été estimé grâce au rapport des signaux intégrés à 5,2 ppm correspondant aux groupes CH de la chaîne principale de PLA sur les signaux intégrés à 4,3 ppm correspondant à l'extrémité de la chaîne. Ces calculs ont conduit à une valeur Mn d'environ 3100 g/mol. Les analyses effectuées par chromatographie d'exclusion stérique ont confirmé cette valeur indiquant un Mn est de 2200 g/mol, un Mw de 10000 g/mol et une polydispersité de 4.55. Ainsi, le PLA obtenu ne présente pas de grandes longueurs de chaîne et appartient plutôt à la catégorie des oligomères. Toutefois, il est intéressant de souligner que les conditions de la réaction ROP n'ont pas été optimisées.

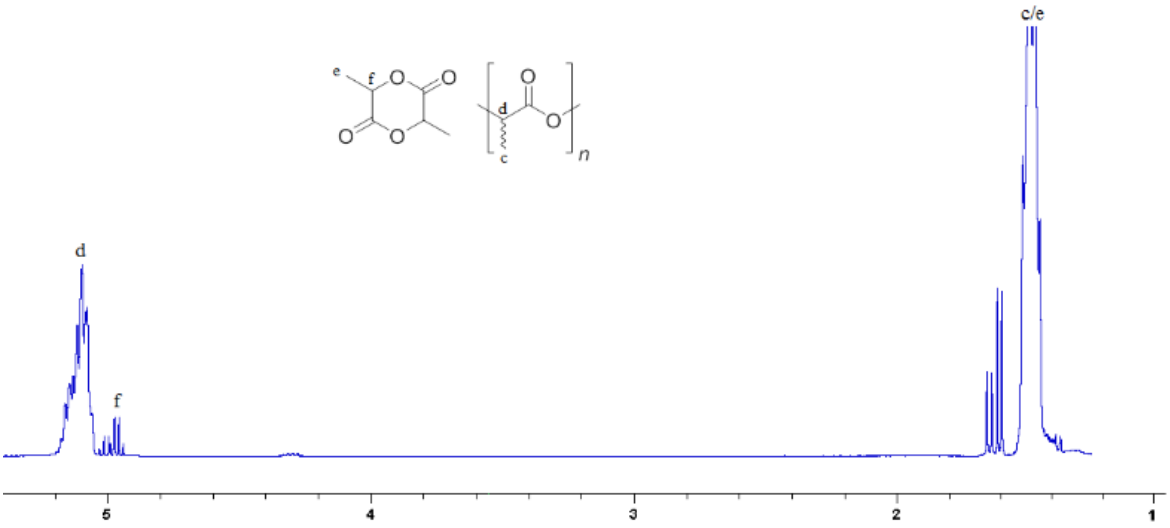


Figure 4 : RMN du PLA issu de $LA_{L/D}$

Les résultats obtenus dans les mêmes conditions que la polymérisation de l'acide lactique issu de la fermentation en milieu liquide du couple *L. casei* / son de blé sont moins encourageants. En effet, le PLA issu de ce précédent couple possède les caractéristiques suivantes : Mn : 6000 g/mol, Mw : 14700 g/mol et un indice de polydispersité de 2.9. Le polymère issu de l'acide lactique racémique présente des chaînes beaucoup moins longues et s'apparente davantage à un oligomère.

IV. Conclusion générale

Ce projet de thèse avait pour objectif de développer un procédé complet de la valorisation de la biomasse lignocellulosique jusqu'à l'obtention d'un polymère biosourcé : le PLA.

Dans un premier temps, des biomasses lignocellusiques (le son de blé, les rafles de maïs et la bagasse de canne à sucre) ont été choisies et des microorganismes producteurs d'acide lactique (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* et *Rhizopus oryzae*) ont été sélectionnés. Afin d'augmenter l'accessibilité aux sucres fermentescibles de la biomasse lignocellulosique, deux prétraitements ont été utilisés : l'hydrolyse à l'acide dilué et l'hydrolyse enzymatique. Suite à ce choix de prétraitement, quatre stratégies de fermentation ont été mises en place. S1 et S3 correspondent respectivement à des FML sur l'hydrolysat acide et l'hydrolysat enzymatique. S2 correspond à une FMS sur la biomasse lignocellulosique issue du prétraitement à l'acide dilué. Enfin S4 correspond à une fermentation et une saccharification simultanées sur la biomasse lignocellulosique également issue du prétraitement à l'acide dilué. La dernière stratégie a été réalisée avec un cocktail enzymatique produit grâce au couple *Aspergillus tubingensis* / son de blé. Ces quatre stratégies ont été accomplies à petite échelle sans aucun ajout de sucres ni de nutriments. En effet, les différents milieux liquides et solides obtenus suite aux différents prétraitements ont été utilisés en substitution des milieux de culture riches généralement employés pour le développement et la production d'acide lactique des différents microorganismes. Le pH des différents milieux de fermentation a néanmoins été adapté aux conditions optimales de croissance des microorganismes : 5.5 pour les bactéries lactiques (*L. casei* et *L. delbrueckii*) et 6.5 pour le champignon filamenteux (*Rhizopus oryzae*). Durant cette étude, un criblage microorganisme / biomasse lignocellulosique a été réalisé avec chacune des stratégies mise en place. Les résultats obtenus ont permis d'identifier le son de blé comme la biomasse lignocellulosique la plus adaptée à la production d'acide lactique. Les bactéries lactiques ont également montré de façon générale une plus grande aptitude à la croissance et à la production d'acide lactique. L'examen des données montre que S3 présente les meilleurs résultats en termes de quantité d'acide lactique produit par rapport à la consommation de biomasse lignocellulosique soit 72mg/g de son de blé (environ sept fois plus que toutes les autres stratégies). Néanmoins comparativement à S3, S1 présente la meilleure conversion du

glucose en acide lactique, soit 73%, 52%, 77% versus 63%, 21%, 6% pour *L. casei*, *L. delbrueckii* et *R. oryzae* respectivement.

Suite à cette première étude, une stratégie a été sélectionnée pour un « scale-up », avec les couples LABs / son de blé, afin d'augmenter la quantité d'acide lactique produit et continuer le développement du procédé par la purification et l'extraction de l'acide lactique du milieu de fermentation ainsi que sa polymérisation en PLA. En raison d'un meilleur rendement en conversion des sucres et de sa facilité de mise en œuvre la stratégie S1 a été choisie. Cette dernière a été optimisée afin d'augmenter le rendement de conversion en acide lactique par rapport à la quantité de biomasse utilisée tout en préservant son rendement de conversion du glucose. Pour cela, l'hydrolysat acide a été dilué au quart avec de l'eau ultra-pure et supplémenté en glucose afin d'atteindre la concentration de 100g/L. La fermentation a été menée au sein d'un bioréacteur BIOSTAT®B (B.Braun Biotech International) d'une capacité utile de 1.6L permettant le suivie des paramètres de fermentation en continu. L'optimisation a permis d'obtenir des concentrations en acide lactique de 63.5g/l et de 35g/l avec des rendements de conversion du glucose correspondant de 60% et 33% pour *L. casei* et *L. delbrueckii* respectivement. L'optimisation de cette étape a été réalisée avec succès. En effet, la production d'acide lactique par rapport à la consommation de son de blé a atteint 0.9g/g et 0.5g/g versus 9mg/g et 7mg/g (S1 à petite échelle avant optimisation) pour *L. casei* et *L. delbrueckii* respectivement.

Dans le but de pouvoir polymériser l'acide lactique en PLA, l'extraction et la purification de l'acide lactique contenu dans le milieu de fermentation a été réalisé grâce à une ultrafiltration du milieu suivie par une méthode de chromatographie par échange d'ions. Pour cela deux colonnes échangeuses d'ions ont été choisies. Une colonne échangeuse de cations (acide forte) : S-Sépharose Fast-Flow (Pharmacia) et une colonne échangeuse d'anions (basique faible) : DEAE-Sepharose Fast-Flow (Pharmacia). Une solution aqueuse contenant l'acide lactique pur a été récupérée à la fin de cette purification. L'acide lactique a ensuite été isolé sous la forme d'une huile jaune clair par évaporation de l'eau grâce au rotavapor. L'acide lactique issu du couple *L. casei* / son de blé a été obtenu avec un rendement de purification de 40.7% tandis que l'acide lactique issu du couple *L. delbrueckii* / son de blé a été obtenu avec un rendement de 34%. Cette étape s'est avérée limitante pour le procédé à cette échelle (un grand nombre de répétitions des manipulations a été nécessaire).

La dernière étape du procédé a consisté à polymériser l'acide lactique purifié. L'acide lactique issu de la fermentation *L. casei* / son de blé possède en moyenne 93.5% de L- acide lactique et 6.5% de D- acide lactique, tandis que l'acide lactique issu de la fermentation *L. delbrueckii* / son de blé possède en moyenne 11% de L-acide lactique et 89% de D-acide lactique. La polymérisation de l'acide lactique issus de *L. casei* / son de blé a été privilégiée pour deux raisons : une quantité d'acide lactique disponible plus importante et une reproduction du mélange d'isomère plus facile à atteindre avec les solutions commerciales d'acide lactique. La polymérisation en masse a été effectuée en trois étapes (oligomères, lactide, PLA) et en utilisant de faible quantité de catalyseur (octanoate d'étain) afin d'atteindre un polymère possédant un haut poids moléculaire tout en minimisant l'utilisation de produit chimique. La quantité d'acide lactique purifié issue du couple *L. casei* / son de blé a permis de réaliser les deux premières étapes de la polymérisation validant ainsi la cohérence entre l'acide lactique produit et celui reconstitué avec les produits commerciaux. Le PLA obtenu présente les caractéristiques suivantes : Mn : 6000 g/mol, Mw : 14700 g/mol et un indice de polydispersité de 2.9.

Ce projet a donc mis en évidence la faisabilité d'un procédé de production d'un polymère biosourcé, le PLA, en utilisant la biomasse lignocellulosique. Afin d'optimiser cette valorisation, plusieurs perspectives d'amélioration pourraient être discutées. Les deux premières sont directement liées au procédé de production d'acide lactique et concerne le prétraitement de la biomasse lignocellulosique et la purification de l'acide lactique. En effet un prétraitement plus efficace de la biomasse lignocellulosique pourrait augmenter la quantité de sucres fermentescibles libérée lors de la déstructuration de la paroi végétale et ainsi éviter l'ajout de glucose lors l'optimisation du procédé. Depuis quelques années, l'amélioration des prétraitements de la biomasse lignocellulosique est devenue un sujet de recherches très documenté en raison de la nécessité de son utilisation pour l'élaboration de produits finis durables respectant l'environnement. La purification de l'acide lactique fermenté pourrait également être améliorée en passant à un « scale-up » du procédé afin de réduire le nombre de manipulations. Afin d'augmenter la valorisation de la biomasse lignocellulosique, une dernière perspective peut également être mise en lumière grâce aux différents résultats obtenus lors des chapitres 2 et 3. En effet, la stratégie choisie pour ce projet repose sur l'utilisation de l'hydrolysat obtenu suite au prétraitement à l'acide dilué, laissant la biomasse prétraitée disponible pour une autre utilisation. Il serait donc possible d'envisager, deux productions d'acide lactique simultanées basées sur deux stratégies différentes sur une même

quantité de biomasse. Pour cela, la stratégie S3 (FML sur hydrolysat enzymatique) qui présentait de bons résultats lors de l'étude menée dans le chapitre 1 pourrait être optimisée afin de cumuler sa production d'acide lactique avec celle obtenue avec S1 (Figure5).

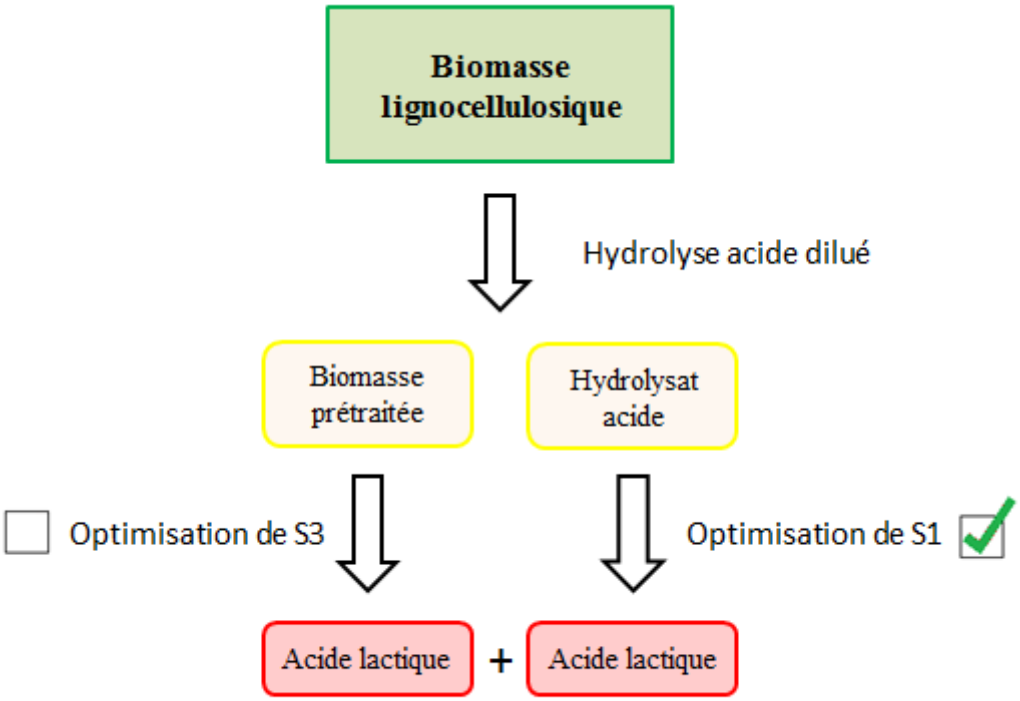


Figure 5 : Association des deux stratégies S1 et S3 en vue d'augmenter les rendements de valorisation de la biomasse lignocellulosique. S1 : FML sur hydrolysat acide ; S3 : FML sur hydrolysat enzymatique.

Communications :

- Poster : « Une approche transversale: synthèse de poly(acide lactique) à partir de déchets végétaux », conférence du 23/24 mai 2012 intitulée « Les Bioplastiques : Polymères biosourcés et/ou biodégradables » au Palais Universitaire de Strasbourg, Strasbourg.

Publications scientifiques:

- « From lignocellulosic biomass to biodegradable polymers: production of polylactic acid by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii* from wheat bran hydrolysate » Flavie Prévot, Eric Pollet, Luc Avérous, Vincent Phalip. Article soumis dans le journal "Industrial Crops and Products".

- « Bioproduction of organic acids building blocks from lignocellulosic ressources – Towards biobased polymers »

- « Screening of biomass, microorganisms and fermentation processes in biomass valorization through lactic acid production »
  Flavie Prévot, Anne Forster, Eric Pollet, Luc Avérous, Vincent Phalip

Missions d'enseignements :

- Monitrice de travaux pratiques en optique, 1ème année IUT, IUT Louis Pasteur, Schiltigheim, France, 2011-2014 (132h).

- Monitrice de travaux pratiques en thermodynamique, 1ère année IUT, IUT Louis Pasteur, Schiltigheim, France, 2011 (60h).

Flavie Prévot

Valorisation de déchets végétaux pour la bioproduction de poly(acide lactique)

Résumé

Cette thèse s'articule autour de la valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production d'un polymère biosourcé, le poly(acide lactique) PLA. Lors d'une première étude, deux prétraitements de la biomasse lignocellulosique ont été réalisés pour libérer les sucres fermentescibles. Puis plusieurs stratégies de fermentations ont été mises en place et un criblage microorganisme / biomasse a été réalisé en vue de sélectionner la meilleure stratégie de fermentation et le meilleur couple biomasse / microorganisme pour la production d'acide lactique. Les bactéries lactiques, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus delbrueckii* et le son de blé ont été retenus pour produire l'acide lactique lors d'une fermentation en milieu liquide sur l'hydrolysat produit par une hydrolyse à l'acide dilué du son de blé. Lors d'une seconde étude, la stratégie choisie a été optimisée et a subi un « scale-up » afin d'augmenter la concentration en acide lactique. Les fermentations en milieu liquide ont été effectuées au sein d'un bioréacteur afin de contrôler les paramètres de croissance bactérienne et de production d'acide lactique (pH, pO_2, agitation, production d'acide lactique). Puis une purification de l'acide lactique a été menée par chromatographie échangeuse d'ions. Cette technique a été réalisée en deux étapes clés utilisant successivement une colonne cationique forte et une colonne anionique faible. L'acide lactique purifié a été polymérisé par ouverture de cycle (ROP). Durant toutes ces recherches, la chimie verte a été mise au premier plan d'une part par le sujet de l'étude (valorisation de la biomasse végétale) mais aussi d'autre part par le choix des méthodes employées (pas de solvants, peu de produits chimiques, méthodes propres, économiques et renouvelables).

Mots clés : prétraitement, fermentation, microorganisme, biomasse lignocellulosique, acide lactique, purification, polymerisation, PLA.

Summary

This thesis is articulated around the lignocellulosic biomass valorization to develop a fully sustainable, green and cheap route of PLA production. During a first study, two pretreatments have been realized on the lignocellulosic biomass in order to release the fermentable sugars. Several fermentations strategies have been considered and a screening of the couples microorganisms / biomasses has been performed in order to select the best strategy and the best couple microorganism / biomass for lactic acid production. The lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus delbrueckii* and wheat bran have been selected to produce lactic acid via a liquid state fermentation on the acid hydrolysate obtained thanks to a diluted acid pretreatment on the wheat bran. During a second study, the chosen strategy has been optimized and scaled-up in order to increase the lactic acid concentration. Liquid state fermentations have been made in a bioreactor in order to control parameter needed for the optimal growth and consequently the optimal lactic acid production (pH, pO_2, agitation, acid lactic production). Then, the lactic acid purification has been performed by ion exchange chromatography. This technic was made in two key steps using a strong cationic column and a weak anionic column successively. Finally, the purified lactic acid was then polymerized by ring opening polymerization (ROP). During all the researches, the green chemistry has been placed in the first plan in one hand by the choice of the topic of the study (biomass valorization) and in a second hand by the choice of each employed method (no solvent; few chemical products; sustainable, cheap and green methods).

Keys words: pretreatment, fermentation, microorganisms, lignocellulosic biomass, lactic acid, purification, polymerization, PLA.