

Rapport de synthèse de la phase P1 du projet MaisMisVal.

Ce projet vise à améliorer la valorisation de la biomasse de paille de miscanthus et de paille de maïs en générant de nouveaux bioproduits à plus forte valeur ajoutée. Cinq partenaires étaient impliqués, dans le but de (1) caractériser la paille de maïs et de miscanthus, (2) extraire la lignine et produire un jus sucré, (3) adapter des souches de *Bacillus* et de *Y. lipolytica* dans le but de produire des lipopeptides et des laccases, (4) étudier la valorisation de la laccase pour améliorer le pouvoir méthanogène de biomasses et (5) faire une étude de de plausibilité de la filière.

GreenTech avait pour but la mise au point de caractériser la composition des pailles de maïs et de miscanthus et d'établir une technique d'extraction de la lignine et d'obtenir un jus sucré disponible pour les partenaires 1 (TERRA) et 2 (MiPI). L'extraction de la lignine a été un succès mais le jus sucré produit était trop faible en glucose et xylose pour la croissance des souches de *Y. lipolytica* et *Bacillus spp.* La lignine extraite sera, ultérieurement, utilisée comme agent chélatant pour le traitement des effluents de l'industrie sidérurgique. Les résultats des analyses montrent que ces matières contiennent essentiellement les fractions classiquement retrouvées dans les matières lignocellulosiques (à savoir la cellulose, et l'hémicellulose qui sont des polymères de sucres, et la lignine, un polymère de molécules aromatiques) avec des pourcentages cumulatifs de polysaccharides allant de 35 à 45% en masse de la matière sèche. Par la suite, une corrélation entre la structure de la lignine et ses perspectives d'applications dans le traitement des eaux a été réalisée. Et une matrice d'extraction a été mise au point, avec quatre type de traitement d'extraction distincts (voie basique, solvant éthanol/eau/acide sulfurique, voie acide ou encore par solvant eutectique). les premières analyses montrent que les lignines se comportent différemment en fonction des métaux. Le plomb et le cuivre semblent plus efficacement chélatés avec les lignines isolées que l'arsenic ou le nickel. Il apparait aussi que les lignines obtenues après extraction à l'éthanol soient celles capables de chélater les plus grandes concentrations en métaux divalents.

Le partenaire TERRA avait pour but l'adaptation de souches de *Bacillus* au jus sucré et la production de lipopeptides. Les premières modifications génétiques ont finalement été réalisées pour une adaptation sur la paille brute, car le jus sucré est trop faiblement concentré en sucre. Le second objectif était la montée en échelle de la production de lipopeptides.

Durant la phase P1, les enzymes responsables de la dégradation de l'hémicellulose (polysaccharides de la paille, composés majoritairement de xylose) ont été ciblées pour être sur-exprimées. Les analyses montrent que ces modifications n'ont pas permis une bonne dégradation de la paille. Concernant la dégradation de la cellulose (autre polysaccharides de la paille, composé majoritairement de glucose), les souches de *B. subtilis* et *B. velezensis* GA1 ne possèdent pas dans le génome toutes les enzymes permettant cette dégradation.

Par conséquent, une seconde stratégie, de bioconversion, a été commencée durant la phase P1 et sera terminée pendant la phase P2. Cette stratégie consiste à sur-exprimer des gènes de *Clostridium thermocellum* chez *Bacillus*. *Clostridium thermocellum* est une bactérie connue pour dégrader efficacement l'hémicellulose et la cellulose. L'approche consiste en (a) la production d'enzymes de *Clostridium* chez *Bacillus* dans du milieu LB, (b) l'hydrolyse de la paille par ces enzymes et (c) production de lipopeptides par une souche de *Bacillus*.

Une première montée en échelle a été réalisée dans un fermenter de 2L. 100 mg/L de surfactine ont ainsi été produits.

Pour le partenaire MiPI, le but était la construction de souches productrices de laccases ainsi que l'identification des gènes chez *Y. lipolytica* impliqués dans la dégradation du xylose.

La première étape consistait en la construction de souches recombinantes de *Y. lipolytica* productrices de laccases de manière hétérologue. Deux laccases, à savoir Lac2 et ITMO2 produites par le champignon *Scedosporium apiospermum* ont été choisies et produites chez *Y. lipolytica*. L'activité maximale de

l'enzyme Lac2 est égale à 25 UI/L après 24h tandis que l'activité maximale de l'enzyme ITMO2 atteint 1125 UI/L après 48h.

Les propriétés catalytiques de ces deux enzymes ont été étudiées et montrent des différences, notamment une activité optimale à des pH différents, ce qui permettra le développement de diverses applications.

La seconde étape consistait à créer une souche *Y. lipolytica* capable de dégrader le xylose. Cette dégradation du xylose nécessite l'action consécutive de trois enzymes différents, à savoir une xylose réductase, une xylitol dehydrogenase et une xylulokinase. Celle-ci ne sont pas produites naturellement par *Y. lipolytica*. Les gènes codant pour ces trois enzymes ont été clonés et surexprimés dans *Y. lipolytica*. Des mutants de *Y. lipolytica* assimilant le xylose comme source seule de carbone dans le milieu de culture reconstitué ont été obtenus. Finalement, des mutants de *Y. lipolytica*, capables de produire deux types de laccases (Lac2 et ITMO2) en utilisant le xylose comme source de carbone, ont été obtenus.

Le partenaire ULB devait étudier la valorisation de la laccase pour améliorer le pouvoir méthanogène de biomasses. Les premières observations montrent une grande augmentation du méthane récupéré sur la paille de miscanthus comparé à la paille de maïs qui est attribuée à une plus grande teneur en lignine dans la paille de miscanthus.

A ce stade des expériences, il semble que l'ajout de laccase devrait préférentiellement cibler des substrats riches en lignine.

Une estimation du coût de valorisation pour la laccase montre un coût de l'enzyme de 0,02 €/kUA. Le procédé doit encore être amélioré, et différentes pistes sont envisagées ; comme la réutilisation des enzymes sur plusieurs cycles, l'utilisation d'enzymes plus performantes et la réduction du coût de production.

Concernant la valorisation de laccases pour éliminer les aflatoxines M1 du lait, les résultats montrent que les laccases peuvent dégrader les aflatoxines mais cela nécessite une longue incubation en présence des enzymes. Plus de 50h sont nécessaires pour passer sous la limite légale de 0,05 µg/mL. Différentes pistes d'optimisation de la cinétique ont été testées et la piste la plus prometteuse est l'ajout d'un agent accélérant (ex : la vanilline) dans le milieu.

De son côté le partenaire ValBiom devait réaliser une étude de plausibilité de la filière. L'étude s'articule, principalement, sur l'évaluation de la disponibilité de la paille de maïs et miscanthus ainsi que, les modalités et dépenses plausibles liées à la production, à l'obtention et au conditionnement de ces matières premières. Ces hypothèses de calculs retenues pour l'évaluation du prix d'achat des matières premières font ressortir un intérêt économique net en faveur de l'achat de canne de maïs plutôt que le miscanthus.

ValBiom a aussi évalué la possibilité de biométhaniser le sous-produit issu du procédé MisMisVal.

Si les résultats de ce projet démontrent, dans la suite, un intérêt économique réel à extraire de la lignine à partir de miscanthus et/ou de résidus de maïs grain plutôt que de bois (filiale pâte à papier par exemple) et si la production de bioproduits secondaires à haute valeur ajoutée conforte cet intérêt, le déploiement du procédé MaisMisVal à l'échelle industrielle semble plausible techniquement et économiquement.