

Organisme d'accueil :

IRD, Institut de Recherche pour le Développement
Calle Anatole France n°17
Colonia Chapultepec,
Delegacion Polanco
11560 Mexico D.F MEXIQUE

Lieu de stage :

UAM-Iztapalapa
Departamento de Biotecnología
Avenida San Rafael Atlixco n°186
Colonia Vicentina, Delegacion Iztapalapa
09340 Mexico D.F MEXIQUE

Sébastien Fragoso

Formation ingénieur AgroSup Dijon, spécialité AgroAlimentaire, Formation Initiale

LA JACINTHE D'EAU, UNE RESSOURCE LIGNOCELLULOSIQUE POUR LA PRODUCTION D'ENZYMES SACCHARIFIANTES

Mots clés : Jacinthe d'eau, Fermentation milieu solide, production d'enzymes hydrolytiques, fermentation en batch

Rapport de stage de recherche 2 AA, effectué du 30 Mai au 14 Octobre 2011



Maîtres de stage :

Dr E. Favela Torres ; Dr I. Gaime ; Dr J. Gerardo Saucedo Castañeda ; Dr L. Tovar

Enseignant - tuteur :

R. Cachon

REMERCIEMENTS

Isabelle Gaimé, qui aura été une maître de stage à l'écoute, disponible et impliquée, ainsi qu'une amie. Merci pour tout.

Ernesto Favela, pour avoir été un maître de stage indispensable et humain – et pour l'argot mexicain qu'il m'aura aussi enseigné.

Luz Tovar, pour son incroyable douceur et pour la patience dont elle a fait preuve en m'enseignant ses techniques, même lorsque je n'étais encore qu'un idiot à l'espagnol balbutiant.

Gerardo Saucedo, Sevastianos Roussos, Renaud Fichez, et l'Institut de Recherche pour le Développement, pour m'avoir permis d'intégrer ce projet et cette formidable équipe.

Plus généralement, tous les gens que j'ai été amené à rencontrer, et qui ont contribué à faire de ce stage une expérience inoubliable – citons en particulier la famille Bojorquez, qui m'a énormément aidé à m'intégrer dans ce pays, les habitants de la Casa del Indio, et...

...toute l'équipe de la PP4, bien évidemment.

Qué chido !

SOMMAIRE

Avant-propos	2
Résumé-Summary	4
1. Introduction	5
2. Matériel et méthodes	7
2.1. Préparation de la jacinthe d'eau	7
2.2. Fermentation en colonnes	8
2.3. Mesure de l'activité cellulase et hémicellulase	8
2.4. Fermentation en batch de la jacinthe d'eau	9
2.5. Stabilité de l'enzyme	9
3. Résultats	9
3.1. Courbes de croissance de PBLA	9
3.2. Activités cellulase et hémicellulase mesurées	10
3.3. Fermentation en batch de la jacinthe d'eau	10
3.4. Stabilité des enzymes produites	12
4. Conclusion et Discussion	13
5. Références	14

AVANT-PROPOS

Il est difficile de résumer l'expérience que procure ces six mois de stage effectués à l'étranger en se limitant uniquement à un bilan des résultats scientifiques obtenus, car ce serait omettre de nombreux aspects de la chose. Ce serait en particulier passer sous silence certains points de la réflexion scientifique, faire abstraction du cadre de travail, des gens rencontrés, et plus généralement de tout ce qui concerne l'aspect humain, qui à mon sens est le plus grand enseignement que l'on puisse tirer d'un tel travail.

1. La démarche de recherche

Il me paraît nécessaire, pour bien comprendre l'origine des résultats présentés, de proposer dans un premier temps une brève chronologie résumant l'organisation de mon travail au cours de ces vingt semaines.

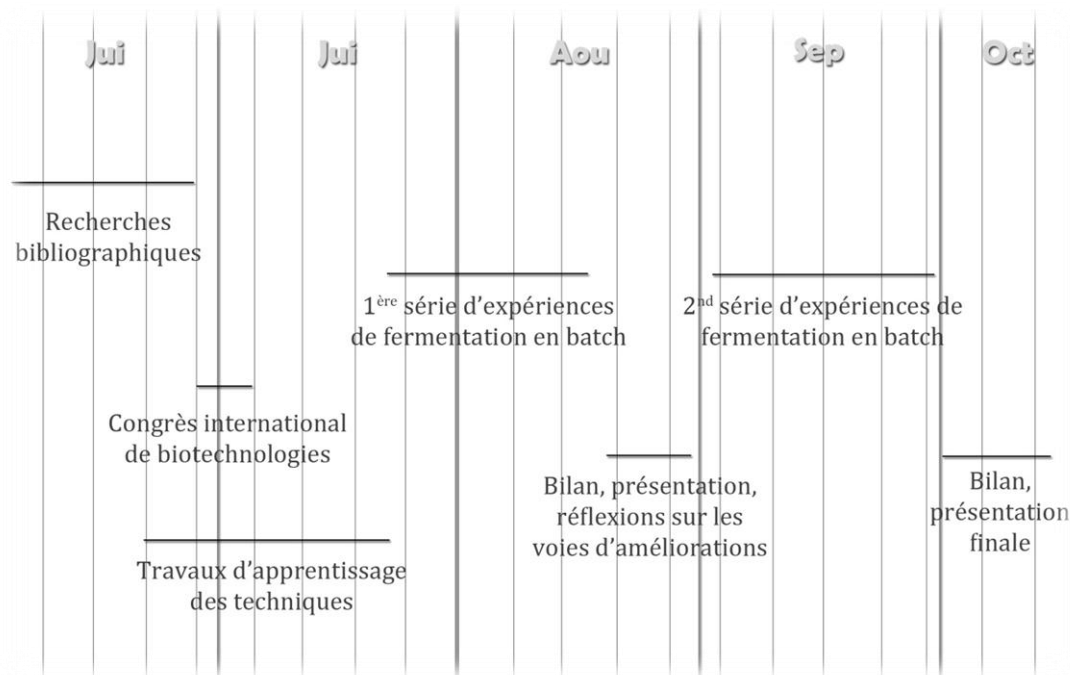


Fig. 0. – Organisation du travail de recherche au cours des vingt semaines de stage

Le projet Foncicyt Liriasa est déjà sur les rails depuis plus de deux ans lorsque j'arrive au sein de l'équipe, au mois de juin 2011. Au cours de la phase de recherche bibliographique, une publication (Liming et Peilin, 1998., présentée plus loin) attire particulièrement mon attention. Un protocole de fermentation en batch des résidus lignocellulosiques y est proposé, une idée qui me surprend et aiguise ma curiosité. Avec l'accord et le soutien de mes encadrants, je décide alors d'orienter mes travaux vers l'élaboration d'un protocole de fermentation en batch de la jacinthe d'eau.

Entre juillet et août, je propose un premier protocole, en utilisant comme substrat un mélange de feuilles et de tiges de jacinthe d'eau. Je n'obtiens malheureusement pas les résultats escomptés, aucune activité enzymatique n'étant détectée après la seconde fermentation. Je passe alors plusieurs jours à chercher ce qui aurait pu poser problème, et à modifier le protocole en conséquence (en particulier, l'utilisation d'un tampon phosphate entre chaque fermentation, le pH ayant augmenté démesurément). Des recherches réalisées parallèlement semblent de plus indiquer que l'utilisation comme substrat de feuilles de jacinthe d'eau seules permet l'obtention de suspensions de meilleures activités enzymatique.

Je réalise alors une seconde série d'expériences. Ce sont ces résultats qui seront présentés dans la suite du rapport.

2. La Planta Piloto 4

Lorsque j'ai débarqué à la Planta Piloto 4, plus affectueusement appelée 'la PP4', c'était avec un espagnol plus qu'approximatif sur les lèvres, mais aussi une certaine anxiété, à l'idée d'évoluer dans un univers que je pensais régi par la loi de la publication à tout prix. Mais ce n'était pas là l'idée de la PP4.

Il n'y a pas de véritable hiérarchie dans la PP4, mais plutôt un esprit de communauté, de grande famille. Les chercheurs sont mis sur un strict plan d'égalité, et les étudiants, considérés comme le cœur de la PP4, étonnamment respectés. Les encadrants ont pour objectif de nous aider, de nous former pour avancer dans nos projets professionnels respectifs. J'avais à l'idée que je serai en quelque sorte à leur service pour leur permettre de publier rapidement, et j'étais bien loin de la réalité ; il était important pour moi de souligner ici ce point et de remercier une nouvelle fois l'ensemble de l'équipe de la PP4.

De plus, soulignons que mes maîtres de stage m'ont laissé carte blanche dans le choix de mes expériences, et de mon sujet d'étude. C'est sans doute chose rare dans le stage de recherche, et que cela n'aurait peut-être pas été possible dans n'importe quel laboratoire.

Il y a encore une multitude de choses que j'aurai aimé dire : parler du congrès international de biotechnologies, à Queretaro, auquel j'eus la chance d'assister ; du Mexique, et surtout de ses gens ; du fait de travailler dans une université en milieu, disons, socialement moins favorisé que d'autres quartiers de la capitale... Mais ce serait alors prendre le pas sur le véritable objectif d'un tel rapport.

Je m'arrête donc ici, et vous laisse découvrir les résultats de ces vingt semaines.

La jacinthe d'eau, une ressource lignocellulosique pour la production d'enzymes saccharifiantes

S. Fragoso, sous l'encadrement de E. Favela, I. Gaime, et L. Tovar
Rapport de stage de recherche, effectué du 30 Mai 2011 au 14 Octobre 2011

La jacinthe d'eau est une plante aquatique invasive posant de nombreux problèmes d'ordre sociaux, écologiques et sanitaires. Les travaux présentés ici ont pour objectif d'utiliser cette ressource lignocellulosique abondante pour produire des enzymes saccharifiantes, plus précisément des cellulases et hémicellulases, utilisées pour hydrolyser la plante en un mélange d'oligomères à haute valeur ajoutée et de sucres fermentescibles. La souche de *Trichoderma Reesei* utilisée, PBLA, permet d'obtenir un cocktail enzymatique à forte activité hémicellulase. Un protocole de fermentation en batch de la jacinthe d'eau a été développé, afin d'augmenter la production enzymatique pour une même quantité de matériel. Les enzymes de second batch présentent une plus forte activité cellulase que celles de première fermentation, mais une stabilité plus faible aux hautes températures. L'inverse s'observe quant à l'activité xylanase. La feuille peut-être fermentée au moins deux fois tout en conservant une activité enzymatique cellulase/hémicellulase satisfaisante.

Mots clés : jacinthe d'eau, fermentation en milieu solide, production d'enzymes hydrolytiques, fermentation en batch

The water hyacinth is an invasive aquatic plant causing a lot of social, environmental and health problems. The aim of this work is to use this lignocelulosic resource for the production of hydrolytic enzymes, more precisely cellulase and hemicellulase enzymes, able to hydrolyze the plant in a mixture of high valuable oligomer and fermentable sugars. High hemicellulase activity is detected using the strain of *Trichoderma Reesei* PBLA. A batch fermentation process of water hyacinth has been developed, in order to increase the enzymatic production for a same quantity of vegetal. Second batch enzymes show a higher cellulolitic activity than enzyme from the first one, but a lower stability at high temperatures. In the case of hemicellulolitic activity, the trend is opposite. The water hyacinth's leaves can be fermented twice and keep good enzymatic activities.

Keywords : water hyacinth, solid state fermentation, hydrolytic enzyme production, batch fermentation

1. Introduction

La jacinthe d'eau, *Eichhornia Crassipes*, est une plante aquatique de la famille des *Pontederiaceae*. Originaire du bassin amazonien, cette plante invasive flottante se répand à la surface des lacs, rivières et marais de nombreux pays, de l'Afrique à l'Asie en passant par le Mexique ou le sud de l'Europe (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2008). La beauté de sa fleur, qui emprunte des teintes allant du mauve au bleu clair, est le principal motif de son introduction par l'homme au XIX^{ème}, en tant que plante ornementale (Miranda et al, 1999).

Cette plante se reproduit selon deux modes, la reproduction sexuée, et la reproduction végétative, permettant la colonisation rapide de nouveaux milieux, notamment par les stolons dispersés par le courant et par la production de graines en grande quantité, environ 5000 par an, et à temps de dormance long, de 15 à 20 ans. La jacinthe d'eau présente un très fort taux de croissance, ainsi la surface couverte peut s'étendre sous de bonnes conditions de 60 cm/mois (Malik, 2007). Elle s'adapte à de fortes variations de pH, de température et de composition de l'eau, et seul le froid et la salinité sont des facteurs limitant sa

propagation.

La prolifération de cette espèce pose de nombreux problèmes écologiques, sociaux, et sanitaires. Le tapis dense qu'elle forme en surface des étendues d'eau diminue d'une part l'oxygénation du milieu et d'autre part la pénétration du rayonnement solaire, et donc la photosynthèse des micro-algues, producteurs primaires de la chaîne alimentaire. Elle perturbe ainsi l'écosystème aquatique et diminue les stocks de pêche. De plus, elle augmente les pertes d'eau par évapotranspiration, et rend difficile la circulation et l'activité humaine, bloquant les hélices des bateaux. Elle forme également un refuge pour les serpents, les sangsues, et les larves et moustiques vecteurs de la malaria, créant un milieu favorable au développement des maladies liées à l'eau. (Julien, 2008 ; Malik, 2007)

Les conséquences de cette invasion biologique sur l'écosystème aquatique et les activités humaines ne sont pas anodines. C'est la raison pour laquelle les premières initiatives adoptées visaient à l'élimination complète de la plante, par voie physique, chimique ou biologique. Mais ces méthodes ont rapidement éprouvées leurs limites : l'arrachage des plants, manuellement ou mécaniquement, est une méthode coûteuse

et peu efficace, compte tenue de la forte vitesse de croissance et d'expansion de la plante ; l'utilisation d'herbicides de synthèse est une solution contestable, car peu appropriée écologiquement parlant ; l'introduction de rares prédateurs naturels, tels les charançons, est difficilement applicable à tous les milieux concernés. (Julien, 2008)

Cependant, il existe une autre manière de considérer cette invasion biologique. Au lieu de penser la jacinthe d'eau comme un fléau à éradiquer, d'aucun y voit une ressource naturelle à exploiter. Cette plante est en effet déjà connue comme un vecteur de traitement des eaux usées ou contaminées, car elle présente une forte capacité d'assimilation des phosphates, nitrates et métaux lourds, donc une certaine propension à détoxifier un milieu donné. Elle peut ainsi jouer un rôle dans l'accès à l'eau potable. (Julien, 2007) Mais la jacinthe d'eau est une ressource abondante, et son intérêt dépasse ce simple aspect. Elle peut par exemple entrer dans la composition d'un compost naturel, donnant un engrais vert à meilleur rendement et plus accessible financièrement que ses équivalents chimiques. La fabrication de briquettes de matière organique séchée est une alternative à l'utilisation de bois comme combustible ; cette méthode

contribue notamment au Niger à lutter contre la désertification due à la déforestation. Les tiges de la jacinthe d'eau sont utilisées dans l'artisanat et l'art de la vannerie, notamment en Asie où elle permet la confection de meubles et où ses racines sont utilisées en tant que cordage. Au Kenya, les fibres de cellulose de la plante sont transformées en papier. Au Mexique, la société TEMA commercialise déjà des fibres absorbantes à partir de cette plante, utilisées dans le cas d'épanchements ou de fuites accidentelles de substances toxiques ou d'hydrocarbures en milieu aquatique.

D'autres voies de valorisation de la jacinthe d'eau sont en cours d'étude, notamment l'extraction de sucres à haute valeur ajoutée ou la production de bioéthanol. C'est dans ce cadre que s'effectuent les recherches du projet Fonciyct Liriasa. La stratégie du projet est résumé sur la Fig. 1.

L'objectif général est d'obtenir à partir de la jacinthe d'eau un mélange de sucres : des pentoses à haute valeur ajoutée, et des sucres fermentescibles, qui permettront la production de bioéthanol. Deux voies de dégradation du matériel lignocellulosique sont envisageables. La première est la voie chimique, qui consiste à faire réagir un acide dilué ou concentré dans des conditions

relativement sévères. Le coût élevé de cette technique, associé aux faibles rendements obtenus et à l'importante production de déchets de neutralisation, constituent autant de raisons de son abandon. La voie enzymatique semble être la plus prometteuse. Celle-ci consiste, après prétraitement du matériel, à faire agir un mélange enzymatique de lignases, cellulases, et hémicellulases. Cette méthode, moins contraignante sur le plan technologique, permet de meilleurs rendements de récupération des sucres (Ogier et al, 1999). Son principal inconvénient est lié à son coût, en particulier dû à celui des enzymes utilisées.

C'est précisément sur cette étape de production d'enzymes, et plus particulièrement de cellulases et hémicellulases, que se penchent les travaux présentés ici. Ces enzymes sont produites par fermentation en milieu solide (FMS) de la jacinthe d'eau, en utilisant comme souche productrice une souche de *Trichoderma Reesei* améliorée. Durant cette étape, la jacinthe d'eau n'est que partiellement dégradée. L'objectif principal de ce projet est de récupérer et réutiliser ces résidus de fermentation afin de produire de nouvelles enzymes. Un protocole de fermentation en batch de la jacinthe d'eau, inspiré des travaux de Liming et Peilin, est proposé ici, afin de répondre à cette problématique.

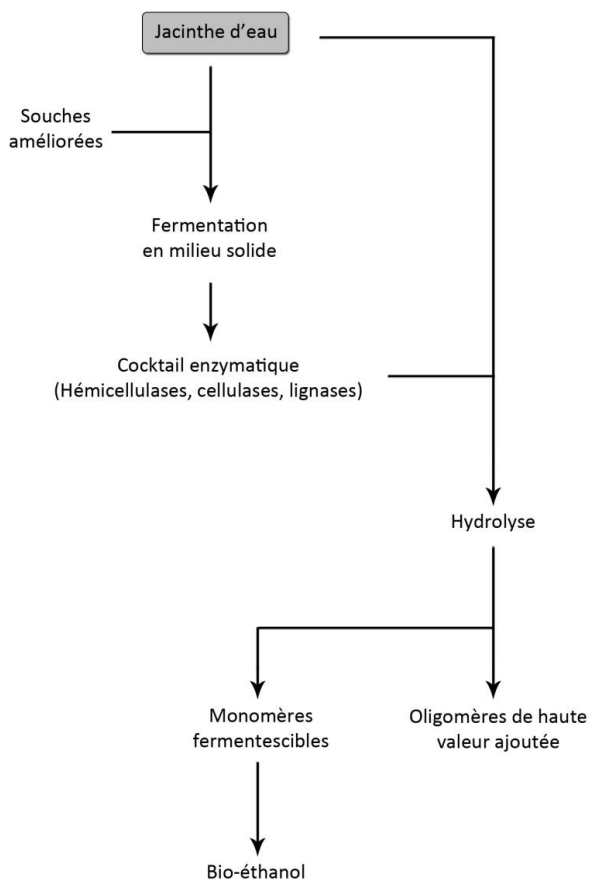


Fig. 1. - Stratégie du projet Fonciyct Liriasa

2. Matériel et méthodes

2.1. Préparation de la jacinthe d'eau

La jacinthe d'eau utilisée dans ces expériences provient des canaux de Xochimilco, au Sud de Mexico, à 2240 m d'altitude. Récoltée au printemps, la plante est lavée, séchée et broyée afin d'utiliser uniquement la fraction moyenne, de granulométrie comprise entre 0,80 et 1,68 mm. Le substrat de fermentation choisi ici est constitué de feuilles de jacinthe d'eau de 2 mois uniquement, substrat donnant les meilleurs résultats d'après des études

réalisées parallèlement. Ce matériel subi une hydrolyse acide par de l'acide sulfurique 0,25 M, puis est stérilisé 15 min à 120°C et 15 psi (1,034 bar).

La production de cellulases et d'hémicellulases est assurée par une souche de *Trichoderma Reesei* sélectionnée antérieurement, PBLA. Cultivée durant sept jours à 30°C sur PDA, les spores sont repris en suspension de Tween 80. La jacinthe d'eau est inoculée de façon à avoir initialement 2.10^7 spores/g de matière sèche. L'humidité avant fermentation, mesurée à la thermobalance, est ajusté à 75% environ par ajout de milieu Pontecorvo modifié, et le pH de 5,5.

2.2. Fermentation en colonne

Le matériel inoculé est mis en fermentation en colonnes. L'aération est maintenu constante, à 50 mL/min. La cinétique de fermentation est suivie par analyse de la concentration en CO₂ dans le flux d'air sortant, par utilisation d'un chromatographe ou d'un métabolimètre.

En fin de fermentation, le matériel est éventuellement séché par entraînement par air et gel de silice pour être traité ultérieurement.

2.3. Mesure de l'activité cellulase et hémicellulase

Deux grammes de matériel fermenté humide sont repris dans 18 mL d'eau distillé (ou dans le cas de matière sèche, 1 gramme dans 9 mL), puis centrifugé 10 min à 10000 rpm. La suspension enzymatique obtenue est immédiatement congelée, afin d'éviter la dégradation des enzymes par une éventuelle présence de protéases.

La mesure de l'activité enzymatique est réalisée en suivant la méthode de Miller (Miller, 1960), utilisant comme réactif l'acide 2-nitrosalicycique (DNS) et mesurant la concentration en sucres par lecture de l'absorbance à 640 nm.

Pour la mesure de l'activité hémicellulase, on utilise comme substrat une solution de xylane de bouleau à 0,5 %. La réaction suspension enzymatique-substrat se déroule à 40°C, durant 15 min. On réalise de plus un standard de xylose à 1g/L, et pour chaque échantillon un blanc, constitué du même volume de substrat et de suspension enzymatique, mais auquel l'ajout préalable de DNS empêche la réaction de dégradation du xylane.

Pour l'activité cellulase, le substrat utilisé est une solution de carboxyméthylcellulase

(CMC) à 0,2%. La réaction entre enzymes et substrat se déroule à 50°C durant 15 min. Le standard est une solution de glucose à 1g/L.

2.4. Fermentation en batch de la jacinthe d'eau

Afin d'augmenter le rendement de production d'enzymes, un protocole de fermentation de la jacinthe d'eau en batch a été proposé, en s'inspirant des travaux de Liming et Peilin, 1998. Pour ce faire, le matériel est fermenté une première fois. Le contenu est ensuite extrait et repris sous agitation douce durant 5 min dans 10 fois son volume de tampon phosphate 25%, afin d'extraire les enzymes du matériel et de maintenir le pH des résidus de jacinthe d'eau à 5,5 environ. L'ensemble est ensuite filtré sous vide. La suspension obtenue est immédiatement congelée. Du milieu Pontecorvo modifié 3x est additionné au résidu solide, puis le tout est séché sous flux d'air jusqu'à une humidité de 75% environ. La jacinthe d'eau est remise en fermentation, sans ajout ni d'inoculum ni de nouveau substrat. Ce protocole est répété pour 3 batch. La cinétique de croissance est suivie pour chacun et l'activité cellulase et hémicellulase mesurée.

2.5. Stabilité de l'enzyme

La suspension enzymatique est placée à

différentes températures : 30, 35, 40, 45 et 50°C. On suit l'évolution des activités cellulase et hémicellulase durant 4h, afin d'évaluer la stabilité de l'enzyme à la température.

3. Résultats

3.1. Courbes de croissance de PBLA

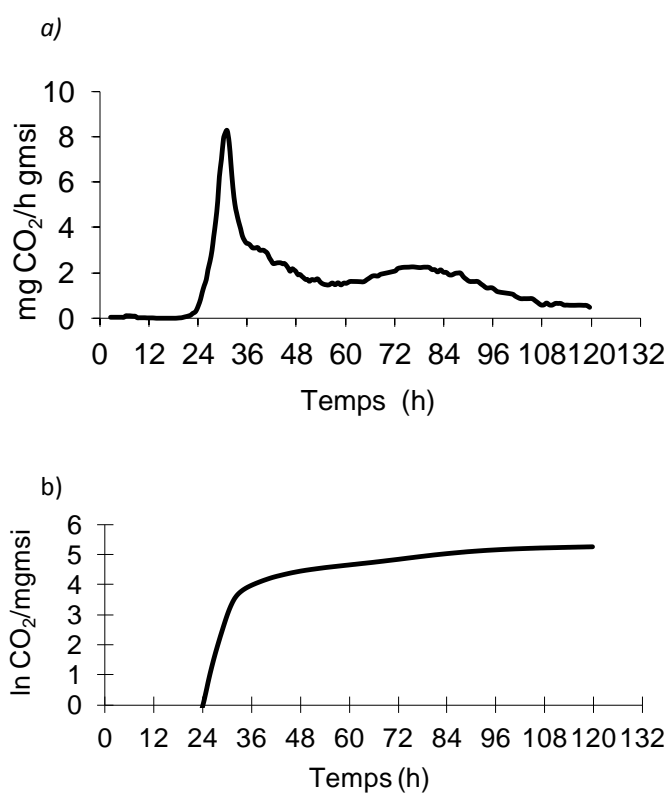


Fig. 2.a.- Taux de CO₂ produit au cours du temps par PBLA, sur feuille seule fermentée durant 121h

2.b.- Linéarisation du total de CO₂ produit (en g/mgmsi) au cours du temps

La figure 2.a. montre l'évolution de la production de CO₂ au cours du temps en

utilisant la feuille de jacinthe d'eau seule comme substrat de la fermentation, durant 121h. On observe les différentes phases de croissance caractéristiques du champignon : une phase de latence, une phase d'accélération, où le maximum de production de CO₂ atteint 8,3mg de CO₂/h.g matière sèche initiale, de décélération, puis de stabilisation, à partir de 38h environ.

La régression linéaire de la phase d'accélération permet de déterminer le temps de latence de la fermentation, ici 25,4h.

En traçant la courbe ln(intégrale de CO₂ produit), on trace la droite de régression linéaire afin de déterminer le coefficient de production spécifique de CO₂, ici de 0.14 mg CO₂/h² gmsi.

3.2. Activités cellulase et hémicellulase mesurée

La figure 3. résume les activités cellulase et hémicellulase mesurées après fermentation par PBLA de la feuille de jacinthe d'eau durant 121h. L'activité hémicellulase mesurée est bien plus importante que l'activité cellulase, 233 U/gms contre 31 U/gms. Des résultats similaires s'observent en utilisant le mélange tige/feuilles de jacinthe d'eau comme

substrat. La souche PBLA est une souche produisant préférentiellement des hémicellulases.

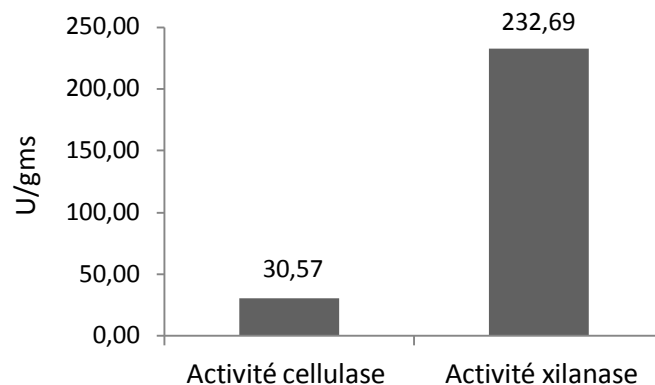


Fig. 3.- Activités cellulase et hémicellulase mesurées après fermentation par PBLA de la feuille de jacinthe d'eau durant 121h

3.3. Fermentation en batch de la jacinthe d'eau

La feuille de jacinthe d'eau reste une ressource relativement limitée, nécessitant un grand travail de préparation. Etant seulement partiellement dégradé au cours de la fermentation, il est intéressant d'imaginer un protocole permettant de récupérer la plante fermentée pour produire de nouvelles suspensions enzymatiques.

La jacinthe d'eau a été fermentée pour 3 batch, durant des temps respectifs de 48,42, et 66 h. La figure 4 montre les cinétiques de croissance obtenues pour chaque batch.

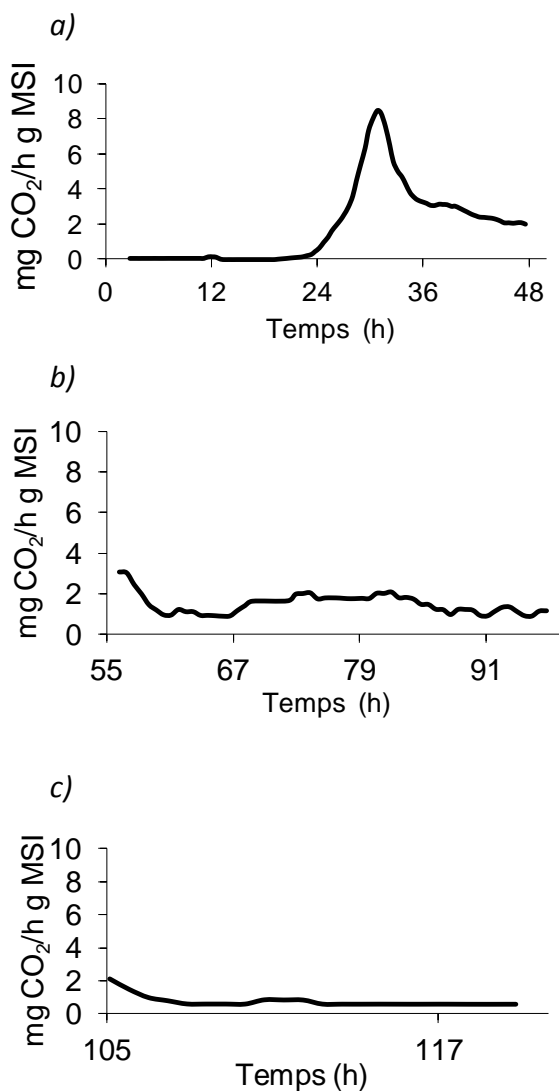


Fig. 4.- Taux de CO₂ produit au cours du temps par PBLA, sur feuille seule

- a) Batch 1, 48 h
- b) Batch 2, 42 h
- c) Batch 3, 66 h

On observe que la production de CO₂ diminue avec le nombre de batch, mais surtout que la croissance du champignon ne semble pas modifiée par le protocole utilisé, la cinétique étant relativement similaire à celle de la figure 2, feuille fermentée durant 121 h.

La figure 6 résume les activités enzymatiques mesurées en fin de chaque batch.

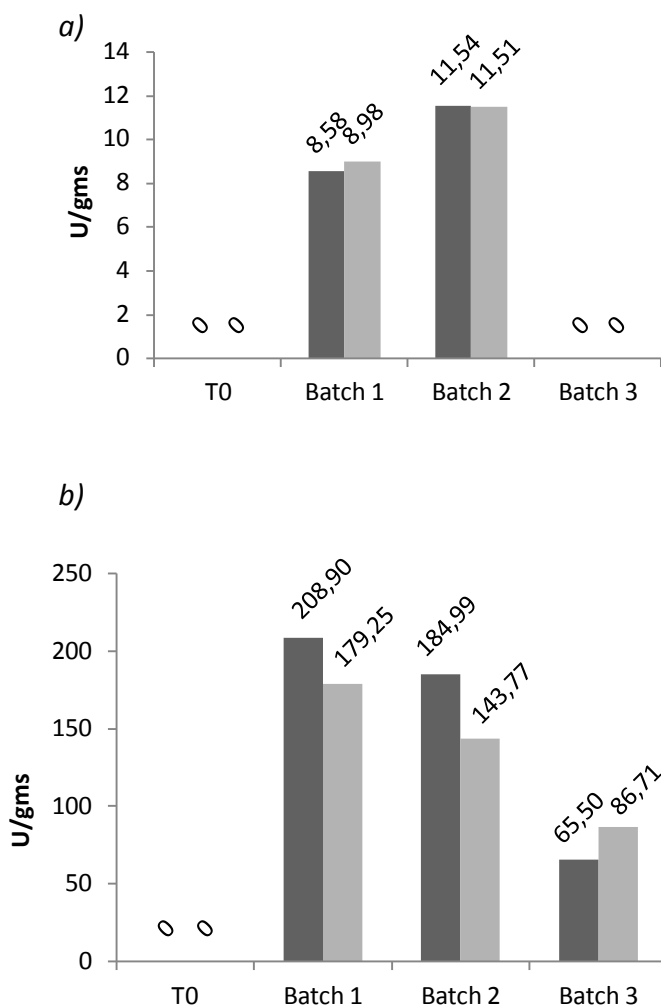


Fig. 6.a.- Activité cellulase mesurée après fermentation en batch de la feuille seule (2 répétitions)

6.b.- Activité xylanase mesurée après fermentation en batch de la feuille seule (2 répétitions)

L'activité cellulase est plus importante après une seconde fermentation (11,5 contre 8,8 U), mais n'est plus détectée après une

troisième fermentation.

L'activité xylanase décroît avec les fermentations successives. L'activité mesurée pour le troisième batch est relativement faible, 40 % de l'activité de premier batch environ.

La feuille peut donc être fermentée deux fois, et conserver des activités enzymatiques de cellulase et hemicellulase satisfaisantes.

3.4. Stabilité des enzymes produites

Les figures 3.a et 3.b montrent l'évolution de l'activité xylanase des suspensions enzymatiques issues des premiers batches, exprimée en pourcentage d'activité maximale, au cours du temps et en fonction de différentes températures d'exposition.

Globalement, plus la température d'exposition est élevée, plus l'activité enzymatique mesurée diminue rapidement. Ainsi, pour une température de 50°C,

l'activité diminue de 50% en 45 min environ, contre 3h30 à 30°C.

Les enzymes provenant de la seconde fermentation semblent plus stables concernant l'activité xylanase que celles de première fermentation. Ainsi, à 50°C, il faut 1h15 pour que l'activité xylanase ait chuté de 50%, et 3h20 à 40°C (2h30 pour celles de premier batch).

Concernant l'activité cellulase, concentrons nous sur les figures 3.c et 3.d.

De la même manière que précédemment, l'activité cellulase décroît d'autant plus rapidement que la température est élevée. Mais globalement, concernant les différences entre suspensions de première et seconde fermentation, c'est l'effet inverse que l'on observe. A 35°C, au bout de 2h20 l'activité cellulase des enzymes de second batch diminue de moitié ; au bout de 4h on n'observe toujours pas une telle baisse pour celles de première fermentation.

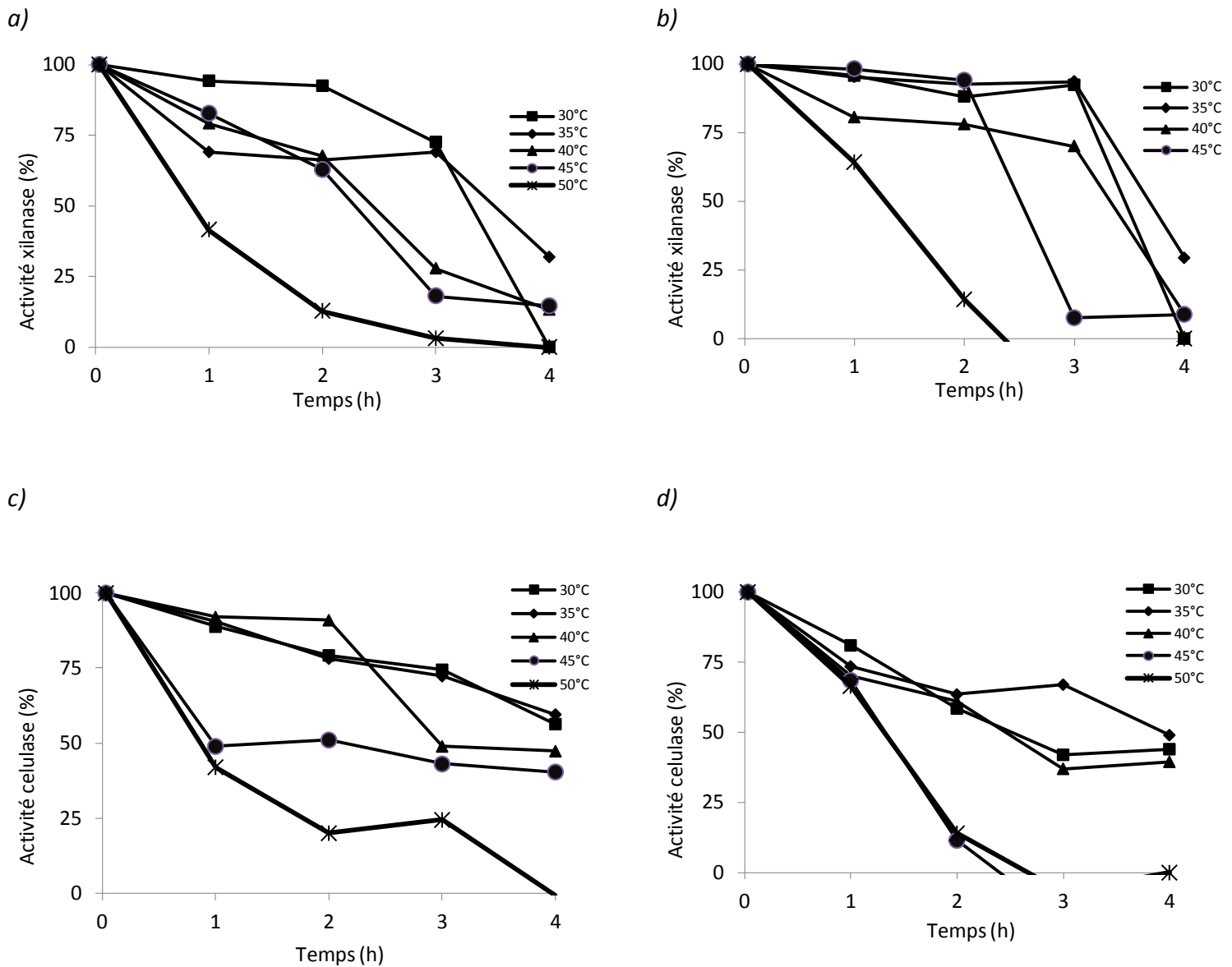


Fig. 6.- Evolution de l'activité enzymatique (en pourcentage de l'activité maximale) en fonction du temps à 30, 35, 40, 45, et 50°C

- a) Activité xylanase, 1^{er} batch
- b) Activité xylanase, 2nd batch
- c) Activité cellulase, 1^{er} batch
- d) Activité cellulase, 2nd batch

4. Conclusion et discussion

Le protocole de fermentation en batch de

la jacinthe d'eau proposé ici peut être une réponse satisfaisante à la réutilisation des résidus de jacinthe d'eau fermenté. Bien que l'activité hémicellulase, privilégié par la

souche de *Trichoderma* choisie, soit moindre après seconde fermentation de la feuille de jacinthe d'eau, celle-ci reste satisfaisante et ces enzymes semblent de plus de plus grande stabilité à la température. L'activité cellulase, quant à elle, est plus importante après une seconde fermentation. La feuille de jacinthe d'eau peut donc être fermentée pour au moins deux batch.

Cependant, il est important de voir que, en raison des difficultés à assurer un séchage doux, rapide, et efficace entre chaque batch, l'humidité initiale du substrat de chaque fermentation n'a pas été exactement contrôlé, ce qui a pu influencer les résultats obtenus. De plus, en raison de la difficulté à obtenir et traiter une quantité suffisante de feuilles de jacinthe d'eau, il n'y a pas eu suffisamment de répétitions du protocole de réalisées, et aucun test statistique n'a pu être effectué.

On peut aisément imaginer une application de ce protocole en industrie, avec réacteurs de type fed-batch. Il serait intéressant de tester le principe de fermentation en batch avec d'autre fungi. Le *Trichoderma* H88 notamment, utilisé sur le projet Fonycit Liriasa pour produire plus spécifiquement des cellulases. Ce protocole

peut également être appliqué à d'autre types de substrat, il serait intéressant de voir si l'effet reste le même : pour des feuilles de plants plus âgés, ou pour un mélange de tige et feuilles de jacinthe d'eau...

Abdullah et al, dans leurs travaux, proposent un autre mode de fermentation semblant donner de meilleurs résultats : la fermentation en semi-fed-batch. Celle-ci consiste à extraire du milieu de fermentation la moitié du matériel fermenté, d'en extraire les enzymes, et de le remplacer par la même quantité de nouveau substrat. Ce protocole aurait l'avantage de pouvoir permettre une production continue d'enzymes et d'augmenter les rendements obtenus.

5. Références

- Abdullah AL, Tengerdy, R. P. and Murphy, V. G. 1985. Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering* 27:20-27.
- Abraham M, Kurup GM. 1997. Kinetics of the enzymatic saccharification of pretreated tapioca waste (*Manihot esculenta*) and water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 66(2):133-145.

- Aswathy US, Sukumaran RK, Devi GL, Rajasree KP, Singhania RR, Pandey A. 2010. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: An evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresource Technology* 101(3):925-930.
- Bhattacharya A, Kumar P. 2010. Water hyacinth as a potential biofuel crop. *EJEAFChe, Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry* 9(1):112-122.
- Bolenz S, Omran H, Gierschner K. 1990. Treatments of Water Hyacinth Tissue to Obtain Useful Products. *Biological Wastes* 33(4):263-274.
- Chanakya HN, Borgaonkar S, Meena G, Jagadish KS. 1993. Solid-Phase Biogas Production with Garbage or Water Hyacinth. *Bioresource Technology* 46(3):227-231.
- Coetzee J, Hill M, Hurtado A, Laranjeira C, Nang'alelwa M, Ruiz Téllez T, Schrader G, Starfinger U, Julien M. 2008. Report of a Pest Risk Analysis : *Eichhornia crassipes*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. 20 p.
- Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, Hermann A, Hayn M. 1991. Production of *Trichoderma* Cellulase in Laboratory and Pilot Scale. *Bioresource Technology* 36(1):51-65.
- Goswami T, Saikia CN. 1994. Water Hyacinth - a Potential Source of Raw-Material for Greaseproof Paper. *Bioresource Technology* 50(3):235-238.
- Gunnarsson CC, Petersen CM. 2007. Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. *Waste Management* 27(1):117-129.
- Isarankura-Na-Ayudhya C, Tantimongcolwat T, Kongpanpee T, Prabkate P, Prachayasittikul V. 2007. Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. *Excli Journal* 6:167-176.
- Kivaisi AK, Mtila M. 1998. Production of biogas from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) (Mart) (Solms) in a two-stage bioreactor. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14(1):125-131.
- Malik A. 2007. Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth. *Environment International* 33(1):122-138.
- Malik DS, Bharti PK, Yadav R. 2006. Role of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) in remediation of sewage water pollutants. *Journal of Experimental Zoology India* 9(1):117-124.

- Masami GO, Usui I, Urano N. 2008. Ethanol production from the water hyacinth *Eichhornia crassipes* by yeast isolated from various hydrospheres. *African Journal of Microbiology Research* 2(5):110-113.
- McDonald RC, Wolverton BC. 1980. Comparative-Study of Waste-Water Lagoon with and without Water Hyacinth. *Economic Botany* 34(2):101-110.
- Miller GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426-428.
- Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL. 1960. Measurement of Carboxymethylcellulase Activity. *Analytical Biochemistry* 1(2):127-132.
- Miranda MGA, Lot AH. 1999. El lirio acuatico, una planta nativa de Mexico. *Ciencias* 53:50-54.
- Mishra BK, Sahu AK, Pani KC. 1988. Recycling of the Aquatic Weed, Water Hyacinth, and Animal Wastes in the Rearing of Indian Major Carps. *Aquaculture* 68(1):59-64.
- Monsod GG; Monsod G G, assignee. 1978. High-protein low-fibre animal poultry feed|contg. water hyacinth meal and hyacinth leaf protein concentrate patent DE2632134-A; US4069350-A.
- Ogier JC, Ballerini D, Leygue JP, Rigal L, Pourquoi J. 1999. Ethanol production from lignocellulosic biomass. *Oil & Gas Science and Technology-Revue De L Institut Francais Du Petrole* 54(1):67-94.
- Ogunlade Y. Impact of water hyacinth on socio-economic activities: ondo state as a case study; 2002 27 nov-1er Dec; New Bussa, Nigeria. p 175-183.
- Ogunlade Y. Notes on utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as a means of pollution control; 2002 27 nov-1er Dec; New Bussa, Nigeria. p 79-84.
- Ojeifo M, Ekokotu PA, Olele NF, Ekelemu JK. A review of the utilisation of water hyacinth: alternative and sustainable control measures for a noxious weed; 2002 27 nov-1er Dec; New Bussa, Nigeria. p 71-78.
- Okoye FC, Daddy F, Ilesanmi BD. The nutritive value of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and its utilisation in fish feed; 2002 27 nov-1er Dec; New Bussa, Nigeria. p 65-70.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77(1):149-162.
- Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial

- cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46(7):541-549.
- Tucker CS, Debusk TA. 1983. Seasonal-Variation in the Nitrate Content of Water Hyacinth (*Eichhornia-Crassipes* [Mart] Solms). *Aquatic Botany* 15(4):419-422.
- Wolverton BC, McDonald RC. 1978. Nutritional Composition of Water Hyacinths Grown on Domestic Sewage. *Economic Botany* 32(4):363-370.
- Wolverton BC, McDonald RC. 1979. Water Hyacinth - from Prolific Pest to Potential Provider. *Ambio* 8(1):2-9.
- Wolverton BC, McDonald RC. 1979. Water Hyacinth (*Eichhornia-Crassipes*) Productivity and Harvesting Studies. *Economic Botany* 33(1):1-10.
- Xia LM, Cen PL. 1999. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry* 34(9):909-912.
- Zeringue SP, Rusoff LL, Wolverton BC. 1979. Water Hyacinth - Source of Roughage for Lactating Cows. *Journal of Dairy Science* 62:200-200.
- Zhou WB, Zhu DW, Tan LF, Liao SJ, Hu ZH, Hamilton D. 2007. Extraction and retrieval of potassium from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource Technology* 98:226-231.