

Etude des limitations physiques lors de la production de biopesticides par *Bacillus thuringiensis* spp *kurstaki* sur un milieu à base de son de blé

Rita BARSSOUM¹⁻³, Karim Mohamed CHALBI², Rayan NASSERDINNE¹, Julien CESCUT³, Mireille KALLASSY¹, César ACEVES-LARA², Luc FILLAUDEAU²

¹Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, Liban

²Toulouse Biotechnology Institute – Bio & Chemical Engineering, INSA Toulouse, France

³Toulouse White Biotechnology, INSA Toulouse, France

Contexte & Questions scientifiques :

Bacillus thuringiensis (*Bt*) est une bactérie gram positive, sporulante, connue pour son activité insecticide¹. Cette dernière est due à la production des cristaux formés par des δ -endotoxines². *Bt* est à l'origine de la production de plusieurs biopesticides existant sur le marché (<https://www.bpprc.org/>). Le projet européen IPM-4-Citrus (MSCA RISE, n°734921, 2017-2023) vise à optimiser la culture de 3 souches de *Bt* var *kurstaki* (Lip, BLB1 et HD1) sur un milieu à base de son de blé (WB). Les biop performances (CFU, spores, δ -endotoxines) et les limitations biochimiques induites par le substrat ont été caractérisés et modélisés³. En revanche, les propriétés physiques du milieu (morphologie, rhéométrie et séparation solide-liquide) demeurent des verrous scientifiques et techniques pour l'intensification, le contrôle de la bio-production (mode de culture) et le changement d'échelle.

Matériels & Méthodes :

Quatre granulométries (Classes 1 : > 850 μm , classe 2 : 500-850 μm , Classe 3 : 250-500 μm et Classe 4 <250 μm) ont été générées par tamisage du substrat (WB), correspondant à 1%, 19.8 %, 51.4 % et 28.2% w/w respectivement. Les suspensions lignocellulosiques hétérogènes sont stérilisées (121°C, 20min) puis caractérisées en fonction de la granulométrie et de la concentration (0.1 à 150 ghm/L). Trois types d'analyses ont été conduites, la **morpho-granulométrie** en voie sèche (Morphology G3S, Malvern instruments), la **rhéométrie in-situ** (Mars 3 avec mobile dédié, Thermo Scientific) et **cinétique de décantation** (Turbiscanlab, Formulation)⁴. Les données sont ensuite discutées puis décrites par des modèles phénoménologiques.

Résultats & Discussion :

Au niveau biochimique, les teneurs en amidon sont 0,173 ; 0,144 et 0,347 g/gdm (Figure 1A) respectivement pour les classes 2, 3 et 4. La granulométrie (basée sur le diamètre du cercle équivalent) indique que la distribution en nombre met en relief la population des fines (<30 μm) et que la distribution en volume démontre l'effet de tamisage sur la population des grosses (Figure 1B). Les teneurs en granules d'amidon (particules fines) restent néanmoins importantes même dans les classes 2 et 3. La rhéométrie des suspensions (Figure 1C et D) renseigne sur un comportement Newtonien pour des concentrations très diluées (0,1-1 ghm/L), évoluant vers un comportement non-Newtonien de type rhéofluidifiant pour des suspensions semi-diluées (5 – 73,6 ghm/L) puis concentrées (80 – 150 ghm/L). Le caractère rhéofluidifiant est observable quelques soient les classes à des cisaillements de 1 et 100 s^{-1} (Figure 1C). L'extraction de la consistance, k [$\text{Pa}\cdot\text{s}^n$] et l'indice de structure, n [/] en fonction de la concentration (Figure 1 D) est possible malgré une incertitude importante (méthodologie). En complément, un modèle phénoménologique (type Quemada, 2006) décrivant l'évolution entre la viscosité de la suspension et la fraction volumique pourrait être proposé. La granulométrie (WB) et la teneur en amidon influence de manière différente le comportement rhéologique des suspensions.

L'augmentation de la concentration en amidon augmente significativement la viscosité, alors qu'une diminution de la granulométrie la réduit. L'analyse des vitesses de décantation confirme la différence de comportement entre les granules d'amidon et les particules de son de blé.

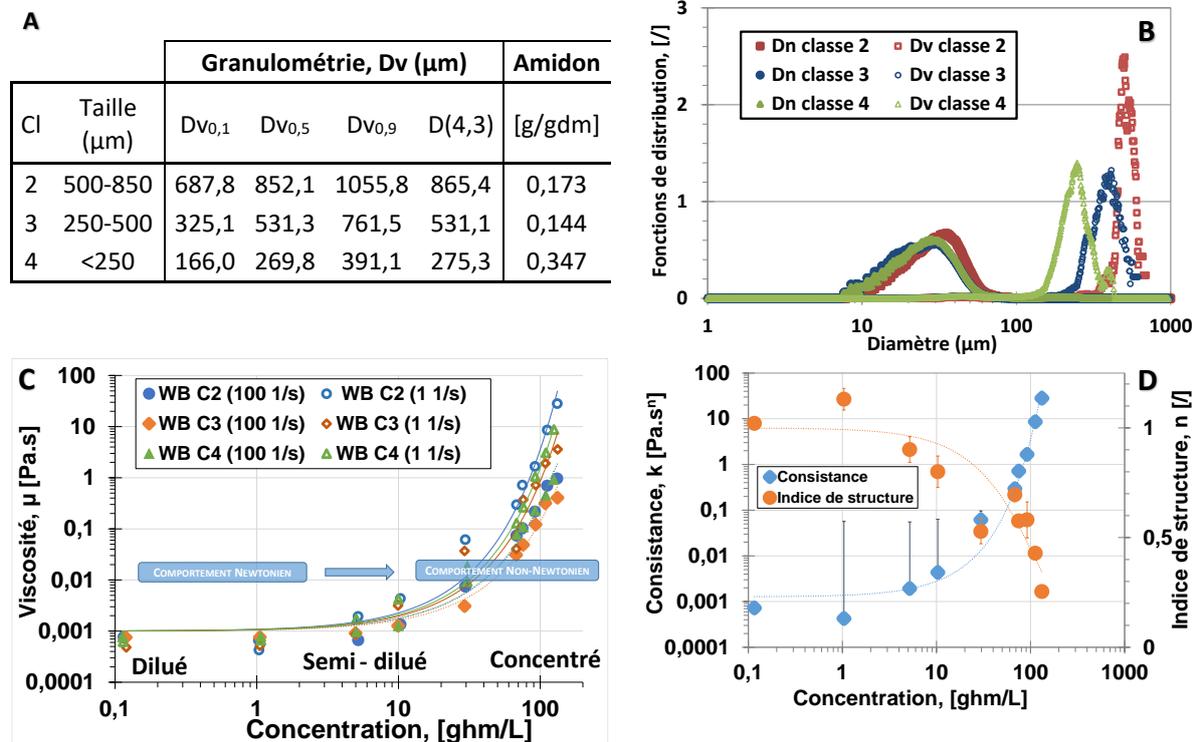


Figure 1: Caractéristiques physico-chimiques du WB (A). Fonction de distribution cumulée en nombre et en volume pour chaque classe (B). Evolution de la viscosité des suspensions WB (Pa.s) en fonction de la concentration (ghm/L) pour des cisaillements de 1 et 100 s⁻¹ (C). Evolution de la consistance k (Pa.sⁿ) et l'indice de structure n [] des suspensions WB en fonction de la concentration (ghm/L) (D)

Conclusion & Perspectives :

Considérant la caractérisation de la granulométrie, l'étude du comportement rhéologique et l'aptitude à la décantation des suspensions, une sélection rationnelle des conditions opératoires (fraction du WB, concentration initiale, vitesse d'agitation minimale du bioréacteur) pour la culture et le DSP est possible. Des modèles rhéologiques robustes prenant en considération la concentration/fraction volumique, la granulométrie, la morphologie, la teneur en amidon sont nécessaires pour envisager une simulation numérique des écoulements et un changement d'échelle du procédé. De même, l'évolution du comportement rhéologique des suspensions lors de la culture (production de biomasse cellulaire, sporulation et lyse) doit être explorée au même titre que les bio-performances (souche dépendante).

Références bibliographiques :

- (1) Palma, L.; Muñoz, D.; Berry, C.; Murillo, J.; Caballero, P. Bacillus Thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins* **2014**, *6* (12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>.
- (2) Fayad, N.; Kambris, Z.; El Chamy, L.; Mahillon, J.; Kallassy Awad, M. A Novel Antidipteran Bacillus Thuringiensis Strain: Unusual Cry Toxin Genes in a Highly Dynamic Plasmid Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87* (5), e02294–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-20>.
- (3) Monroy, T. S.; Abdelmalek, N.; Rouis, S.; Kallassy, M.; Saad, J.; Abboud, J.; Cescut, J.; Bensaid, N.; Fillaudeau, L.; Aceves-Lara, C. A. Dynamic Model for Biomass and Proteins Production by Three Bacillus Thuringiensis Ssp Kurstaki Strains. *Processes* **2021**, *9* (12), 2147. <https://doi.org/10.3390/pr9122147>.
- (4) Le, T.; Anne-Archard, D.; Coma, V.; Cameleyre, X.; Lombard, E.; To, K. A.; Pham, T. A.; Nguyen, T. C.; Fillaudeau, L. Using In-Situ Viscosimetry and Morphogranulometry to Explore Hydrolysis Mechanisms of Filter Paper and Pretreated Sugarcane Bagasse under Semi-Dilute Suspensions. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *127*, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.07.006>.