

Essais de fermentation à partir de *Calotropis procera* : production de CH₄ en fonction de la charge en substrat et en fonction de la température

M. MILAITI¹, A.S. TRAORE², R. MOLETTA³

1. Faculté des Sciences exactes et appliquées (FSEA) Université de N'Djaména B.P 1027 Tchad Tél: (235) 52 97 40 ou (235) 841 75 02 Fax : (235) 51 40 33 E-mail: mmilaiti@yahoo.fr

2. Laboratoire de biochimie et de microbiologie FA.S.T, Université de Ouagadougou 03 B.P. 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso Tél: (226) 33 20 41/ 30 88 52 Télécopie: (226) 30 72 42 E-mail: astraire@hotmail.com

3. INRA - Laboratoire de Biotechnologie de l'environnement (L.B.E.) avenue des étangs - 1110 Narbonne - France Tél. :+33 4 68 42 51 60

Introduction

La biométhanisation est un procédé qui permet de convertir les matières organiques en composés énergétiques. Elle apparaît comme une solution envisageable pour lever le défi énergétique dans les pays de la zone sahélienne. Ce procédé peut aussi apporter des solutions aux nombreux problèmes de l'environnement : la désertification, la déforestation et la pollution.

De nombreux pays, dans le cadre de la politique d'économie d'énergie et de protection de la nature, se tournent vers la valorisation de la biomasse. Au Burkina Faso et au Tchad, nous nous sommes intéressés à une plante à latex, le *Calotropis*

procera. L'intérêt porté sur la valorisation de cette plante est encore très récent.

Les travaux de SALL M.D. et ses collaborateurs sur la valorisation des plantes à latex en 1989 au Sénégal et ceux de TRAORE A.S. en 1992 au Burkina Faso ont montré que *Calotropis procera* est riche en matière organique et très fermentescible.

Dans le cadre de nos travaux réalisés au laboratoire, nous avons voulu savoir quel est le profil de cette fermentation. Notre contribution ici porte sur le suivi des produits gazeux en fonction de la température et sur l'influence de la charge du substrat sur la production du méthane.

Matériel et méthodes

Les fermentations ont été conduites en discontinu dans des fermenteurs de 2 litres en pyrex, infiniment mélangés et contenant 1 litre de milieu fermentaire. La température a été stabilisée par un circuit d'eau externe provenant d'un bain thermostaté. Les fermenteurs ont été munis d'une sonde à pH reliée à un régulateur maintenant le pH choisi par addition de KOH 2 N. L'homogénéisation du milieu a été faite par agitation magnétique ou par rotation de pales dans les digesteurs.

Schéma technologique

Les essais de méthanisation de la biomasse végétale (phytomasse) ont été réalisés à partir des feuilles de *C. procera* séchées et broyées. La charge de cette biomasse dans ces essais de fermentation a été prise à un taux de 2 %, 4 % et 5% (P/V).

Le tampon utilisé dans le milieu de culture a été pris suivant cette composition : 2g de K₂HPO₄ et 2g de NH₄Cl dans 1000 ml d'eau distillée. Suivant la charge massique du substrat (2%, 4% et 5%), trois milieux de culture ont été préparés avec un

digesteur contenant 1000 ml de solution tampon. Le milieu a été agité puis son PH ajusté à 7 avec KOH 2N. Après cette opération, la stérilisation du milieu a été faite à l'autoclave pendant 30 minutes à 115°C. Le vide dans le digesteur a été obtenu à l'aide d'une pompe à impression d'huile et ce vide a été ensuite remplacé par un gaz inerte qui est l'argon. Le milieu ainsi obtenu a été inoculé dans les conditions stériles.

Nos études ont été réalisées avec l'inoculum provenant des boues des étangs à Narbonne (France). La quantité de l'inoculum injectée, a été prise à 10 % (V/V). Après l'inoculation les bioréacteurs ont été thermorégulés à 25°C, 35°C et 45°C. La production du biogaz a été suivie pendant 28 jours.

Analyse de biogaz

Elle a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse sur appareil SHIMADZU GC-8A équipé d'un détecteur à catharomètre qui mesure la conductibilité des gaz et relié à un intégrateur, le CR 5A.

La séparation des différents gaz (CO_2 , N_2O , H_2 , O_2 , N_2 , CH_4) a été faite sur deux colonnes:

- le CO_2 et le N_2O ont été séparés sur une colonne Hayesep Q (80-100 mesh, 2m X 1/8 inch, Touzart & Matignon).
- les autres gaz (H_2 , O_2 , N_2 , CH_4) ont été séparés sur un tamis moléculaire 5 (80-100 mesh, 2m X 1/8 inch, Touzart & Matignon).

Les deux colonnes ont été montées en série et séparées par une colonne à vide de 10 m de long qui ralentit le passage des gaz au niveau de la deuxième colonne. La détection a été faite sur un catharomètre (principe du pont Whestone) dont l'intensité a été fixée à 90 mA.

Les échantillons ont été analysés dans les conditions suivantes : température de l'injecteur 100°C, température du détecteur 100°C, température du four 35°C, volume du gaz injecté 1 ml, gaz vecteur Argon, pression au manomètre de l'appareil 3 bar.

L'analyse volumétrique de biogaz de fermentation a été faite directement dans un compteur volumétrique SCHLUMBERGER fixé à la sortie de la phase gazeuse du digesteur.

Résultats

Les essais de fermentation ont été réalisés avec des charges en substrat séché et broyé de 2%, 4% et 5% (P/V).

L'augmentation de la charge du substrat des réacteurs entraîne un retard de la méthanogénèse au cours de la fermentation. Ce retard est assez accentué dans le digesteur chargé à 5%. Dans le digesteur de 2%, la production de CH_4 a atteint un niveau de 76,3% au bout de 3 semaines de digestion. Des expériences réalisées dans les fermenteurs à 25°C, 35°C et 45°C avec seulement une charge de 2% de substrat donnent des produits gazeux apparus au cours de la fermentation et représentés par les figures 2, 3 et 4.

Dans le fermenteur à 25°C, le CO_2 a tendance à s'accumuler, néanmoins son évolution reste en dessous de 10% pendant toute la durée de la fermentation. Par contre dans les fermenteurs à 35°C et 45°C, la production du CO_2 est assez importante pendant les dix premiers jours de fermentation. Cette production commence à diminuer à partir du 12^e jour d'incubation et s'est maintenue entre 15% et 20% jusqu'à la fin de la fermentation. Pendant les deux premières semaines, la production du CO_2 est d'autant plus importante que la température soit élevée.

La figure n° 3 montre que la production de l'hydrogène est très précoce et sa diminution très rapide. Dans les réacteurs de 45°C et 35°C, l'hydrogène a totalement disparu à partir du 3^e jour, mais dans le réacteur à 25°C, l'hydrogène a disparu dans le milieu réactionnel au 5^e jour d'incubation. En outre, nous remarquons qu'au fur et à mesure que les pics d'hydrogène et de CO_2 diminuent, ceux du méthane augmentent.

L'évolution du méthane observée sur la figure 4 permet de conclure que la température a une influence sur la production du méthane. Au bout de 28 jours de biofermentation réalisée avec le substrat séché et broyé, la production de méthane dans les réacteurs à 45°C et à 35°C (60,32% et 56,65% de CH_4 en moyenne par jour respectivement) est beaucoup plus élevée que celle du réacteur à 25°C (30,975% de CH_4 en moyenne par jour).

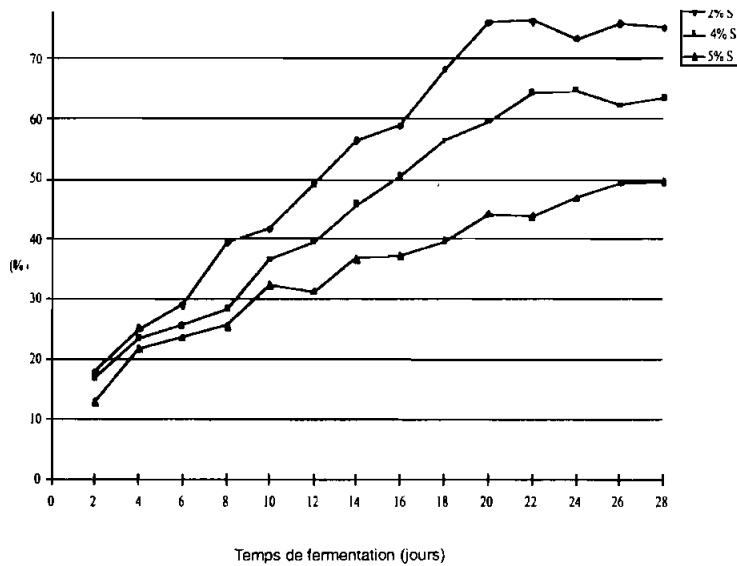
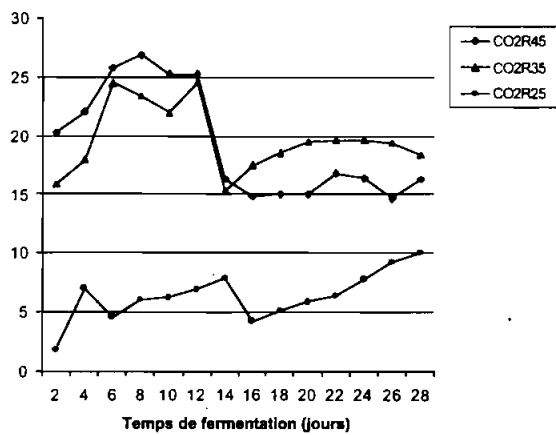
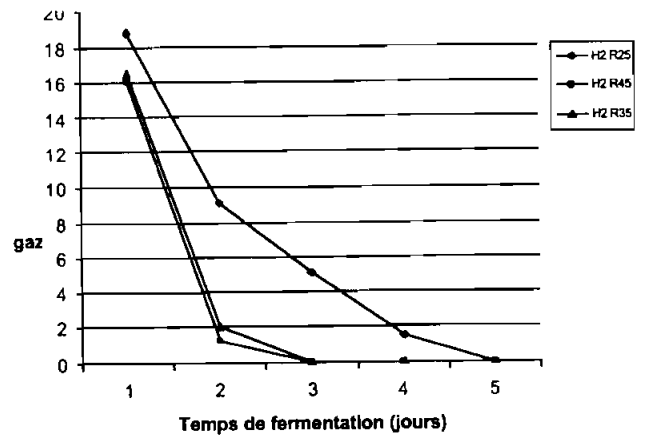


Figure 1 : Etude de l'influence de charge en substrat sur la production du méthane



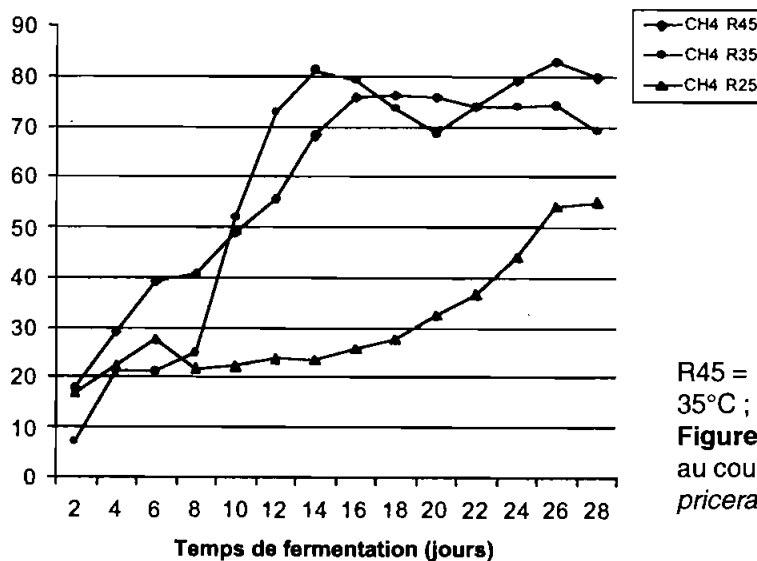
R45=Réacteur à 45° C ; R35 = Réacteur à 35° C ;
R25 = Réacteur à 25° C

Figure 2 : Evolution de CO₂ au cours de la fermentation méthanique de *C. profera*



R45=Réacteur à 45° C ; R35 = Réacteur à 35° C ;
R25=Réacteur à 25° C

Figure 3 : Evolution de H₂ au cours de la fermentation méthanique de *C. profera*



R45 = Réacteur à 45°C ; R35 = Réacteur à 35°C ;
R25 = Réacteur à 25°C

Figure 4 : Cinétique de production du méthane au cours de la fermentation méthanique de *C. profera* en fonction de la température

Discussion

Les cinétiques de production de CH₄ observées sur la figure 1 permet de conclure que la charge du substrat influe sur la production de méthane. Pour nos essais de fermentation, la productivité moyenne du biométhane est plus importante dans le fermenteur chargé à 2% de substrat (145,09 cm³ CH₄ /j/l) que dans celui chargé à 4% (130,91 cm³ CH₄ /j/l) ou à 5% (77,06 cm³ CH₄ /j/l).

Les produits gazeux observés à 25°C, 35°C et 45°C (figures 2, 3 et 4), ont montré que la production d'hydrogène est très rapide au 1^{er} jour de fermentation mais tombe rapidement au 2^e jour. Cette production diminue progressivement pour disparaître au 5^e de fermentation. En revanche, la production de CH₄ débute lentement au premier jour d'incubation et évolue en augmentation pendant la durée de la fermentation.

La comparaison entre la production d'hydrogène qui est rapide et celle de CH₄ qui est très lente, découle du développement généralement lent des bactéries méthanogènes (SCHINK B. 1997, STAMS AJM 1994). Et si la production de CH₄ se poursuit après disparition des pics de H₂, cela révèle l'existence dans le milieu fermentaire des bactéries méthanogènes acétoclastes et hydrogénéophiles (LABAT M. 1986, STAMS AJM 1994). On peut noter également dans le milieu, la présence des bactéries méthanogènes thermophiles responsables de la production du méthane à 45°C.

Le fait que la diminution de la quantité d'hydrogène et de CO₂ soit couplée à l'augmentation de la production du CH₄, indique clairement l'utilisation de l'hydrogène moléculaire par les bactéries méthanogènes hydrogénéophiles pour réduire le CO₂ en CH₄ (TRAORE AS 1983, KELTJENS 1986). En consommant préférentiellement l'hydrogène produit, les méthanogènes maintiennent ainsi la faible pression partielle en hydrogène. La faiblesse de cette pression est nécessaire à l'obtention des conditions thermodynamiques favorables pour les bactéries acétogènes productrices d'hydrogène (GARCIA JL 1982, STAMS AJM 1994).

La production intense de H₂ et de CO₂ durant les premiers jours de fermentation suggère que les

trois premières phases (hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse) de la méthanisation soit effectivement fonctionnelles dans les premiers instants de la fermentation. Le biogaz produit pendant les premiers jours de digestion est riche en CO₂ et pauvre en CH₄ (ARCHER DB 1983 ; CHYNOWETH DP et coll. 1971). Dans l'analyse de CO₂ et de H₂ à 45°C et 35°C, la production tout comme la consommation de ces produits gazeux sont relativement rapide par rapport à la production et à la consommation de ces produits à 25°C. L'influence de la thermophilie apparaît clairement dans la cinétique de la production de CH₄. L'évolution de CH₄ atteint rapidement le niveau maximum à 45°C et à 35°C alors qu'à 25°C cette cinétique de CH₄ est plus lente et plus étalée dans le temps. Ces cinétiques traduisent donc le fait que l'augmentation de la température de méthanisation permette d'accroître considérablement les activités métaboliques des partenaires bactériens de la biométhanisation (CONRAD R 1990).

Dans nos conditions expérimentales, le fermenteur à 25°C donne un rendement de 4519,74 cm³ CH₄ /kg de substrat séché et broyé métabolisé par jour. Le fermenteur à 35°C présente un rendement de 20829,034 cm³ CH₄ /kg de substrat séché et broyé métabolisé par jour. Le fermenteur à 45°C donne par contre un rendement de 23656,89 cm³ CH₄ /kg de substrat séché et broyé métabolisé par jour.

En établissant la matière sèche avant et après la méthanisation, le taux de solubilisation est de 98,68% pour le fermenteur à 45°C. Pour le fermenteur à 35°C, ce taux de solubilisation est de 98,84%. Pour le fermenteur à 25°C, ce taux est de 98,79%. Ces résultats constituent la preuve que cette plante est facilement biodégradable et très fermentescible aussi bien en thermophilie qu'en mésophilie. A ce titre, elle constitue un bon substrat pour un consortium microbien dans la voie de la méthanogénèse.

Conclusion

L'ensemble des résultats constitue un acquis majeur pour la valorisation énergétique de *C. prosera* par la biométhanisation. C'est donc une biomasse végétale à prendre en compte dans la mise en place d'une politique de recherche de sources d'énergie nouvelles et renouvelables.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier la Coopération française, le Laboratoire de Biotechnologie et Environnement (LBE) de Narbonne, l'Université de Ouagadougou et l'Université de N'Djaména qui ont soutenu financièrement, matériellement et moralement ce travail.

Références bibliographiques

- ARCHER D.B. 1983. The microbiological basis of process control in methanogenic fermentation of soluble wastes. *Enzyme Micro .technol.*, 5: 162 - 170.
- CHYNOWETH D.P., MAH R.A. 1971. Volatils Acid formation in sludge digestion. *Adv. chem. ser.*, 105 : 41-54.
- CONRAD R. and WETTER B. 1990. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic and other anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.*, 155: 91-95.
- GARCIA J.L., GUYOT JP, OLIVIER B. TRADE M. 1982. Ecologie microbienne de la digestion anaérobie. *Chier ORSTOM*, 45 : 3-15.
- KELTJENS JT, DRIFT C. 1986. Electron transfer reactions in methanogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39: 259-303.
- LABAT M., GARCIA J.L. 1986. Study on the development of methanogenic microflora during anaerobic digestion of sugar beet pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 163-168.
- SALL M. D., SOW D., TRAORÉ A.S., TINE E. 1989. Valorisation des plantes à latex : Euphorbia tirucalli et Calotropis procera. *Rev. Rès. Amélior. Prod. Agr. Milieu Aride*, 1: 171-179.
- SCHINK B. 1997. Energetics of Syntrophic cooperation in Methanogenic Degradation. *American society for Microbiology. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61 (2): 262-280
- STAMS A.J.M. 1994. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66 , 271-294 .
- TRAORE, A. S., 1992. Biogas fermentation in Calotropis procera: a latex plant in west Africa. *Bioresource technology*, 41: 105-109.

Résumé

La valorisation énergétique de *Calotropis procera*, plante à latex blanc de la famille des Asclépiadacées a été envisagée par la voie Biotechnologique notamment par la voie de Biométhanisation.

Nous avons réalisé des essais de fermentation au laboratoire avec les feuilles de *C. procera* séchées et broyées en régime discontinu. Au cours de cette étude, nous avons procédé à deux tests de paramètres : les charges en substrat, et les différentes températures de fermentation qui sont des conditions d'optimisation des réactions biologiques.

Pour la charge en substrat, des expériences ont été faites avec des taux de 2%, 4%, 5% (p/v). Les tests sur les charges du substrat séché et broyé montrent que la charge de 2% de substrat, au bout de 28 jours de biométhanisation, donne une productivité plus importante (145,09 cm³ CH₄/j/l) que

celle de la charge de 4% (130,91 cm³ CH₄/j/l) ou 5 % de charge (77,06 cm³ CH₄/j/l).

Les essais de biofermentation réalisés avec les échantillons de *C. procera* séchés et broyés à différentes températures montrent que celles-ci ont une influence manifeste sur la production de biométhane. Ainsi la teneur en CH₄, au bout de 28 jours de biofermentation, dans les fermenteurs à 45°C et 35°C est beaucoup plus importante (respectivement 60,32% et 56,67% de CH₄ en moyenne par jour) que celle du fermenteur à 25°C (30,975 % de CH₄ en moyenne par jour).

Mots Clefs : Biométhanisation, *Calotropis procera*, température, charge en substrat

Summary

Methanic fermentation test from the *Calotropis procera* : Production of CH₄ in function of temperature and substrate load

The energetic valorisation of *Calotropis procera* a latex white plant belonging to the family *Asclepiadaceae* considered by biotechnology as biomethanisation. Some experiments on fermentation were conducted in discontinue regime, in the laboratory using dried and ground *C. procera* leaves. In this study two parameters tests were conducted, substrate load and different fermentation temperatures as optimisation condition of biological reaction.

Concerning the substrate load, some experiments were done with a total of 2 %, 4 % and 5 % (w/v). The tests on the dried and ground substrate load showed that the load of 2 % substrate at the end of 28 days of biomethanisation, produced very important productivity (145,09 cm³ CH₄ day/L) than the load of 4 % (130,91 cm³ CH₄ day/L) or 5 % of load (77,06 cm³ CH₄ day/L).

Experiment conducted (realised) on dried and ground samples of *C. procera* at different temperatures, showed that they have influence on the biomethane after 28 days of biofermentation the content (among) of CH₄ in the fermenteurs at 45 and 35 °C was found to be very important (60,32 % and 56,67 % CH₄ in average per day) respectively than the fermenteur at 25°C (30,975 % CH₄ is average per day).

Key words : *Calotropis procera*, temperature, substrate load, biomethanisation.