

6.1.2 Les procédés

Bien qu'ils soient encore cantonnés à des études R et D, les procédés de production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique intègrent plusieurs considérations de base : i) la lignine ne peut être fermentée en éthanol, ii) la matrice lignocellulosique doit être prétraitée pour rendre cellulose et hémicelluloses hydrolysables, iii) les fractions cellulosiques et hémicellulosiques sont des sources potentielles de sucres fermentescibles. Par conséquent, le schéma générique du procédé comprend les principales opérations unitaires suivantes : le prétraitement de la matière première, l'hydrolyse, la fermentation éthanolique et la séparation de l'éthanol du moût de fermentation (fig. 6.3). Les étapes de fermentation des hexoses et la récupération de l'éthanol par distillation/rectification/déshydratation sont identiques à celles des procédés déjà éprouvés de production d'éthanol à partir des plantes sucrières et céréalières qui sont détaillés dans le chapitre 2. Les procédés développés actuellement sont des variantes de ce schéma, fonction des options choisies pour les opérations unitaires et des flux de cellulose, hémicelluloses et lignine (paragr. 6.1.2.6).



Figure 6.3

Schéma générique de production d'éthanol ex-BLC (biomasse lignocellulosique).

6.1.2.1 Le prétraitement

Nous ne traiterons pas ici du conditionnement du végétal proprement dit qui consiste généralement en un broyage/découpage des matériaux fibreux, par exemple en copeaux pour le bois, pour le rendre transportable sur des tapis roulants, mais du traitement nécessaire pour rendre la cellulose accessible à l'hydrolyse. Cet objectif peut être atteint de plusieurs manières : en abaissant la teneur en lignine et hémicelluloses du substrat solide à traiter, en augmentant la porosité de la matrice, en diminuant la cristallinité de la cellulose ou en augmentant sa surface spécifique. En fonction du type de prétraitement, ces actions peuvent être conjuguées. Les principales contraintes de cette étape sont d'éviter la perte ou la dégradation des sucres et de limiter la formation de produits inhibiteurs ainsi que les rejets. De nombreuses techniques de prétraitement ont été étudiées et proposées (tableau 6.2.).

A. Prétraitements physiques

a. Prétraitements mécaniques

Ces traitements visent essentiellement à augmenter les surfaces accessibles et ainsi favoriser l'hydrolyse ultérieure. Par ailleurs, ils peuvent réduire le DP de la cellulose et de la lignine et la cristallinité de la cellulose. Ils consistent en un broyage mécanique intense jusqu'à obtention de fragments de taille inférieure à 2 mm. La consommation d'énergie nécessaire est dépendante de la matière première, notamment de son degré de siccité, mais reste trop élevée pour que ce mode de prétraitement soit utilisé à grande échelle [1].

Tableau 6.2 Principaux procédés de prétraitement.

Procédés physiques	Prétraitement mécanique Thermolyse
Procédés physico-chimiques	Thermohydrolyse Explosion à la vapeur Explosion à la vapeur en conditions acides AFEX Explosion au CO ₂
Procédés chimiques	Prétraitement à l'acide dilué Prétraitement alcalin Procédé Organosolv Oxydation chimique Oxydation biologique

b. Thermolyse

À des températures inférieures à 300 °C, la décomposition de la cellulose en produits volatils et liquides est limitée et le produit solide obtenu peut être ensuite hydrolysé en sucres par hydrolyse acide douce avec des rendements de l'ordre de 80 à 85 % [1]. La présence d'oxygène ou de chlorure de zinc améliorerait les vitesses de réaction.

B. Prétraitements physico-chimiques**a. Thermohydrolyse**

La thermohydrolyse consiste en une cuisson à l'eau de la biomasse sous forte pression. Le procédé est discontinu et la température de chauffage est de 200-230 °C (section 5.3). Le temps de cuisson est de 15 à 60 minutes. Des études menées au laboratoire ont montré que cette technique conduit à une solubilisation complète des hémicelluloses et significative de la lignine. Elle permettrait également une augmentation de la taille des pores de la matrice lignocellulosique et une diminution de l'indice de cristallinité de la cellulose, favorisant ainsi l'hydrolyse enzymatique ultérieure. Des taux de solubilisation des hémicelluloses compris entre 80 et 100 % et des taux d'hydrolyse enzymatique supérieurs à 90 % ont été rapportés [2]. La thermohydrolyse n'a cependant pas été utilisée en réacteurs de grands volumes probablement à cause de la difficulté à travailler à des pressions supérieures à 50 bar. Cependant, elle présente de nombreux attraits :

- taux de solubilisation des pentoses et digestibilité enzymatique de la cellulose prétraitée élevés,
- pas d'ajout de réactifs chimiques,
- absence de produits inhibiteurs,
- peu de rejets,
- concentration de biomasse élevée (>100 g/l).

b. Explosion à la vapeur

Ce traitement, aussi dénommé auto-hydrolyse, consiste à chauffer rapidement le substrat (160 à 260 °C) par injection de vapeur saturée à haute pression (10 ou 50 bar), à le maintenir à la température désirée pendant un temps variant de quelques secondes à quelques minutes, puis à l'amener à pression atmosphérique par une détente brutale. Le procédé a été mis en œuvre en discontinu (procédé Iotech) ou en continu (procédé Stake) à des échelles importantes. Les paramètres d'action sont la température, le temps d'action, la concentration en matières sèches et le conditionnement préalable du matériau (taille des copeaux dans le cas de bois par exemple). Cette technique conduit à une hydrolyse partielle des hémicelluloses ainsi qu'à une transformation de la lignine et une destruction importante de la structure de la matrice lignocellulosique. Elle s'accompagne également d'une augmentation de l'indice de cristallinité de la cellulose.

L'hydrolyse des hémicelluloses est obtenue en combinant soit haute température et faible temps d'action (270 °C – 1 min), soit plus faible température et temps d'action plus long (190 °C – 10 min). Cependant, avec ce procédé, la solubilisation des hémicelluloses, qui est obtenue quand l'hydrolyse a conduit à l'obtention de monosaccharides et d'oligosaccharides de très faible DP, n'est pas maximale. Par ailleurs, le rendement d'hydrolyse enzymatique de la cellulose obtenue après explosion à la vapeur reste le plus souvent en deçà de 50 %. Enfin, cette technique conduit à la formation de produits inhibiteurs et est peu efficace dans le cas des bois tendres.

c. Explosion à la vapeur en conditions acides

Les différents inconvénients cités dans le paragraphe précédent disparaissent lorsque l'explosion à la vapeur est pratiquée en conditions acides douces, par exemple en présence de H₂SO₄ ou de SO₂, qui permettent d'opérer à des températures plus basses (150 à 200 °C contre 250 °C en absence du catalyseur). De cette manière, il peut y avoir hydrolyse totale et solubilisation des hémicelluloses, amélioration du rendement de la cellulolyse enzymatique ultérieure et réduction de la production de composés inhibiteurs. L'explosion à la vapeur (16 bar, 2,5 min) de bois de peuplier imprégné par du H₂SO₄ 0,1 N permet de récupérer 90 % du glucose potentiel et 60 % des pentoses [3]. Les pertes de matières sèches, souvent dues à l'évaporation de produits volatils lors la décompression, ne dépassent pas 10 % (furfural et acide acétique essentiellement). L'explosion à la vapeur en présence de SO₂ (gazeux) permettrait une meilleure pénétration du réactif au sein de la matrice lignocellulosique et serait un des rares prétraitements efficaces sur les bois de résineux. Cependant, il peut se produire des pertes de réactif et la toxicité ainsi que la volatilité du SO₂ peuvent rendre son utilisation industrielle délicate. Outre son efficacité, notamment en conditions acides, l'explosion à la vapeur présente, comme autres avantages, une demande en énergie limitée, de faibles quantités de rejets générés, une simplicité de mise en œuvre en *batch*, une faible consommation de réactifs chimiques et une bonne adaptation aux particules de grande taille (copeaux de bois).

d. Procédé AFEX (Ammonia Fiber Explosion)

Dans le procédé AFEX, la matière lignocellulosique est mise en contact avec de l'ammoniac liquide à haute température et sous pression. La pression est ensuite brutalement réduite afin d'exploser le substrat et d'évaporer l'ammoniac. C'est une variante de l'explosion à la

vapeur, mais la température y est plus faible (50 à 90 °C) et le temps de séjour plus long (typiquement 30 min). Il n'y a pas de formation de produits inhibiteurs. Les hémicelluloses sont peu solubilisées. Ce type de prétraitement est peu efficace sur les substrats ligneux et serait plus adapté aux plantes herbacées. Les concentrations élevées d'ammoniac (1-2 kg/kg MS) requièrent une récupération et un recyclage poussé de celui-ci pour que le procédé soit économiquement viable [4].

e. **Explosion au CO₂**

C'est une autre variante de l'explosion à la vapeur dans laquelle le CO₂ est utilisé comme réactif chimique. Le procédé a été testé avec une bonne efficacité (pression de 5,62 Mpa, 4 kg CO₂/kg MS) mais n'a jamais connu de développement [1].

C. Procédés chimiques

a. **Prétraitement à l'acide dilué**

Ce type de prétraitement est effectué de préférence en présence d'acide sulfurique ou d'acide chlorhydrique dilué en proportion de 0,5 à 3 % par rapport à la matière sèche de substrat. Deux méthodes sont utilisées : une première à température > 60 °C, continue, qui convient pour les faibles charges en matières sèches (5 à 10 %) et une seconde méthode, discontinue, réalisée à température souvent < 150 °C, utilisable pour des concentrations en matières sèches comprises entre 10 et 40 %. Plus la température est élevée, plus la perte en matières sèches est importante. Les temps de séjour sont dépendants de la température utilisée, par exemple 10 s à 200 °C en réacteur piston et 30 min à 120 °C dans des réacteurs à percolation.

Cette technique permet une hydrolyse des hémicelluloses en monomères et augmente notablement la digestibilité de la cellulose (des rendements d'hydrolyse enzymatique supérieurs à 90 % ont été obtenus dans certains cas) bien que le degré de cristallinité de la cellulose ne soit pas modifié. Une partie de la lignine serait également solubilisée. Elle est efficace sur de nombreux substrats. Son coût estimé est un peu supérieur à celui de l'explosion à la vapeur. À haute température, les sucres forment des composés furaniques inhibiteurs (furfural à partir de pentoses, hydrométhylfurfural – HMF – à partir des hexoses). Ce procédé impose un traitement de neutralisation du résidu acide à la chaux, générant du sulfate de calcium peu valorisable. Cette technique est envisagée dans un procédé NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) [5]. Dans celui-ci, la matière lignocellulosique est tout d'abord mise en contact avec de la vapeur basse pression à 100 °C. L'acide sulfurique concentré est ensuite ajouté de façon à obtenir une concentration finale de 0,5 %. Le contact avec le substrat se fait à co-courant pendant 10 min à une température de 190 °C, la teneur en solides étant de 22 %. Après refroidissement en mode flash qui permet d'enlever 60 % du furfural et de l'HMF, les phases solide et liquide sont séparées. La phase liquide est neutralisée par un excès de chaux, puis passée sur une résine échangeuse d'ions afin d'éliminer l'acide acétique issu des hémicelluloses, l'acide sulfurique et les autres produits inhibiteurs restant. Cette phase liquide est ensuite mélangée à la phase solide pour la saccharification enzymatique.

b. **Prétraitement en milieu alcalin**

Les traitements en milieu alcalin conduisent à une solubilisation quasi-totale de la lignine et d'une partie des hémicelluloses et à un gonflement des fibres de cellulose ainsi rendues

beaucoup plus accessibles aux enzymes. Le DP et l'indice de cristallinité de la cellulose sont diminués. Les conditions habituelles sont 8 à 12 % de NaOH (par rapport à la matière sèche), 80 à 120 °C, 30 à 60 min. Dans certains cas, des températures de l'ordre de 180 à 200 °C ont été utilisées. Cette technique est beaucoup plus efficace sur les résidus agricoles que sur les bois tendres très ligneux. Elle s'accompagne d'une perte importante de la matière sèche lignocellulosique (30 à 35 %) et nécessite lavage et neutralisation du résidu solide ainsi qu'un recyclage de la soude, opérations relativement onéreuses.

c. Procédé Organosolv

Issu de l'industrie papetière, le procédé Organosolv consiste à solubiliser et extraire la lignine et les hémicelluloses dans un solvant organique (en général méthanol ou éthanol). Un catalyseur acide (HCl ou H₂SO₄) est souvent ajouté quand la température utilisée est inférieure à 185 °C. Le solvant organique est ensuite extrait par évaporation puis recyclé. Le coût élevé du solvant et la nécessité de le recycler à 100 % sont des freins sérieux au développement de ce procédé. Il permet néanmoins la récupération quasi totale de la lignine qui pourrait ainsi être valorisée indépendamment. L'utilisation de fluides supercritiques à la place des solvants organiques habituels a également été proposée.

d. Procédés d'oxydation

Dans les procédés d'oxydation chimique, notamment l'ozonolyse ou l'oxydation humide, la lignine, et dans une moindre mesure, les hémicelluloses sont dégradées alors que la cellulose reste intacte. L'ozone a été testé sur des substrats comme la paille de blé, les bagasses de canne à sucre ou les bois de pin et de peuplier avec une augmentation sensible de la digestibilité enzymatique.

Les principaux avantages de ces traitements sont une délignification efficace, la limitation de la production de composés inhibiteurs et la température de réaction peu élevée pour l'ozonolyse. Dans ce dernier cas cependant, de grandes quantités d'ozone sont nécessaires, rendant le procédé trop onéreux.

e. Procédés biologiques

Des procédés de délignification mettant en œuvre des enzymes de type peroxydase ou des champignons lignolytiques tels que *Phanerochaete chrysosporium* ont été proposés [6]. Leur utilisation est pour l'instant restée limitée au stade laboratoire. Les principaux inconvénients sont le coût des enzymes lignolytiques et la lenteur des réactions.

En conclusion, le procédé de prétraitement universel et idéal n'existe pas. Les technologies *a priori* les plus attrayantes sont la thermohydrolyse, le prétraitement à l'acide dilué et l'explosion à la vapeur. La thermohydrolyse semble efficace et minimise la formation de produits de dégradation. Elle n'a cependant pas encore connu de développement à grande échelle. Le prétraitement à l'acide dilué est une option retenue par le NREL. Il améliore la digestibilité enzymatique de la cellulose, permet une bonne hydrolyse des hémicelluloses sans formation de concentration élevée de produits de dégradation des sucres. L'explosion à la vapeur, notamment après imprégnation de la matière lignocellulosique par de l'acide dilué, est également attrayante pour les mêmes raisons. Son extrapolation à grande échelle pour des procédés continus reste néanmoins problématique pour le traitement de produits

peu denses comme les pailles de céréales. Le choix du prétraitement (et des conditions opératoires) est fortement dépendant du substrat utilisé. En outre, les techniques proposées utilisent souvent des étapes de pressage et de lavage, consommatrices d'énergie et d'eau, et se doivent d'être optimisées en essayant d'intégrer au mieux tous ces flux pour des raisons économiques et environnementales évidentes.

6.1.2.2 L'hydrolyse

Du fait de la structure de la cellulose, de sa cristallinité et de son association avec la lignine et les hémicelluloses encore présents, même après l'étape de prétraitement, son hydrolyse en monomères fermentescibles (glucose) est une opération difficile qui peut être réalisée par deux méthodes : hydrolyse chimique catalysée par un acide ou hydrolyse enzymatique.

A. L'hydrolyse chimique

L'hydrolyse par acide dilué ne nécessite en général pas d'autre prétraitement qu'un conditionnement [2]. Elle a lieu en deux étapes afin d'optimiser la libération des sucres des hémicelluloses, d'une part, de la cellulose, d'autre part. La première étape est semblable au prétraitement par acide dilué et permet de digérer les hémicelluloses et de solubiliser les sucres qui en sont issus. Après séparation, la fraction solide est soumise à une nouvelle hydrolyse. Des étapes de neutralisation et de précipitation du sel formé sont nécessaires. Différents types de réacteurs peuvent être utilisés, à percolation, à co-courant ou piston. Le NREL a décrit les conditions d'utilisations suivantes : 3 minutes à 190 °C en présence de 0,7 % d'acide sulfurique pour la première étape, 3 minutes à 215 °C en présence de 0,4 % d'acide sulfurique pour la seconde. Les rendements d'hydrolyse sont de 89 % pour le mannose, 82 % pour le galactose et 50 % pour le glucose. Ce procédé a été développé en coopération avec BCI (BC International Corporation). Dans certains cas, les conditions de la seconde étape sont plus sévères : 240 °C à 2 % d'acide sulfurique. Une technologie d'hydrolyse flash (< 2 s, 260-280 °C, 0,5-1 % d'H₂SO₄) mise au point par le CIEMAT (Centre de Recherche sur l'Énergie, l'Environnement et la Technologie du Ministère de la Recherche Espagnol) conduirait à des taux de récupération de glucose supérieurs (70-80 %).

L'hydrolyse par de l'acide concentré est généralement plus efficace quand elle combine deux étapes : une première étape de décrystallisation de la cellulose rendue complètement amorphe par rupture des liaisons hydrogène interchaînes, une seconde étape d'hydrolyse par de l'acide dilué [7]. Dans certains cas, une étape préliminaire de prétraitement par de l'acide dilué est effectuée afin de séparer les hémicelluloses avant la décrystallisation.

Ces procédés d'hydrolyse ont été développés aux États-Unis par Arkenol et le *Masada Resource Group* en vue de la production d'éthanol à partir de matière première lignocellulosique. Dans le procédé Arkenol, la décrystallisation de la cellulose est obtenue par l'addition d'acide sulfurique à 70-77 % au substrat qui a été séché jusqu'à 10 % d'humidité. L'acide est ajouté de façon à obtenir un ratio acide/(cellulose + hémicelluloses) égal à 1,25 tout en maintenant la température inférieure à 50 °C. De l'eau est ensuite ajoutée pour diluer l'acide à 20-30 % et l'ensemble est chauffé à 100 °C pendant 1 heure. Après pressage, les solides résiduels sont soumis à une deuxième hydrolyse et les sucres et l'acide de la fraction soluble sont séparés dans une colonne de chromatographie. Les sucres seraient

récupérés à 98 % et la perte en acide dans le jus sucré est inférieure à 3 %. Le recyclage poussé de l'acide est une condition indispensable pour que ce procédé soit économiquement viable. Par ailleurs, l'utilisation d'acide concentré requiert des réacteurs résistant à la corrosion.

B. L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse de la cellulose par des enzymes est souvent la voie préconisée pour l'obtention des sucres fermentescibles pour les raisons suivantes :

- les résultats de la plupart des évaluations économiques sont en faveur de l'hydrolyse enzymatique comparée à l'hydrolyse chimique,
- elle génère peu d'effluents à traiter et pas de problèmes de corrosion,
- elle présente des perspectives d'amélioration beaucoup plus grandes que l'hydrolyse chimique qui a fait l'objet de travaux depuis plusieurs dizaines d'années.

Dans la nature, la biodégradation de la cellulose est essentiellement réalisée par des micro-organismes (eubactéries et champignons) et elle a lieu aussi bien en aérobiose (par exemple à la surface du sol) qu'en anaérobiose (par exemple dans le rumen animal) [8]. Parmi les bactéries cellulolytiques figurent des bactéries appartenant aux genres *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Streptomyces*. Bien que certaines bactéries comme *Clostridium thermocellum* produisent des cellulases ayant une activité spécifique (vitesse d'hydrolyse par unité massique de protéines) élevée, leurs capacités de production et leurs taux de croissance sont trop faibles pour envisager leur utilisation au stade industriel. Les champignons cellulolytiques appartiennent à différents genres : *Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, *Trichoderma*...

Parmi ceux-ci, *Trichoderma reesei* a probablement été l'espèce la plus étudiée pour la production de cellulases [8]. En effet, elle est capable de sécréter des concentrations importantes de cellulases très actives et elle a fait l'objet d'utilisation industrielle. De plus, outre des cellulases, *T. reesei* produit des hémicellulases qui participent au processus d'hydrolyse des parois végétales. Du point de vue du procédé, il est nécessaire, dans un premier temps, de récupérer les enzymes produites par ce champignon dans le milieu de culture et éventuellement de les conditionner avant leur mise en œuvre en hydrolyse. Celle-ci s'effectue par simple mise en contact du matériau prétraité avec la solution enzymatique en assurant l'homogénéité de la suspension et en maintenant les conditions optimales qui sont, pour les cellulases de *T. reesei*, une température de 45-50 °C et un pH de 4,8. Le temps d'action est fonction de la quantité d'enzymes ajoutée et de leur activité. Pendant l'hydrolyse enzymatique, les sucres réducteurs sont essentiellement libérés sous forme de glucose. Le coût des utilités spécifiques à l'hydrolyse enzymatique est faible. À l'heure actuelle, le recyclage des enzymes est rarement envisagé car celles-ci restent adsorbées en partie sur le résidu solide riche en lignine. Le coût des cellulases est relativement élevé et ce poste est souvent estimé être le plus onéreux dans la production d'éthanol à partir des matériaux lignocellulosiques. De ce fait, de gros efforts sont consacrés à la connaissance du mécanisme de la cellulolyse enzymatique en vue de son amélioration. En effet, il s'agit d'un processus complexe d'action de protéines solubles sur un substrat insoluble et récalcitrant et dont la compréhension reste incomplète.

6.1.2.3 La production des enzymes et leur mode d'action

A. Cellulases et cellulolyse

a. Les systèmes enzymatiques

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose, appelées communément cellulases, sont soit sécrétées dans le milieu (cas essentiellement des champignons), soit associées à la surface externe des micro-organismes formant des systèmes complexes appelés cellulosomes (cas des bactéries anaérobies).

Les cellulases ont d'abord été classées selon leur mode d'action catalytique. Elles sont maintenant aussi classées selon leur structure, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres [9]. Il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose :

- les endoglucanases (EG) ou 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4)¹ qui coupent la cellulose aléatoirement au niveau des zones amorphes de la cellulose, générant de nouvelles extrémités de chaînes,
- les exoglucanases, comprenant les 1,4- β -glucane glucanohydrolases (EC 3.2.1.74) ou cellodextrinases et les 1,4- β -glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBH), qui agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose, libérant du glucose pour les glucanohydrolases ou du cellobiose pour les cellobiohydrolases,
- les β -glucosidases ou β -glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21) qui hydrolysent les cellodextrines solubles et le cellobiose en glucose.

Les systèmes cellulolytiques sont des systèmes multi-enzymatiques possédant ces trois types d'action, étant ainsi capables de dégrader totalement la cellulose (fig. 6.4).

La plupart des cellulases ont une structure modulaire comprenant plusieurs domaines structuraux et fonctionnels. Le modèle « domaine catalytique – domaine d'accrochage à la cellulose » (ou CBM pour *carbohydrate binding module*) est le plus souvent rencontré pour les systèmes excrétés (fig. 6.5). L'organisation des cellulosomes est particulière avec l'existence des domaines dockerine ou fibronectine III qui se lient à des domaines cohésine de la protéine charpente (*scaffoldine*) (fig. 6.6) [10]. Les CBM facilitent l'hydrolyse de la cellulose en assurant l'ancrage du site catalytique sur le substrat. Leur rôle est particulièrement important pour l'initiation de l'action des cellobiohydrolases et leur processivité. Ils sont localisés aux extrémités de la protéine. Les CBM interviendraient aussi dans la déstructuration des fibrilles de cellulose. Ils sont souvent uniformes avec une face hydrophile et une face hydrophobe. Il existe également un bras de liaison entre le site catalytique et le CBM constitué de fragments fortement glycosylés pour les cellulases fongiques et particulièrement riches en certains acides aminés comme la proline, la thréonine et la sérine.

Les sites catalytiques ont une configuration en crevasse pour les endoglucanases et en tunnel pour les exoglucanases afin de permettre le déplacement de l'enzyme le long de la chaîne de cellulose. Les micro-organismes cellulolytiques possèdent plusieurs enzymes cellulolytiques de type endo et exo afin de pouvoir agir sur les zones amorphes et cristallines, d'être

1. Classification internationale des enzymes.

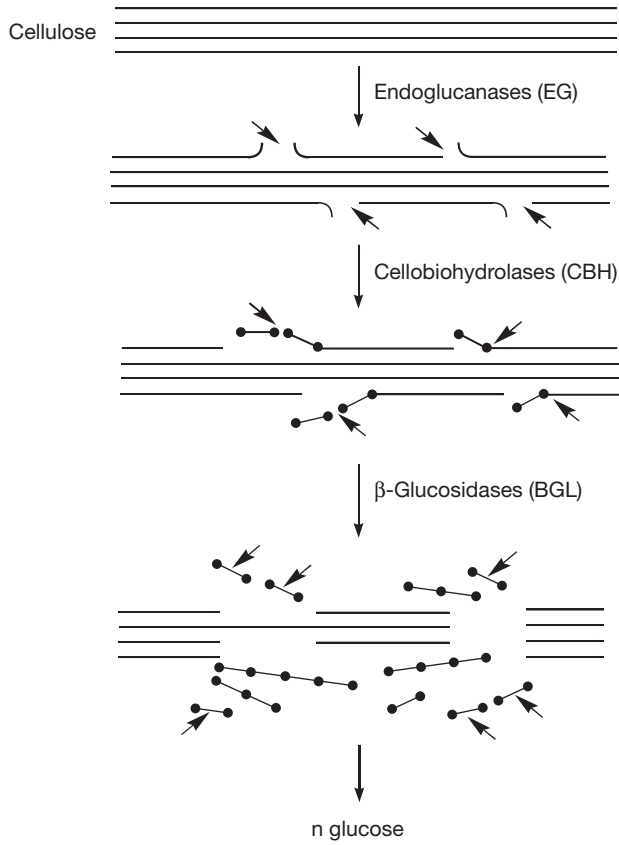


Figure 6.4

Mode d'action des cellulases sur les fibrilles de cellulose.

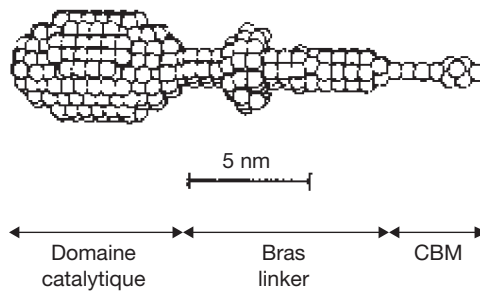


Figure 6.5

Organisation structurale et fonctionnelle d'une cellulase fongique, la CBHI de *Trichoderma reesei* (d'après [11]).

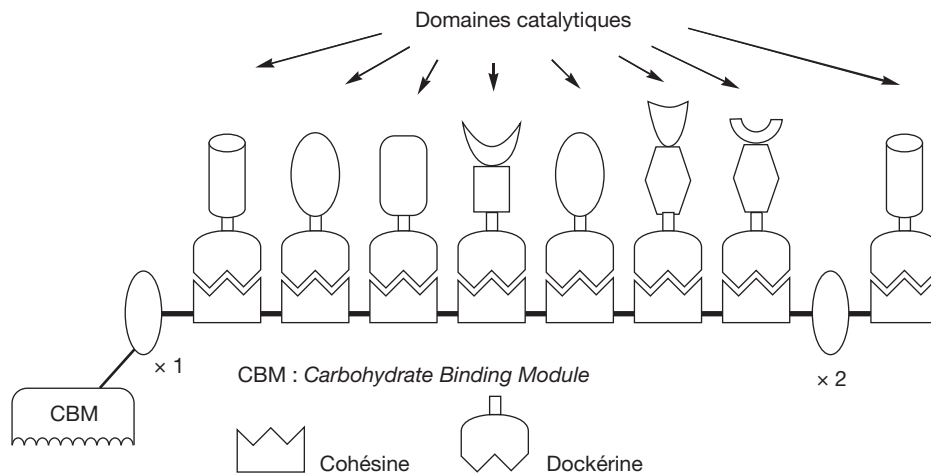


Figure 6.6
Structure du cellulosome de *Clostridium cellulolyticum*.

actifs envers des substrats divers et de s'adapter aux changements qui adviennent à la chaîne de cellulose au cours de sa dégradation.

Ainsi, le complexe cellulolytique sécrété par *Trichoderma reesei* contient notamment deux CBH, cinq endoglucanases et deux β -glucosidases (tableau 6.3). Les neuf enzymes appartiennent à huit classes structurales différentes. La même diversité est rencontrée chez les hémicellulases de *T. reesei*. Une étude génomique récente fait état de l'existence, chez *T. reesei*, d'un mélange d'activités de dégradation de la biomasse beaucoup plus complexe et qui comprendrait 2 cellobiohydrolases, 8 endoglucanases, 7 β -glucosidases, 4 xylanases, 1 β -xylosidase, 2 acétylxylane estérases, 2 arabinofuranosidases, 1 β -mannanase, 5 galactosidases, une swollénine et deux protéines de fonction inconnue. Si l'on se réfère aux cellulases connues (tableau 6.3), on constate que les CBH représentent à elles seules 80 % (en poids) du cocktail enzymatique de *T. reesei* alors que les β -glucosidases sont sous-représentées. Un tel déséquilibre apparent peut en fait refléter une optimisation du processus d'hydrolyse enzymatique, la faiblesse de certaines activités enzymatiques spécifiques pouvant être compensée par la forte proportion de celles-ci dans le mélange enzymatique produit. Il est cependant souvent avancé que le faible taux de β -glucosidases est une des principales lacunes des cellulases de *T. reesei*, tout au moins pour une saccharification *in vitro*, et ce, d'autant plus que les β -glucosidases de *T. reesei* sont inhibées par le glucose, ce qui n'est pas le cas d'autres β -glucosidases comme celles d'*Aspergillus*.

b. Synergie des activités cellulolytiques

Outre la complémentarité de leurs actions pour réaliser une hydrolyse totale de la cellulose, les cellulases présentent de fortes synergies, c'est-à-dire que leur activité lors d'une mise en œuvre en commun est supérieure à la somme de leurs activités individuelles. Quatre formes de synergie ont été décrites : une synergie endo-exo entre endoglucanases et exoglucanases ;

Tableau 6.3 Quelques caractéristiques des cellulases connues de *T. reesei*.

Enzyme	Mw ^a (kDa)	Nb AA ^b	% (w/w) ^c	Domaines ^d	pI ^e	Mécanisme réactionnel ^f	Spécificité	K _M ^g (μM)
CBH1/Cel7A	65	513	60	CM + CBM	4,65	Conservation	Extrémité réductrice cellulosique	48 (méthyl β-D-cellobiotraoside)
CBH2/Cel6A	58	471	20	CM + CBM	5,11	Inversion	Extrémité non réductrice	4 (méthyl β-D-cellobiotraoside)
EG1/Cel7B	55	459		CM + CBM	4,71	Conservation	Zones amorphes cellulosique	113 (cellobiotraose)
EG2/Cel5A	44*	418		CM + CBM	4,97	Conservation	idem	356 (cellobiotraose)
EG3/Cel12A	25	234	10 à 20	CM	6,69	Conservation	idem	230 (cellobiotraose)
EG4/Cel61A	35*	344		CM+CBM	5,29	Inconnu	idem	ND
EG5/Cel45A	23	242		CM + CBM	4,21	Inversion	idem	ND
BGL1/Cel3A	80	744	1		6,38		cellobiose	1 250 (cellobiose)
BGL2/Cel1A	52*	466			5,33		cellobiose	

^a Masse moléculaire (* = Mw théorique).

^b Nombre d'acides aminés.

^c Pourcentage en masse par rapport aux cellulases totales.

^d CM : « Catalytic module » ; CBM : « Cellulose Binding module ».

^e Point isoélectrique théorique

^f Conservation ou Inversion de l'anomérite.

^g Constante de Michaelis (substrat précisé entre parenthèses).

ND : non déterminé.

une synergie exo-exo entre exoglucanases agissant aux extrémités réductrices des chaînes de cellulose et celles agissant aux extrémités non-réductrices ; une synergie entre les exoglucanases et les β -glucosidases qui hydrolysent le cellobiose, produit final inhibiteur des cellohydrolases et une synergie intramoléculaire entre domaines catalytiques et CBM.

Dans le cas des cellulases, les mesures d'activité sont délicates du fait de la diversité des substrats utilisables. Des celluloses cristallines pures sont disponibles (coton, papier fibre, Avicel) mais elles sont souvent physiquement hétérogènes et ne peuvent être utilisées que pour évaluer l'activité d'un système cellulolytique complet. L'activité papier filtre (ou UPF), exprimée en vitesse d'apparition des sucres réducteurs, est souvent utilisée. Les celluloses amorphes ou solubles telles que les carboxyméthylcelluloses (CMC) sont également souvent employées mais elles ne reflètent pas les activités des exoglucanases. Les oligomères de faible poids moléculaire telles que les cellodextrines, solubles, peuvent également être utilisés. Les substrats chromogènes ou fluorogènes comme le *p*-nitrophényl- β -D-cellobioside dans lesquels des composés colorés ou fluorescents sont liés au carbone anomérique du glucose sont pratiques pour des études d'activités particulières.

B. Synthèse des cellulases

a. Génétique

Chez *T. reesei*, comme chez la plupart des autres champignons, les gènes codant pour les cellulases sont répartis au hasard dans le génome, chaque gène possédant ses propres éléments de régulation. Il est par contre notable que les promoteurs des gènes *cbh1*, *cbh2*, *eg1* et *eg2*, qui codent pour les enzymes CBHI, CBH2, EGI, EGII, ont des sites de fixation à des protéines régulatrices identiques. Les gènes bactériens des cellulases sont chromosomiques et groupés en cluster chez *C. cellulolyticum* ou répartis sur le génome chez *C. thermocellum*.

b. Régulation

La synthèse de protéines par les organismes vivants est soumise à des mécanismes de régulation. Chez *T. reesei*, la production des cellulases est régulée par des processus d'induction et de répression, induction liée à la présence de substrats, en l'occurrence la cellulose, répression par les sources de carbone facilement assimilables telles que le glucose *via* des mécanismes de répression catabolique [12]. En réalité, l'induction n'est pas occasionnée par la cellulose elle-même qui ne peut entrer dans la cellule mais par des produits solubles résultant de son hydrolyse comme les cellodextrines et le cellobiose. Pour ce faire, il y a donc une expression constitutive, mais de faible niveau, de cellulases, même en l'absence de cellulose, qui sont ensuite produites en quantité abondante en présence de produits de dégradation. En réalité, les mécanismes d'induction semblent compliqués. Ainsi le sophorose, dimère de molécules de glucoses unies par des liaisons β -1-2 qui peut être produit par une transglycosylation catalysée par une β -glucosidase, est un inducteur très puissant. D'autre part, le rôle inducteur du cellobiose est complexe puisqu'il inhibe les cellulases. Les hémicellulases sont également des enzymes inductibles. La production des cellulases de *T. reesei* est régulée au niveau transcriptionnel, c'est-à-dire au niveau du passage de l'ADN à l'ARNm, par l'intermédiaire de facteurs de transcription (ACEI et ACEII) qui se lient à l'ADN au niveau des promoteurs. Cette expression est coordonnée pour les gènes *cbh1*, *cbh2*, *eg1*, *eg2* et *eg5* car ce sont les mêmes facteurs de transcription qui interviennent. Par

contre, les mécanismes par lesquels le sophorose et les autres régulateurs (inducteurs et répresseurs) stimulent l'expression de ces facteurs ne sont pas élucidés.

La répression catabolique s'effectue aussi au niveau transcriptionnel chez *T. reesei*, via la protéine CRE1. La synthèse de CRE1 est réprimée en présence de glucose. Des souches de *T. reesei* insensibles à la répression catabolique ont été obtenues par les techniques classiques de mutagenèse, par exemple les souches RUT C30 de Rutgers ou CL 847 de la société Cayla.

c. Production en réacteur

Les mécanismes complexes de régulation de la synthèse de cellulases nécessitent des mises en œuvre particulières pour leur production en réacteur. L'emploi de souches non sensibles à la répression catabolique et de substrats inducteurs solubles et utilisables à grande échelle comme le lactose a permis d'obtenir des productions importantes : $40 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ de protéines extracellulaires par *T. reesei* CL847 selon un procédé développé par l'IFP [13]. Dans ce procédé, la fermentation se déroule en deux phases, une première phase en *batch* de production de cellules de *T. reesei*, une seconde phase d'alimentation en *fed-batch* de l'inducteur (lactose) à une vitesse évitant son accumulation dans le milieu (fig. 6.7). Des productions de cellulases supérieures à 20 000 unités papier filtre (UPF) par litre de fermenteur ont été obtenues dans des réacteurs de 30 m^3 en 150 heures de fermentation.

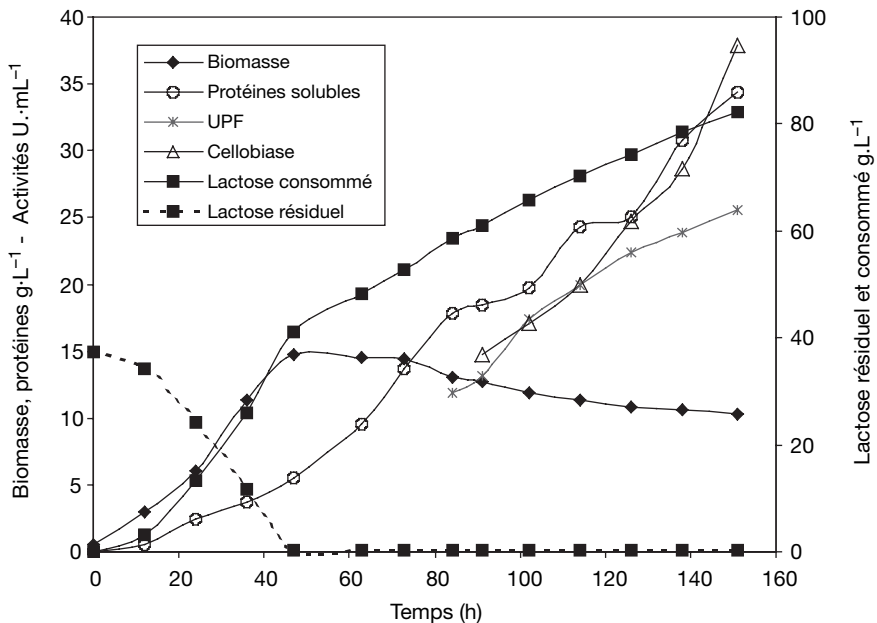


Figure 6.7

Cinétique de production de cellulases par *Trichoderma reesei* CL847 par fermentation sur lactose (*batch* pendant 40 heures suivi d'un *fed-batch*).

UPF = Unités papier filtre ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$).

d. Voies d'amélioration

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'hydrolyse enzymatique est onéreuse, notamment du fait du coût des enzymes. À l'heure actuelle, des quantités de cellulases de l'ordre de 10 à 15 UPF/g de cellulose permettent une hydrolyse efficace de substrats prétraités. Cependant, les temps d'hydrolyse sont relativement longs (48 à 72 h). Les efforts actuels visent à diminuer le coût de production des cellulases et à augmenter leur activité spécifique. Concernant la production, celle-ci est déjà importante (supérieure à 40 g. l⁻¹ de protéines extracellulaires) et les progrès concerneraient surtout les productivités ou les coûts liés à la fermentation. De gros moyens sont consacrés à l'amélioration des activités cellulolytiques, notamment à la surexpression de β -glucosidases souvent limitantes, à l'obtention de cellulases plus actives par *protein engineering* ou par évolution dirigée (méthodes combinatoires), à la levée de l'inhibition par le cellobiose et le glucose, à l'obtention de cellulases plus actives et/ou plus stables à haute température, et à la recherche d'autres cellulases (mise à profit de la biodiversité). Selon le NREL, le coût de l'hydrolyse enzymatique serait de 0,12 \$/L éthanol [5], mais selon des communiqués de presse, il aurait été diminué d'un facteur 10, voire 20 suite aux résultats obtenus par Genencor International et Novozymes, les deux plus grosses sociétés productrices d'enzymes industrielles, qui bénéficient de financements importants, émanant de l'US DOE et de l'USDA, depuis 2000 sur ce sujet. Les voies ayant conduit à ces progrès ne sont pas encore connues.

C. Les autres enzymes de dégradation des matières lignocellulosiques

a. Les hémicellulases

En fonction du mode de prétraitement et de son efficacité sur l'hydrolyse et la solubilisation des hémicelluloses, il pourra s'avérer utile de mettre en œuvre des cocktails enzymatiques contenant des hémicellulases. Celles-ci sont aussi variées que le sont leurs substrats : endo- et exo-xylanases, β -xylosidases, α -arabino-furanosidases, α -glucuronidases, acétyl xylane estérases, mannanases, galactosidases. Ces activités sont souvent présentes dans les mélanges enzymatiques des micro-organismes cellulolytiques tels que *T. reesei*. D'autres enzymes comme des férulate estérases ou des *p*-coumarate estérases sont des activités auxiliaires requises pour attaquer certaines liaisons ester présentes dans les xylanes ou impliquées dans les interactions lignine-hémicelluloses, plus précisément entre les résidus arabinose des chaînes latérales des hémicelluloses et les acides phénoliques de la lignine. Quoique plus hétérogènes que la cellulose, les hémicelluloses sont plus facilement hydrolysées que la cellulose car elles ne forment pas de structures compactes cristallines.

b. Les ligninases

Les autres enzymes qui peuvent être intéressantes sont les ligninases. Celles-ci sont classées en trois catégories : les lignines peroxydases, les peroxydases Mn-dépendantes et les laccases (monophénol oxydases). Elles sont produites essentiellement par des champignons comme les basidiomycètes de la pourriture blanche, et par quelques actinomycètes. Parmi les principaux champignons lignolytiques, on peut citer *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Coriolus versicolor*. De la même façon que les hémicellulases, les ligninases peuvent améliorer le rendement d'hydrolyse de la cellulose dans le cas de certaines matières lignocellulosiques et de certains prétraitements. Leur ajout

dans le mélange nécessaire à l'hydrolyse enzymatique pourrait également avoir un impact sur les conditions ou le mode de prétraitement.

6.1.2.4 La fermentation éthanolique

Une fois la cellulose hydrolysée en glucose, celui-ci est fermenté de la même façon que le glucose issu de l'amidon. Il demeure des problèmes spécifiques à l'utilisation de matériaux lignocellulosiques comme substrat initial tels que la fermentation des pentoses en éthanol, la présence de composés toxiques et inhibiteurs issus des hémicelluloses et de la lignine, la possibilité d'effectuer l'hydrolyse enzymatique et la fermentation en une seule étape.

A. La fermentation éthanolique des pentoses

a. Levures

Alors que *Saccharomyces cerevisiae*, la traditionnelle levure de boulangerie dont certaines souches sont utilisées industriellement pour la fermentation alcoolique, ne peut utiliser le xylose comme source de carbone, d'autres espèces de levures peuvent convertir le xylose en éthanol [14]. Les espèces les plus efficaces sont *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus*. Cependant ces levures présentent de nombreux points faibles : performances fermentaires sensiblement inférieures à celles de *S. cerevisiae* sur glucose (tableau 6.4), inhibition par l'éthanol à partir de concentrations de l'ordre de 3 à 5 % (poids/poids), forte sensibilité aux inhibiteurs présents dans les hydrolysats tels que l'acide acétique. Ces limitations et contraintes constituent des barrières à leur utilisation industrielle. Elles ont néanmoins été abondamment étudiées pour leurs potentialités et pour caractériser leurs voies d'utilisation du xylose dans la perspective d'utiliser leurs gènes pour la construction de nouvelles souches de *S. cerevisiae* capables d'utiliser ce sucre.

b. Bactéries

Le xylose est convertible en éthanol par plusieurs espèces de bactéries thermophiles comme *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* ou par des souches modifiées de *Bacillus stearothermophilus* [2]. Ces souches ont été testées expérimentalement soit seules, soit en co-culture avec *Clostridium thermocellum*, mais leur utilisation se heurte à de nombreuses limitations : un faible rendement en éthanol, la production de coproduits (acétate), le besoin en facteurs de croissance, la forte sensibilité aux inhibiteurs et la faible tolérance à l'éthanol. Des bactéries mésophiles comme *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca* ou *K. planticola* sont également capables de fermenter les pentoses. De bonnes productions d'éthanol ont été obtenues avec des souches d'*E. coli* chez lesquelles les gènes *pdh* (pyruvate dicarboxylase) et *adh* (alcool déshydrogénase) de *Zymomonas mobilis* ont été introduits (par exemple la souche K011). Les restrictions à l'utilisation de ces souches comme la production d'acides organiques, les besoins nutritionnels (vitamines et facteurs de croissance) et la forte sensibilité aux inhibiteurs présents dans les hydrolysats et aux teneurs élevées en éthanol sont des points qui ont été travaillés. Des améliorations notables ont été obtenues pour certains d'entre eux : forte expression des gènes *pdh* et *adh* pour orienter le flux de carbone vers la production d'éthanol, obtention de mutants résistants à l'éthanol, délétion du gène de la fumarate réductase à l'origine de la formation de succinate, conduite

Tableau 6.4 Production d'éthanol à partir de xylose.

Souche	Rendement (g produit/g xylose)		Productivité (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Référence
	Éthanol	Xylitol		
<i>Candida shehatae</i>				
ATCC 22984	0,39		0,56	Wayman et Pareekh, 1985 [15]
NRRL Y 12856	0,45		0,29	Slininger <i>et al.</i> , 1985 [16]
<i>Pachysolen tannophilus</i>				
RL 171	0,28		0,28	Woods et Millis, 1985 [17]
NRRL Y 2460	0,25		0,13	Slininger <i>et al.</i> , 1985 [18]
<i>Pichia stipitis</i>				
CBS 5776	0,45		0,34	Tran et Chambers, 1986 [19]
NRRL Y 7124	0,43		0,18	Linko <i>et al.</i> , 1986 [20]
FPL-Shi-21 ^a	0,46	0	0,13	Shi <i>et al.</i> , 1999 [21]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
TMB 3001 ^b	0,31	0,29	0,20	Jeppsson <i>et al.</i> , 2002 [22]
TMB 3255 ^c	0,41	0,05	0,04	Jeppsson <i>et al.</i> , 2002 [22]
H158 - pXks ^b	0,20	0,03	0,03	Johansson <i>et al.</i> , 2001 [23]
1400 (pLNH32) ^b	0,30	0,08	0,33	Ho <i>et al.</i> , 1998 [24]
H2684 ^d	0,31	0,35		Verho <i>et al.</i> , 2003 [25]
FPL-YSX3P ^c	0,29	0,46	0,11	Jin <i>et al.</i> , 2002 [26]
<i>E. coli</i>				
K011 ^a	0,53		1,3	Ohta <i>et al.</i> , 1991 [27]
FBR05 ^a	0,43			^e
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1 ^a	0,48		2	Ohta <i>et al.</i> , 1991 [29]
<i>Zymomonas mobilis</i> 8b ^a	0,47			^e

^a Souche mutée.

^b Souche recombinée possédant les gènes *XYL1*, *XYL2* et *XKS1* (voir texte).

^c Souche recombinée identique à ^b, + mutation du gène de la glucose-6-P-déshydrogénase.

^d Souche recombinée identique à ^c, + surexpression du gène de la glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase.

^e [28].

de fermentation en milieux non stériles. Des productivités supérieures à 1 g.l⁻¹.h⁻¹ ont été obtenues sur des hydrolysats réels avec des rendements compris entre 80 à 92 % du rendement théorique en éthanol mais avec des productions faibles en éthanol, de 27 à 35 g.l⁻¹.

Des souches modifiées de *Klebsiella oxytoca* et *planticola* ont également été construites par transfert des mêmes gènes (*pdg* et *adh*) et de bonnes performances ont été obtenues (46 g.l⁻¹ d'éthanol avec un rendement de 0,48 g.g⁻¹ xylose et une productivité de 2 g.l⁻¹.h⁻¹). *Klebsiella oxytoca* présente l'avantage d'être capable d'utiliser un large spectre de

substrats : des disaccharides tels que le cellobiose, des trisaccharides et tétrasaccharides. Cependant, l'utilisation de souches du genre *Klebsiella* se heurte à l'existence de nombreuses souches pathogènes au sein de ce genre et à la mauvaise perception qui en résulte.

Enfin, des souches de *Zymomonas mobilis*, bactérie connue pour ses bonnes performances en fermentation éthanolique, ont été rendues capables d'utiliser le xylose après clonage des gènes d'*E. coli* codant pour la xylose isomérase, la xylulokinase, la transcétolase et la transaldolase qui interviennent dans le métabolisme des pentoses (paragr. B). La souche recombinante CP4 (p285) obtenue donne de bonnes performances : 88 % du rendement théorique et une productivité de $1,04 \text{ g}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ sur hydrolysats de tige de maïs. Les propriétés propres à *Z. mobilis* comme la bonne tolérance à l'éthanol et aux inhibiteurs font de ces souches modifiées des micro-organismes de fort intérêt qui ont été retenues par le NREL dans certains de leurs schémas de procédé de production d'éthanol. Notons enfin que des souches capables d'utiliser l'arabinose ont également été construites par modification génétique, notamment *Z. mobilis* 206c (p28301) contenant plusieurs plasmides portant les gènes codant pour l'utilisation du xylose et de l'arabinose.

B. La construction génétique de nouvelles souches de *Saccharomyces*

Compte tenu des avantages liés à l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae*, de nombreux travaux ont été, et sont toujours consacrés à l'obtention de souches de *S. cerevisiae* capables de convertir xylose et arabinose en éthanol [14]. Il existe une voie d'utilisation des sucres en C5 chez *S. cerevisiae* qui la rend capable d'assimiler le xylulose, c'est la voie des pentoses phosphates ou PPP (pour *Pentose Phosphate Pathway*) décrite dans la figure 6.8 avec ses connections avec la glycolyse qui est la voie classique d'utilisation de sucres comme le glucose [30].

Les premiers essais d'insertion du gène de la xylose isomérase (XI) chez *S. cerevisiae* se sont révélés infructueux, échec d'abord attribué à l'origine bactérienne (*E. coli*, *Bacillus subtilis*) de ce gène et à un repliement inapproprié de la protéine au sein de la levure. La production hétérologue de XI bactérienne active a cependant pu être récemment obtenue en utilisant la xylose isomérase de *Thermus thermophilus*. Les problèmes liés, d'une part, aux différences de température optimale entre *T. thermophilus* et *S. cerevisiae* et, d'autre part, à l'inhibition par l'éthanol ont été amoindris en modifiant le gène de la xylose isomérase par évolution dirigée. Très récemment, un gène de XI d'origine fongique a été trouvé et a été introduit avec succès chez *S. cerevisiae*. Cependant, il est possible que des limitations d'ordre énergétique apparaissent.

L'introduction des gènes de la levure *Pichia stipitis* codant pour la xylose réductase (XR) et la xylitol déshydrogénase (XDH) chez *S. cerevisiae* ont permis une croissance sur xylose. Cependant, la production d'éthanol est faible et il y a accumulation de xylitol. Cette accumulation de xylitol s'explique en partie par un déséquilibre en cofacteurs nécessaires pour chacune de ces deux premières réactions (NADPH/NAD⁺). Cette différence de besoin en cofacteur abaisserait le rendement maximum en éthanol à partir de xylose de $0,51 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ à $0,46 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. L'augmentation relative de l'activité XDH par rapport à celle de la XR permet de diminuer l'accumulation de xylitol et d'augmenter la production d'éthanol qui reste néanmoins faible. La phosphorylation du xylulose est en fait une étape clef du métabolisme du xylose par la voie des pentose-phosphates et il est nécessaire de surexprimer le gène de la

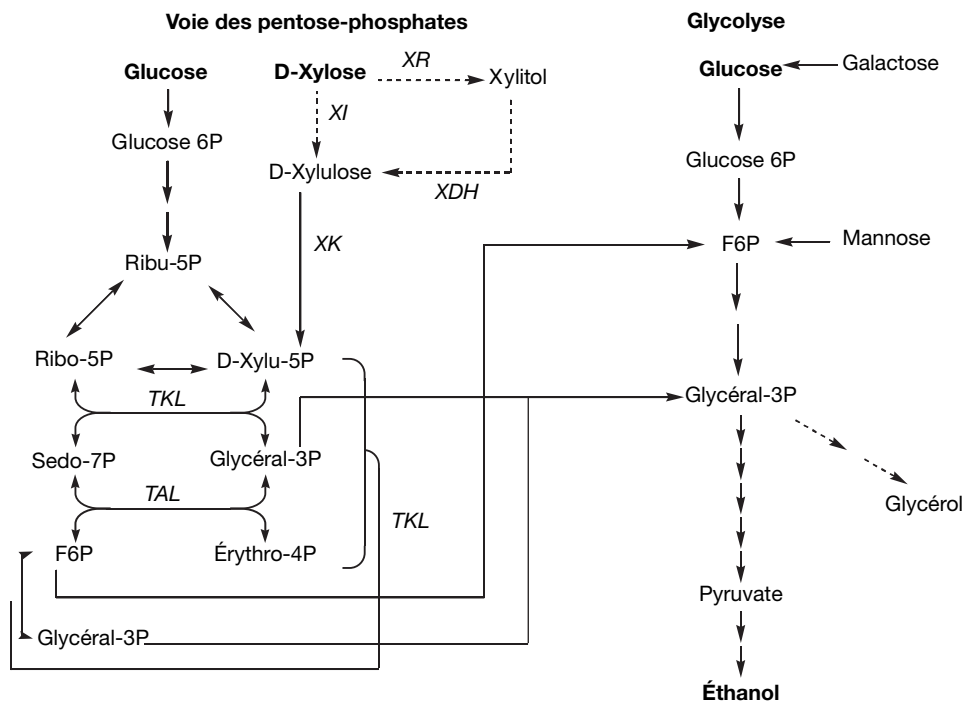


Figure 6.8

Voies métaboliques de production d'éthanol à partir de glucose et de xylose (adapté de Zaldivar *et al.*, 2002 [31]).

Ribu-5-P = ribulose-5-phosphate ; Ribo-5-P = ribose-5-phosphate ; D-Xylu-5-P = xylulose-5-phosphate ; Sedo-7-P = sédoheptulose-5-phosphate ; Glycéral 3P = glycéraldéhyde-3-phosphate ; F6P = fructose-6-phosphate ; Erythro 4P = Erythro-4-phosphate ; XR = xylose réductase ; XI = Xylose isomérase ; XDH = xylitol déshydrogénase ; XK = xylulose kinase ; TKL = transcétolase ; TAL = transaldolase.

xylulokinase pour favoriser l'utilisation du xylitol et corollairement du xylose. Les meilleures performances ont ainsi été obtenues à l'aide d'une souche de *Saccharomyces* (*Saccharomyces* sp. 1 400 pLNH33) obtenue par fusion de *S. diastaticus* et de *S. uvarum*, qui contient les gènes de la XR et de la XDH de *P. stipitis* et chez laquelle la xylulokinase de *S. cerevisiae* est surexprimée. Une production d'éthanol de 50 g.l⁻¹ a été obtenue en 36 h à partir d'un mélange contenant 53 g.l⁻¹ de glucose et 56 g.l⁻¹ de xylose. Une souche industrielle de *S. cerevisiae* similaire a été développée mais elle présente de moins bonnes performances. En fait, la surexpression de la xylulokinase diminue la vitesse d'utilisation du xylose, notamment en anaérobiose, probablement par un épuisement en ATP intracellulaire (forme d'énergie assimilable). La surexpression d'enzymes intervenant dans la PPP comme la transaldolase a également été pratiquée. Une des principales difficultés à résoudre est d'obtenir des souches capables de croître sur xylose en anaérobiose. Or, les souches obte-

nues jusqu'à présent sont capables de convertir le xylose en éthanol en anaérobiose mais elles nécessitent de l'oxygène pour croître sur xylose. Un autre point concerne le transport de xylose à l'intérieur de la cellule qui fait intervenir des transporteurs de nature protéique identiques à ceux utilisés pour le transport du glucose. Il y a alors compétition pour ces deux substrats avec une affinité préférentielle pour le glucose.

Le tableau 6.5. rassemble quelques-uns des principaux résultats obtenus avec des souches de levures modifiées pour assimiler les pentoses. En dépit du nombre des résultats obtenus, il apparaît que la construction de souches de levures génétiquement modifiées capables de convertir efficacement le xylose et l'arabinose en éthanol est un objectif difficile car il requiert de modifier les flux métaboliques de la levure et ses équilibres redox et énergétiques. Les principales avancées ont été obtenues de façon incrémentale mais de nouvelles techniques comme l'étude du transcriptome à l'aide de puces à ADN qui permettent de visualiser l'expression de plusieurs milliers de gènes, devraient conduire à une meilleure compréhension des modifications engendrées par chaque changement ou incorporation d'un gène et ainsi à mieux cibler les améliorations à apporter. En effet, la coproduction de xylitol, les faibles vitesses de production d'éthanol, les besoins en oxygène sont les principaux problèmes rencontrés chez les souches recombinantes obtenues jusqu'à présent. Par ailleurs, l'utilisation de souches industrielles ayant un profil génétique souvent très différent des souches de laboratoire est à favoriser. Il est clair que le problème est complexe et qu'il sera nécessaire de pouvoir contrôler les taux d'expression de nombreux gènes.

C. Les effets et l'élimination des inhibiteurs

Les inhibiteurs présents dans les hydrolysats proviennent i) de la dégradation des sucres en furfural et hydroxyméthyl furfural eux-mêmes dégradables en acides formique et lévulinique, ii) de groupements présents dans les hémicelluloses (acétyls libérés sous forme d'acide acétique), iii) de la lignine (aldéhydes, acides, alcools phénoliques). Leur présence dépend de la nature du matériau lignocellulosique initial et des conditions de son prétraitement. Leur concentration est aussi fonction des taux de recyclage des eaux dans le procédé. Les effets de ces inhibiteurs ont été étudiés sur *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* et *E. coli*. Les études effectuées sur *E. coli* ont montré que la toxicité est due à des effets conjugués plutôt qu'à des effets isolés, que le furfural inhibe les enzymes de la glycolyse et que les composés aromatiques sont plus toxiques que les furanes. Les acides comme l'acide acétique agissent sur le pH intracellulaire des micro-organismes producteurs d'alcool. La sensibilité aux inhibiteurs est très variable d'une souche à l'autre, même au sein d'une même espèce.

Les micro-organismes, notamment *S. cerevisiae*, peuvent dégrader certains inhibiteurs. Par exemple, le furfural peut être oxydé en acide furoïque. En anaérobiose, le furfural, le 5-hydroxyméthyl furfural, la vanilline, l'hydroxybenzaldéhyde et le syringaldéhyde sont réduits par *S. cerevisiae*. Il est possible d'obtenir des micro-organismes peu sensibles à ces inhibiteurs par adaptation successive. Une autre possibilité est de construire des souches tolérantes par introduction d'un gène, par exemple de laccase qui oxyde certains inhibiteurs aromatiques.

Enfin, des procédés de détoxification des hydrolysats, par exemple par passage sur résines échangeuses d'ions, par entraînement à la vapeur d'eau ou par traitement enzymatique, ont été proposés. Ils entraînent cependant des surcoûts importants et la recherche de souches tolérantes est actuellement un axe privilégié.

Tableau 6.5 Production d'éthanol à partir de mélange glucose-xylose ou sur hydrolysats ligno-cellulosiques.

Souche	Substrat	Rendement en éthanol (g-g-1)	Éthanol (g-l ⁻¹)	Productivité (g-l ⁻¹ .h ⁻¹)	Référence
<i>E. coli</i> KO11	Hydrolysat d'hémicelluloses de bagasse (100 g/L xylose)	0,49		0,37 ^a	b
	Hydrolysat de pin (74 g/L sucres totaux dont 15 g/L xylose et 20 g/L glucose)	0,42	31	1,53	Barbosa <i>et al.</i> , 1992 [32]
<i>C. shehatae</i>	Hydrolysat d'orge entier (54 g/L xylose, 126 g/L glucose)	0,48	84	1,16	Wayman et Pareckh, 1985 [15]
<i>Pichia stipitidis</i>	Hydrolysat de peuplier (28 g/L xylose, 64 g/L glucose)	0,45	41	0,85	Pareckh <i>et al.</i> , 1986 [33]
<i>S. cerevisiae</i> TMB 3400	Hydrolysat d'épicéa (6 g/L xylose, 32 g/L hexoses)	0,43		0,25 ^a	b
<i>S. cerevisiae</i> 424A	Mélange de sucres (70 g/L glucose, 40 g/L xylose)	0,43	46	1,55	Sedlak et Ho, 2004 [34]
<i>S. cerevisiae</i> 424A	Hydrolysat de fibres de maïs (40 g/L xylose, 42 g/L glucose, 21 g/L arabinose)	0,44	30	0,62	Sedlak et Ho, 2004 [34]

^a Productivité spécifique (g.g⁻¹.h⁻¹).^b [De [28] 2004].

D. La fermentation et l'hydrolyse simultanées

a. Le procédé SSF

Le procédé SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) consiste à effectuer l'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique en une seule étape. Les principaux avantages de la SSF sont i) la diminution des investissements en supprimant les opérations nécessaires à l'hydrolyse enzymatique effectuée au préalable, ii) l'absence d'inhibition des cellulases par le glucose qui est consommé par les micro-organismes fermentaires au fur et à mesure de son apparition. Il en résulte souvent une augmentation des taux et vitesses d'hydrolyse et des productivités globales en éthanol. Par ailleurs, les risques de contamination microbienne de l'hydrolysats riche en glucose sont amoindris. Ce type de procédé peut être utilisé aussi bien avec des levures qu'avec des bactéries comme *Z. mobilis*.

Les principaux inconvénients de la SSF sont la différence des températures optimales de l'hydrolyse enzymatique (50 °C) et de la fermentation éthanolique (30 à 35 °C) et l'impossibilité de recycler les levures, en raison de la présence de la lignine insoluble.

Certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de croître à 37 °C et certaines souches de *S. pombe* à 41 °C. Des souches de levure appartenant au genre *Kluyveromyces* sont capables de fermenter le glucose à des températures comprises entre 32° et 45 °C. Leurs performances et leurs propriétés sont cependant moins intéressantes que celles de *S. cerevisiae*.

Il apparaît cependant que les gains apportés par la SSF, notamment du point de vue économique, justifient l'étude de ce type de procédé. Il reste à optimiser certains aspects, notamment la concentration en matière sèche initiale qui est encore trop faible pour obtenir des concentrations élevées d'éthanol.

b. La conversion directe ou DMC (Direct Microbial Conversion)

Ce type de procédé vise à utiliser un même micro-organisme pour la production d'enzymes et donc l'hydrolyse de la cellulose et pour sa conversion en éthanol. *Clostridium thermocellum* est une bactérie anaérobie cellulolytique thermophile capable de produire de l'éthanol à partir de glucose. Elle formerait moins de coproduits que les autres bactéries thermophiles et peut être actif à des concentrations élevées en substrats. Cependant, ses performances et ses difficultés de culture à grande échelle en milieu dépourvu de facteurs de croissance et de vitamines ont pour l'instant freiné ses applications.

Une autre possibilité est de transférer des gènes codant pour des cellulases chez les micro-organismes alcooligènes, *Z. mobilis*, *E. coli* ou *S. cerevisiae*. Pour avoir un mélange cellulolytique actif, il est généralement considéré nécessaire d'avoir au moins deux cellobiohydrolases, une attaquant les extrémités réductrices de la cellulose, une autre attaquant les extrémités non réductrices, une endoglucanase et une β -glucosidase et qu'au moins une des CBH ait une CBM. L'expression hétérologue de cellulases chez *Z. mobilis* a rarement été décrite hormis celle d'une endoglucanase d'*Erwinia chrysanthemi* et d'une cellulase d'*Acetobacter xylinum*. Des résultats plus prometteurs ont été obtenus avec l'expression des mêmes cellulases chez *E. coli* ou *K. oxytoca*. Ces travaux restent encore loin de l'application. De nombreux gènes de cellulases, aussi bien d'endoglucanases, de cellobiohydrolases ou de β -glucosidases d'origine bactérienne ou fongique ont été clonés et exprimés chez

S. cerevisiae. Les protéines exprimées sont souvent hyperglycosylées et de taille hétérogène et donc peu actives. Par ailleurs, les faibles taux de sécrétion de protéines hétérologues constituent un frein important à l'utilisation de *S. cerevisiae* comme levure-hôte pour le clonage de gènes étrangers. Ces deux points font à l'heure actuelle l'objet de travaux de recherche. En réalité, si la voie DMC reste une voie attrayante, il apparaît qu'elle constitue une solution envisageable uniquement à long terme.

6.1.2.5 L'utilisation de la lignine

Dans la grande majorité des schémas de procédé de production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique, la lignine est récupérée puis traitée et transformée en vapeur pour servir de source d'énergie. Les quantités de lignine récupérées suffisent largement à fournir la chaleur nécessaire aux différentes étapes consommatrices de vapeur et d'énergie notamment le prétraitement et la distillation. Cette possibilité d'utilisation de la lignine rend ces procédés auto-suffisants et améliorent le bilan CO₂ de la filière.

Avec certaines matières premières, comme le bois, il est possible d'obtenir des quantités de lignine en excès. Leur valorisation comme source d'énergie (électricité ou chaleur) qui peut être distribuée localement est sérieusement envisagée.

Il existe évidemment d'autres valorisations de la lignine, *a priori* plus rémunératrices, essentiellement après transformation (résines, colles, matières premières pour la chimie fine). Cependant, ces voies de valorisation sont loin d'assurer l'utilisation de toute la lignine associée à la production d'éthanol – carburant, et restent pour l'instant marginales.

6.1.2.6 Les différents schémas de production

À partir du schéma de procédé générique (fig. 6.3) et des diverses possibilités que nous avons évoquées, différents schémas de procédé ont été envisagés (fig. 6.9). Les choix sont souvent dépendants des substrats à traiter. Nous ne citerons ici que les procédés qui font l'objet de développements réels.

Le procédé le plus souvent mis en avant par le NREL combine un prétraitement à l'acide dilué en co-courant, un traitement de détoxification avant une fermentation et hydrolyse enzymatique simultanée (appelée SSCF pour *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*) par une souche de *Zymomonas mobilis* modifiée pour utiliser les pentoses. Ce procédé est très bien détaillé et les unités ont été dimensionnées notamment dans le cas d'utilisation de rafles de maïs et de bois de peuplier comme matières premières.

Le procédé BCI utilise une hydrolyse acide en 2 étapes, déjà décrite ci-dessus. La fermentation du xylose est effectuée par une souche modifiée d'*E. coli* et est indépendante de la fermentation du glucose.

Le procédé préconisé par IFP et Iogen, notamment à partir de paille de blé, fait intervenir une explosion à la vapeur en conditions acides, une hydrolyse enzymatique séparée, suivie d'une séparation de la lignine avant fermentation.

Le procédé décrit par Etek considère le bois comme matière première. Il diffère peu du schéma précédent hormis un prétraitement par acide dilué en remplacement de l'explosion à la vapeur. La possibilité d'utiliser la SSF est également évoquée.

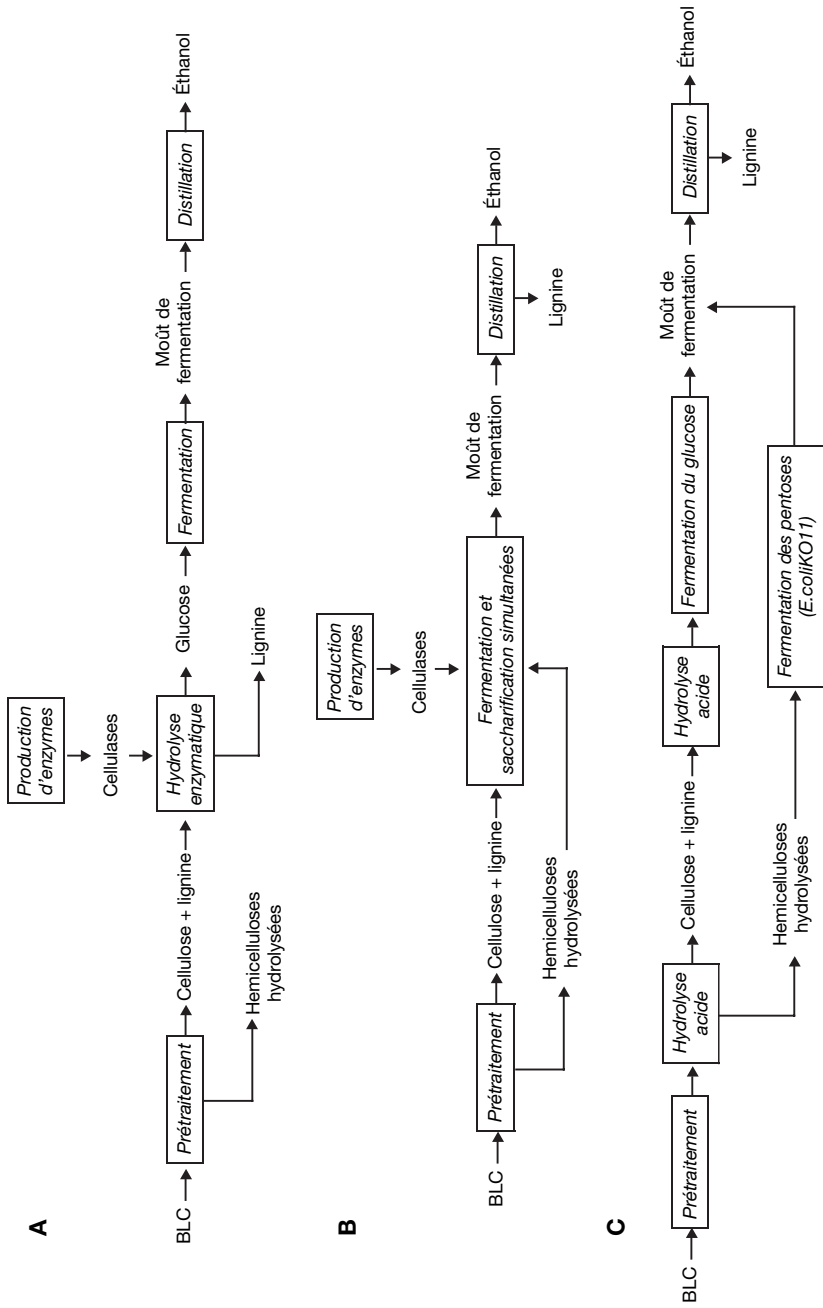


Figure 6.9

Les différents schémas de procédé de production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. A : hydrolyse et fermentation séparées ; B : Hydrolyse et fermentation simultanées avec souches modifiées convertissant les pentoses en éthanol ; C : Hydrolyse par acide dilué et fermentations séparées des pentoses et du glucose.

Ces procédés sont à l'heure actuelle relativement hypothétiques. Ils sont en général basés sur une fermentation efficace des pentoses, ce qui n'est pas encore le cas, même avec les souches modifiées disponibles. À l'exception de ce point, tous ces procédés ont été testés ou sont en cours d'opération au stade pilote, par exemple 1 t/jour pour le pilote NREL, 3,5 t/jour pour le pilote Iogen, 2 t/jour pour le pilote Etek, le pilote utilisé par le passé par l'IFP pouvant traiter 2 t/h. Enfin, la compagnie Abengoa a annoncé la construction d'une unité pouvant produire 50 000 hl/an d'éthanol à partir de pailles de céréales.

6.1.3 Conclusion

L'utilisation de la biomasse lignocellulosique pour la production d'éthanol-carburant présenterait de multiples avantages des points de vue environnementaux (bilan en émissions de CO₂ plus favorable que l'éthanol issu des plantes sucrières ou amylacées, valorisation des coproduits et déchets) et socio-économiques (pas de compétition avec les surfaces agricoles à usage alimentaire ou agroalimentaire, moindre coût de la matière première). C'est assurément la solution la plus pérenne à une extension de l'utilisation du bioéthanol. Différents schémas et livres de procédé existent, basés sur des expérimentations menées à des échelles représentatives. Cependant, certaines étapes sont complexes et leur amélioration nécessite de progresser sur des aspects cognitifs, notamment sur l'enzymologie de la cellulolyse et sur la physiologie des levures. L'implantation d'unités de production industrielle est un enjeu majeur dont l'avenir repose en grande partie sur les retombées de l'essor des biotechnologies.

6.2 LES AUTRES VOIES DE VALORISATION ÉNERGÉTIQUE DE LA BIOMASSE

Ces autres voies de valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique ou de déchets organiques conduisent à la fabrication de composés gazeux comme le méthane et l'hydrogène, ou de composés liquides tels que l'acétone, le butanol et l'éthanol, ces derniers produits pouvant être employés comme carburants.

6.2.1 La fermentation méthanique

6.2.1.1 L'historique

Le méthane ou « gaz de marais » a été découvert en 1776 par Volta. Sans avoir connaissance de cette découverte, deux autres personnages illustres, pas spécialement reconnus comme scientifiques, Georges Washington, futur premier président des États-Unis et Thomas Paine, publiciste américain d'origine britannique et futur membre de la Convention en France, firent le même type d'observation que Volta en 1783 [35].

En 1787, Lavoisier dénomma ce gaz inflammable sous le terme *gas hydrogenium carbonatum*.