

Aix-Marseille Université

École Doctorale Sciences de L'Environnement

THESE DE DOCTORAT

Présentée par :

Djida TAFUKT - BOULOUS

**Suivi de réactions biochimiques par calorimétrie
en vue de la production de biocarburants de 2^{ème}
génération**

Thèse dirigée par Jean-Henry Ferrasse et Audrey Soric

Soutenance prévue le 26/07/2016 devant le jury composé de :

M. Jean-Louis FANLO

Pr, École des Mines d'Alès: Rapporteur

M. Marc HERAN,

Pr, Université de Montpellier: Rapporteur

M. Jean-Claude SIGOILLOT

Pr, Université Aix Marseille : Examineur

M. Erwin FRANQUET

Dr, Université de Pau: Examineur

M. Jean-Henry FERRASSE,

Dr, Université Aix Marseille: Directeur de thèse

Mme Audrey SORIC,

Dr, Ecole Centrale de Marseille: Co-directrice de thèse

INTRODUCTION GENERALE.....	11
I LA VOIE BIOLOGIQUE POUR LES BIOCARBURANTS.....	15
I.1 GENERALITES SUR LES BIOCARBURANTS	16
I.1.1 <i>Les biocarburants de première génération</i>	16
I.1.1.1 Les biocarburants de deuxième génération	16
I.1.2 <i>Les biocarburants de troisième génération</i>	17
I.2 FABRICATION DU BIOETHANOL 2EME GENERATION	17
I.2.1 <i>Matière première</i>	17
I.2.1.1 La Cellulose	19
I.2.1.2 Les Hémicelluloses.....	20
I.2.1.3 La lignine.....	22
I.2.1.4 Les cendres contenues dans la biomasse	23
I.2.2 <i>Étapes de fabrication des biocarburants de 2ème génération</i>	23
I.2.2.1 Le prétraitement.....	23
I.2.2.2 Hydrolyse de la biomasse lignocellulosique	27
I.2.2.3 La fermentation	32
I.2.3 <i>Procédés de fabrication du bioéthanol</i>	33
I.2.3.1 Hydrolyse et fermentation séparée (SHF)	33
I.2.3.2 Saccharification et fermentation simultanée (SSF).....	34
I.2.3.3 Pré hydrolyse saccharification et fermentation simultanée (PSSF)	36
I.2.3.4 Saccharification et co-fermentation simultanée (SSCF).....	37
I.2.3.5 La conversion directe (consolidate bioprocessing) (CBP)	38
I.3 CONCLUSIONS	40
II CINETIQUES ENZYMATIQUE PAR CALORIMETRIE ISOTHERME.....	41
II.1 CINETIQUE ENZYMATIQUE.....	42
II.1.1 <i>Modèle en phase homogène</i>	42
II.1.1.1 Modèle de Michaelis-Menten en phase homogène.....	42
II.1.1.2 Modèle de Michaelis-Menten avec inhibition.....	44
II.1.2 <i>Modèles cinétiques en phase hétérogène</i>	45
II.1.2.1 Modèle de Michaelis-Menten en phase hétérogène	45
II.1.2.2 Les modèles empiriques	46
II.1.2.3 Les Modèles d'adsorption	47
II.1.3 <i>Principe de la calorimétrie isotherme</i>	49
II.1.4 <i>Avantages et inconvénients de la calorimétrie</i>	49
II.1.5 <i>Calorimétrie et cinétique enzymatique</i>	50
II.1.5.1 Calorimétrie isotherme à injection multiple.....	51
II.1.5.2 Injection unique (essai en continu)	53
II.2 CONCLUSION	56
III MATERIEL ET METHODES	58
III.1 LES REACTIFS UTILISES LORS DE L'HYDROLYSE ET LA FERMENTATION	59
III.1.1 <i>Substrats</i>	59
III.1.2 <i>Les enzymes</i>	60
III.1.2.1 Mesure des constantes cinétiques de la SP188 (Dosage par temps fixe)	60
III.1.3 <i>Levure</i>	61
III.1.4 <i>Tampon</i>	62
III.1.5 <i>Antifongique</i>	62
III.1.6 <i>Antibiotique</i>	62
III.2 APPAREIL DE MESURE CALORIMETRIQUE	62
III.2.1 <i>Calorimètre C80</i>	62
III.2.1.1 Descriptif et principe	62

III.2.1.2	Cellules utilisées	65
III.2.2	<i>Calorimètre OptiMax TM 1001</i>	66
III.2.2.1	Descriptif et principe	66
III.2.2.2	Méthode de calcul des chaleurs de réaction par l'OptiMax	69
III.3	SUIVI PAR CALORIMETRIE DES REACTIONS	71
III.3.1	<i>Suivi de l'hydrolyse enzymatique par le C80</i>	71
III.3.1.1	Préparation des essais tests et références	72
III.3.1.2	Réalisation des enregistrements	74
III.3.2	<i>Suivi des procédés de production du bioéthanol par OptiMax</i>	74
III.3.2.1	Procédé SHF	75
III.3.2.2	Le procédé SSF.....	76
III.3.3	<i>Analyse des produits</i>	77
III.3.3.1	Préparation des échantillons.....	77
III.3.3.2	Dosage du glucose.....	77
III.3.3.3	Détermination des sucres réducteurs	78
III.3.3.4	Détermination des différents carbohydrates et l'acide gluconique	79
III.3.3.5	Dosage de l'éthanol.....	79
III.3.3.6	Observation au Microscope électronique à balayage (MEB).....	80
III.4	CONCLUSION.....	80
IV	HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR MICROCALORIMETRE C80	81
IV.1	CALORIMETRE C80.....	82
IV.1.1	<i>Hydrolyse du cellobiose</i>	82
IV.1.1.1	Essais tests.....	82
IV.1.1.2	Essais blancs	83
IV.1.1.3	Flux de l'hydrolyse.....	84
IV.1.2	<i>Hydrolyse de la paille</i>	86
IV.1.2.1	Effet de la température	87
IV.1.2.2	Effet de la masse de substrat	90
IV.1.2.3	Relation entre la chaleur dégagée en fonction des sucres réducteurs produits	96
IV.1.2.4	Effet de la CDH.....	97
IV.1.3	<i>Observation par microscopie électronique à balayage</i>	102
IV.1.4	<i>Cinétique enzymatique</i>	103
IV.1.4.1	Constantes cinétiques pour le cellobiose	103
IV.1.4.2	Cinétique enzymatique pour la paille.....	107
IV.1.5	<i>Conclusion</i>	111
V	CALORIMETRE DE GRANDE CONTENANCE PAR SONDE DE MESURE INTERNE.....	114
V.1	CHALEUR DE DISSOLUTION DE L'ACIDE ACETIQUE ET DU BROMURE DE SODIUM	115
V.2	ESSAIS AVEC LE CELLOBIOSE	117
V.2.1	<i>Hydrolyse et fermentation séparées du cellobiose</i>	117
V.2.1.1	Hydrolyse du cellobiose.....	117
V.2.1.2	Fermentation.....	119
V.2.2	<i>Hydrolyse et fermentation simultanée du cellobiose</i>	121
V.3	TESTS SUR LA PAILLE	125
V.3.1	<i>Hydrolyse et fermentation simultanée de la paille broyée</i>	126
V.3.1.1	Hydrolyse.....	126
V.3.1.2	Fermentation.....	128
V.3.2	<i>Hydrolyse et fermentation simultanée de la paille broyée</i>	131
V.3.3	<i>Hydrolyse et fermentation simultanée de la paille explosée</i>	134
V.4	CONCLUSION.....	138
	CONCLUSION GENERALE	140
	ANNEXES.....	144

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 149

LISETE DES FIGURES

Figure I. 1. Représentation de la structure de la biomasse lignocellulosique [18]	18
Figure I. 2. Schéma de la cellulose [21]	19
Figure I. 3. Schéma du type d'organisation cristalline de deux molécules de cellulose [22]	20
Figure I. 4. Principaux glucides constituant l'hémicelluloses [27]	21
Figure I. 5. Schéma d'une molécule de xylane [27]	21
Figure I. 6. Les trois principaux monomères qui composent la lignine [31]	22
Figure I. 7. Schéma du mécanisme d'action de la cellulase sur la cellulose [68]	30
Figure I. 8. Schéma du mécanisme d'action de la xylanase sur le xylane [74]	31
Figure I. 9. Schéma du procédé d'hydrolyse et fermentation séparée (SHF) [66]	34
Figure I. 10. Schéma simplifié du procédé de saccharification et fermentation simultanée (SSF) [66]	35
Figure I. 11. Pré hydrolyse saccharification et fermentation simultanée (PSSF) [66]	37
Figure I. 12. Schéma simplifié du procédé de saccharification et co-fermentation simultanée (SSCF)[66]	38
Figure I. 13. Schéma du procédé d'hydrolyse et fermentation directe (CBP) [66]	39
Figure II. 1. Evolution de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat [103]	43
Figure II. 2. Exemple de thermogramme obtenu par la méthode de l'injection multiple [128]	52
Figure II. 3. Courbe de Michaelis-Menten obtenue à partir du thermo gramme [128]	53
Figure II. 4. Exemple de thermogramme obtenu par la méthode de l'injection unique [133]	54
Figure II. 5. Courbe de Micaelis-Menten obtenue à partir du thermogramme [133]	54
Figure II. 6. Exemple de courbe obtenue par la méthode injection unique en présence et absence d'inhibiteur [134]	55
Figure III. 1. (A) Composition massique de la paille de blé broyée, (B) Composition massique de la paille de blé explosée.	59
Figure III. 2. Protocole expérimental pour l'étude de la β -glucosidase à temps fixe	61
Figure III. 3. Photo du Calorimètre C80, illustré avec le moteur d'agitation	63
Figure III. 4. Schéma de l'enceinte calorimétrique et du système de détection	64
Figure III. 5. Photographie des pièces constituant la cellule de mélange à membrane	66
Figure III. 6. Photographie de l'OptiMax et ses accessoires	67
Figure III. 7. Étalonage nécessaire aux mesures de l'OptiMax	69
Figure III. 8. Chaleur engendrée lors de l'agitation des deux cellules (vides) au même temps	72
Figure III. 9. Schéma de remplissage de la cellule de mélange à membrane	73
Figure III. 10. Réaction du DNS avec un sucre réducteur	78
Figure IV. 1. Thermogramme brut obtenu pour 100 μ l de β -glucosidase, 0.1mM de cellobiose dans le tampon 50 mM sodium phosphate (pH 4.8) à 37°C sous agitation constante de 40 rpm.	83

Sommaires

Figure IV. 2. Thermogramme brut obtenu pour un essai sans β -glucosidase, 0.1mM de cellobiose dans le tampon 50 mM sodium phosphate (pH 4.8) à 37°C sous agitation constante de 40 rpm.	84
Figure IV. 3. Thermogramme de l'hydrolyse obtenu après soustraction du blanc pour 100 μ l de β -glucosidase, 0.1mM de cellobiose dans le tampon 50 mM sodium phosphate (pH 4.8) à 37°C sous agitation constante de 40 rpm.	85
Figure IV. 4. Thermogrammes de l'hydrolyse corrigés pour différentes températures pour une masse de 0,125 g de pailles	87
Figure IV. 5. Chaleur d'hydrolyse pour différentes températures	88
Figure IV. 6. Quantité de glucose produit à différentes températures pour 0.125 g de paille	89
Figure IV. 7. Chaleur produite rapporté à la quantité de sucre produit	90
Figure IV. 8. Thermogrammes de l'hydrolyse obtenus après soustraction des blancs pour différentes masse de paille à 45°C	90
Figure IV. 9. Chaleurs de l'hydrolyse obtenues pour différentes masse de paille à 45°C	91
Figure IV. 10. Chaleurs d'hydrolyse rapportées au gramme de paille à 45°C	92
Figure IV. 11. Flux de chaleur rapportés à la quantité de paille utilisée	93
Figure IV. 12. Quantité de sucres réducteurs produite pour différentes masses de paille	94
Figure IV. 13. Sucres réducteurs produits rapporté au gramme de paille	95
Figure IV. 14. Taux de conversion des polysaccharides en fonction de la masse de paille	95
Figure IV. 15. Chaleur dégagée en fonction de la quantité de sucres réducteurs produite	96
Figure IV. 16. Flux de chaleurs engendré pour deux différents cocktails enzymatiques à 45°C avec 125 mg de paille	98
Figure IV. 17. Chaleur d'hydrolyse rapportée au gramme de paille obtenue pour deux différents cocktails enzymatique à 45°C pour une masse de paille de 125 mg	98
Figure IV. 18. Quantité de sucres réducteurs produite pour différents cocktails enzymatiques	99
Figure IV. 19. Chaleur d'hydrolyse rapportée à la quantité de sucre pour deux différents cocktails enzymatique à 45°C pour une masse de paille de 125 mg	100
Figure IV. 20. Masse des différents carbohydrates formés	101
Figure IV. 21. Observation au microscope électronique à balayage de la paille de blé avant (A et B) et après (C et D) l'hydrolyse enzymatique	102
Figure IV. 22. Représentation de la courbe de Michaelis-Menten montrant la vitesse de réaction V en fonction de la concentration en substrat [S] obtenue à partir des mesures calorimétriques pour deux concentrations en enzyme	104
Figure IV. 23. Linéarisations de Lineweaver et Burk de la courbe de Michaelis-Menten obtenue pour 80 mg/L de cellulase	105
Figure IV. 24. Représentation de la courbe de Michaelis-Menten montrant la vitesse de réaction V en fonction de la concentration en substrat [S] obtenue par spectrophotométrie	106
Figure IV. 25. Lineweaver et Burk de la courbe de Michaelis-Menten obtenue par spectrophotométrie	106
Figure IV. 26. Vitesse de réaction V en fonction de la concentration du substrat S pour la paille de blé à différentes température	108
Figure IV. 27. Linéarisation de Lineweaver et Burk pour la paille de blé à différentes température	108
Figure IV. 28. Ligne de base prise en compte pour le calcul des constantes cinétiques	109

Sommaires

Figure IV. 29. Représentations des courbes de Michaelis-Menten montrant la vitesse de réaction V en fonction de la concentration en substrat [S] obtenues à partir des mesures calorimétriques pour différentes température pour 125 mg de paille	110
Figure IV. 30. Linéarisation de Lineweaver et Burk pour la paille de blé à différentes température	110
Figure V. 1. Thermogramme obtenu pour l'injection de 1 ml d'acide acétique dans 700 ml d'eau distillée à 25°C	116
Figure V. 2. Thermogramme obtenu pour la saccharification de 12 g de cellobiose	118
Figure V. 3. Thermogramme de la fermentation d'un échantillon de 690 ml de solution de glucose, vitesse d'agitation	120
Figure V. 4. Evolution en fonction du temps de la concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors du procédé SHF pour le cellobiose	121
Figure V. 5. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 12g de cellobiose à 37°C	122
Figure V. 6. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 5 g de cellobiose à 34 °C	123
Figure V. 7. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors su procédé SSF pour 12 g et 5g de cellobiose	124
Figure V. 8. Thermogramme de l'hydrolyse de 12g de paille dans 700 ml de tampon	127
Figure V. 9. Sucres réducteurs produits rapportés au gramme de paille à différents intervalle de temps	128
Figure V. 10. Thermogramme de la fermentation de 12 g de paille hydrolysé dans 690 ml de tampon	129
Figure V. 11. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors de l'utilisation de 12g de paille	130
Figure V. 12. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 12g de paille broyée dans 700 ml de tampon	132
Figure V. 13. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors de l'utilisation de 12g paille	132
Figure V. 14. Observation au microscope électronique à balayage de la paille de blé broyée avant (A) et après hydrolyse et fermentation (B)	134
Figure V. 15. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 97,24 g de paille explosée	135
Figure V. 16. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 130 g de paille explosée	136
Figure V. 17. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors de l'utilisation de 130 g paille explosée	137
Figure V. 18. Observation au microscope électronique à balayage de la paille de blé explosée avant A et après hydrolyse et fermentation simultanées B	138

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Proportion massique en cellulose, hémicellulose et lignine de différentes biomasses lignocellulosique.....	19
--	----

Sommaires

Tableau 2. Taux des différents sucres (% relatifs) et acide uronique (%) constitutifs des hémicelluloses de paille de blé [29]	22
Tableau 3. Résultats de quelques procédés appliqués à la paille	39
Tableau 4. Récapitulatif des modèles d'inhibition	45
Tableau 5. Récapitulatif des constantes de Michaelis-Menten sur deux substrats celluloses	46
Tableau 6. Comparatif des constantes cinétiques obtenues par calorimétrie et celles obtenues par d'autres méthodes de mesure	56
Tableau 7 : Enzymes utilisées et leurs activités	60
Tableau 8: Spécifications du Calorimètre Calvet C80	64
Tableau 9 : Spécifications de l'OptiMax.....	67
Tableau 10. Chaleurs engendrées pour différentes masses de cellobiose	86
Tableau 11. Constantes cinétiques Vmax et Km pour la paille obtenues par linéarisation Lineweaver et Burk	111

LISTE DES ABREVIATIONS

ADEME : Ademe Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie

SHF : Hydrolyse et Fermentation Séparée

SSF : Saccharification et Fermentation Simultanée

PSSF : Pré hydrolyse Saccharification et Fermentation Simultanée

SSCF : Saccharification et Co-Fermentation Simultanée

CBP : Conversion Directe (consolidate bioprocessing)

DP: Degré de Polymérisation

CBH: Cellobiohydrolase

CBHI: Cellobiohydrolases I

CBHII: Cellobiohydrolases II EG : Endoglucanases

CDH : Cellobiose Dehydrogenase

UFP : Unité Filtre Papier

BAEE : N- α -benzoyl-L-arginine éthyle ester

SAB : Sérum albumine de bovin

DNS : Dinitrosalicylique

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La consommation mondiale d'énergie primaire dépend actuellement principalement de la production pétrolière. Les besoins en pétrole devraient augmenter de 60 à 75% d'ici 2030 et ce majoritairement du fait du développement des secteurs des transports et de l'industrie dans les pays émergents. Par ailleurs, l'utilisation de cette énergie fossile provoque des dégâts à long terme sur l'environnement.

En effet, l'utilisation des carburants fossiles favorise une augmentation des gaz à effet de serre en particulier sous forme de dioxyde de carbone, dont la concentration dans l'atmosphère est passée de 288 ppm en 1870 à 396 ppm en 2013 [1].

Ces gaz à effet de serre sont responsables d'un réchauffement global de la terre et du dérèglement climatique observé ces dernières décennies [2]. Ainsi le 5ème rapport du GIEC table, selon le scénario choisi, sur une augmentation de la température moyenne sur la terre de 1,8°C à 4°C en 2100. Le niveau moyen des mers augmenterait quant à lui de 18 à 59 cm [3].

C'est donc dans un contexte mondial marqué par l'instabilité des prix du baril de pétrole, et dans un souci de protection de l'environnement que les énergies nouvelles et renouvelables sont développées. Parmi ces énergies, les biocarburants font actuellement l'objet d'une considération particulière à travers le monde [4] car ils peuvent être utilisés dans les moteurs à combustion.

Dans ce domaine, la commission européenne a montré l'exemple en fixant un objectif de 20% d'énergie renouvelable dans la consommation totale d'énergie d'ici 2020 et s'attend à une contribution significative des biocarburants à la réalisation de cet objectif [5].

En effet, alors que le taux d'incorporation a représenté 2,7% en 2007 et 3,3% en 2008, les directives Européennes incitent les Etats membres à accentuer leurs efforts et fixent un objectif minimal de 10 % d'incorporation en 2020.

La production de bioéthanol 2^{ème} génération est actuellement perçue comme étant la filière la plus prometteuse des biocarburants et suscite un grand intérêt dans de nombreux pays à travers le monde [6]. Une des voies préconisée pour la fabrication de ce biocarburant est la voie biochimique qui consiste à transformer de la biomasse lignocellulosique en éthanol en utilisant des enzymes et des microorganismes. Le rendement de ces transformations reste faible ; l'optimisation et le contrôle de ces procédés sont donc des éléments capitaux pour la survie économique de cette filière.

Introduction générale

Un contrôle quantitatif efficace de ces transformations biochimiques telles que l'hydrolyse enzymatique et la fermentation, nécessite une bonne connaissance des cinétiques de réaction.

L'originalité du travail présenté dans ce manuscrit consiste en la proposition d'un suivi en direct et in situ de ces réactions biochimiques.

Le suivi proposé est effectué par calorimétrie isotherme. Cette technique est basée sur la proportionnalité entre le taux de conversion du substrat et l'énergie thermique dégagée ou absorbée par cette réaction de transformation [7].

Plus précisément, même si des essais de fermentation par la levure *saccharomyces cerevisiae* sont effectués, le travail de cette thèse se focalise sur l'hydrolyse enzymatique. Cette étude est réalisée grâce à deux calorimètres en mode isotherme de tailles et de fonctionnement différents.

Dans un premier temps, l'hydrolyse d'un composé simple (cellobiose) sera testée pour prouver la fiabilité des deux calorimètres et l'applicabilité de la méthode. Dans un deuxième temps, l'hydrolyse d'une paille traitée sera étudiée. Enfin, deux procédés (Hydrolyse et Fermentation Séparée et Saccharification et Fermentation Simultanée) suivis par calorimétrie isotherme seront testés et comparés.

Le manuscrit est organisé en cinq chapitres.

Les deux premiers chapitres sont des études bibliographiques dans le domaine d'étude. Le premier est consacré à des généralités sur les biocarburants ainsi que les étapes et procédés de fabrication de ces derniers. Le deuxième chapitre est quant à lui consacré aux différentes cinétiques régissant les réactions biochimiques et au principe d'analyse par calorimétrie isotherme ainsi que la méthode de calcul des constantes cinétiques par cette méthode.

Le troisième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser le suivi calorimétrique des bioréactions. Dans un premier temps, les différents substrats, enzymes et calorimètres utilisés sont présentés, puis les méthodes détaillées de suivis par calorimétrie sont explicitées. Enfin la dernière partie est consacrée à la description des méthodes d'analyses des différents produits de réaction obtenus.

Introduction générale

L'objectif du quatrième chapitre est la présentation et interprétation des résultats obtenus lors de l'utilisation d'un microcalorimètre (C80). Lors de ce chapitre la fiabilité du calorimètre C80 ainsi que la méthode de détermination des constantes cinétiques par calorimétrie isotherme sont prouvées et cela en étudiant l'hydrolyse enzymatique d'un substrat simple et soluble. Puis une proposition de calcul des constantes cinétiques de l'hydrolyse d'un substrat naturel (paille de blé) est présentée et discutée.

Le cinquième et dernier chapitre est consacré à la présentation et interprétation des résultats des suivis des procédés de production du bioéthanol de 2^{ème} génération par calorimétrie isotherme et ce en utilisant un bioréacteur de volume plus important (OptiMax), qui correspond à un passage d'un volume de moins de 10 mL pour le C80 à 1 L pour l'OptiMax.

**I LA VOIE BIOLOGIQUE POUR LES
BIOCARBURANTS**

I.1 Généralités sur les biocarburants

Selon l'ADEME, 'Les biocarburants sont des carburants d'origine agricole. Ils sont obtenus à partir de matières organiques végétales ou animales, appelées encore biomasse, et sont utilisés dans les moteurs ' [8].

En pratique, les biocarburants se classent en trois grandes familles, détaillées ci-après.

I.1.1 Les biocarburants de première génération

Ils sont issus des plantes riches en produits oléagineux ou en sucre. Ils comprennent le biodiesel (destiné aux moteurs diesel) produit à partir d'huile végétale (culture énergétique et du recyclage d'huile de friture) ou, plus rarement, de graisse animale et l'éthanol (destiné aux moteurs à "essence") produits à partir de plantes à sucre (canne à sucre et betterave) et d'amylacées (maïs, blé, etc.) [9]. Leurs technologies de production sont maîtrisées et répandues dans le monde, et particulièrement au Brésil pour l'éthanol.

Bien que ces technologies de production soient avancées, la production de cette catégorie de biocarburants présente trois inconvénients majeurs:

- Bilan environnemental médiocre car elle entraîne d'une part une augmentation de la pollution des eaux par les pesticides utilisés lors de la culture de la matière première et d'autre part la déforestation au profit de la surface agricole.
- Bilan CO₂ mauvais si l'impact du changement d'affectation des sols est intégré.
- Compétition directe avec la nourriture provoquant une hausse de prix des denrées alimentaires.

C'est pour ces raisons, que l'Europe a émis une directive visant à limiter à 6% la part de ces biocarburants dans les transports en 2020 [10].

I.1.1.1 Les biocarburants de deuxième génération

Ils sont produits à partir de la partie non comestible des végétaux ; tels que l'éthanol cellulosique produit à partir de résidus agricoles comme les pailles de céréales, de résidus forestiers...etc [5].

Comparé aux biocarburants de première génération, ces biocarburants présentent les avantages suivants :

La voie biologique pour les biocarburants

- Une production à base de végétaux non comestibles (résidus agricole ou cultures dédiées) et donc dissociée des cultures alimentaires et des cultures dédiées à la production de ces biocarburants,
- Un meilleur bilan environnemental que les biocarburants de la première génération (consommation en eau et engrais réduite),
- Une disponibilité sur l'ensemble de la planète.

Cependant ces biocarburants sont actuellement très peu développés essentiellement pour des raisons de rentabilité et de maîtrise de la technologie de production. C'est pour cela que l'optimisation des procédés de production de ce type de biocarburant fait l'objet de recherche dans plusieurs laboratoires à travers le monde.

L'Europe se fixe un objectif de 2,5% de part de biocarburant de 2^{ème} génération dans les transports pour 2020.

I.1.2 Les biocarburants de troisième génération

Une 3^{ème} catégorie de biocarburants existe dorénavant, les biocarburants de 3^{ème} génération. Ils sont issus de lipides ou de sucres synthétisés à partir de micro-algues. Leur production est aussi très peu développée.

Même si ces procédés sont prometteurs car ils ont des rendements plus importants à l'hectare, ils présentent un inconvénient majeur qui est le coût énergétique élevé lié à leur culture notamment pour le maintien en suspension des algues [11].

Ainsi même si les biocarburants de 2^{ème} et 3^{ème} génération sont tous deux prometteurs, ce dernier (3^{ème} génération) présente un inconvénient majeur qui est le coût de la matière première (culture et de récolte des micro-algues sont très onéreux)[11][12].

I.2 Fabrication du bioéthanol 2ème génération

I.2.1 Matière première

La biomasse lignocellulosique, source de carbone naturel, est la principale alternative au carbone fossile (pétrole et charbon). Les substrats considérés sont divers et variés, puisqu'ils comprennent aussi bien les sous-produits de l'agriculture telle que la paille de blé mais aussi les déchets des industries agro-alimentaire et ceux des papeteries [13][14] [15]. Cette biomasse présente plusieurs avantages, elle est abondante, renouvelable et bon marché.

La voie biologique pour les biocarburants

La matière lignocellulosique est constituée principalement de trois polymères, la lignine, la cellulose, l'hémicellulose ainsi que de plusieurs autres composés inorganiques (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ...) [16].

La cellulose et l'hémicellulose représentent plus de 70% de la biomasse totale et sont étroitement liées à la lignine par des liaisons covalentes et hydrogènes [16]. Cela confère à la matière lignocellulosique une grande résistance à la dégradation.

Fondamentalement, la cellulose forme un squelette qui est entouré par l'hémicellulose et la lignine (Figure I. 1).

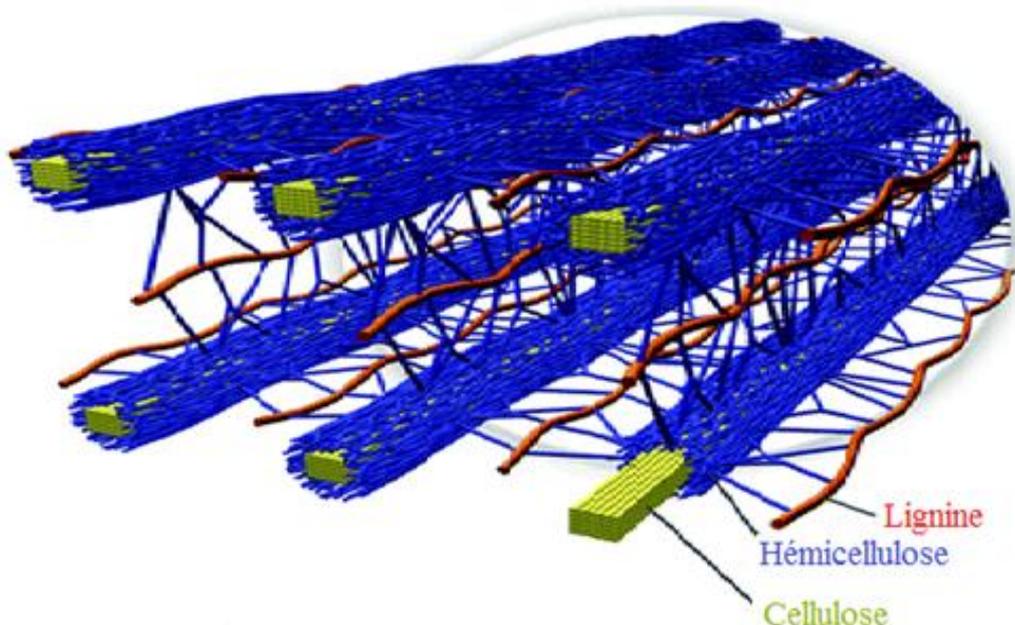


Figure I. 1. Représentation de la structure de la biomasse lignocellulosique [18]

La composition des fibres lignocellulosiques diffère d'une provenance à l'autre. Le Tableau 1 résume la composition des principales biomasses lignocellulosiques utilisées pour production des biocarburants de 2^{ème} génération.

La voie biologique pour les biocarburants

Tableau 1 : Proportion massique en cellulose, hémicellulose et lignine de différentes biomasses lignocellulosique

Biomasse sèche	Cellulose %	Hémicellulose %	Lignine %
Résidus agricoles	37-50	25-50	5-15
Bois dur	45-47	25-40	20-25
Bois tendre	40-45	25-29	25-35
Papier journal	40-55	25-40	18-30

I.2.1.1 La Cellulose

La cellulose ou β -1-4-glucane est le polymère le plus abondant sur terre[19]. La quantité annuelle disponible de celle-ci est estimée à $1,5 \cdot 10^{12}$ tonne par an [20].

La cellulose est un homopolymère linéaire de glucose (Figure I.2) de poids moléculaire de 50 kDa à $2,5 \cdot 10^6$ kDa soit entre 300 à 15000 résidus de glucoses composée d'unités répétées de cellobiose (deux glucoses liés par une liaison osidique β -1, 4).

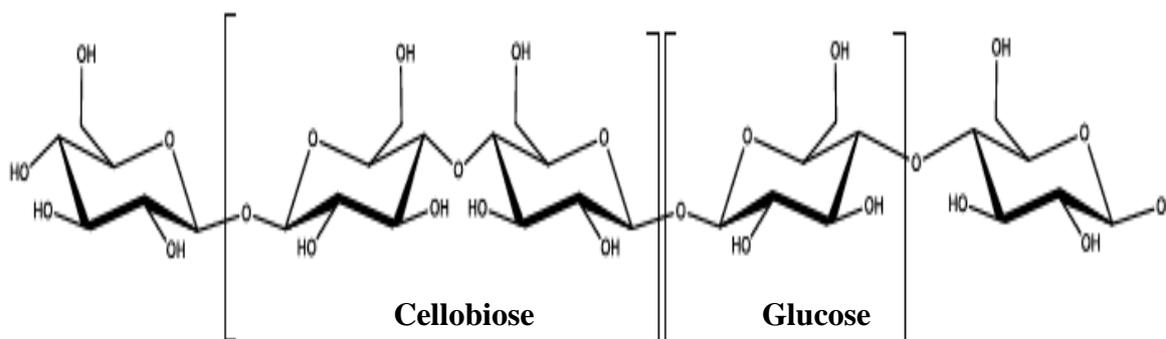


Figure I. 2. Schéma de la cellulose [21]

Cette liaison osidique confère aux chaînes de glucose une conformation tridimensionnelle spécifique stabilisée par des liaisons hydrogène (Figure I.3).

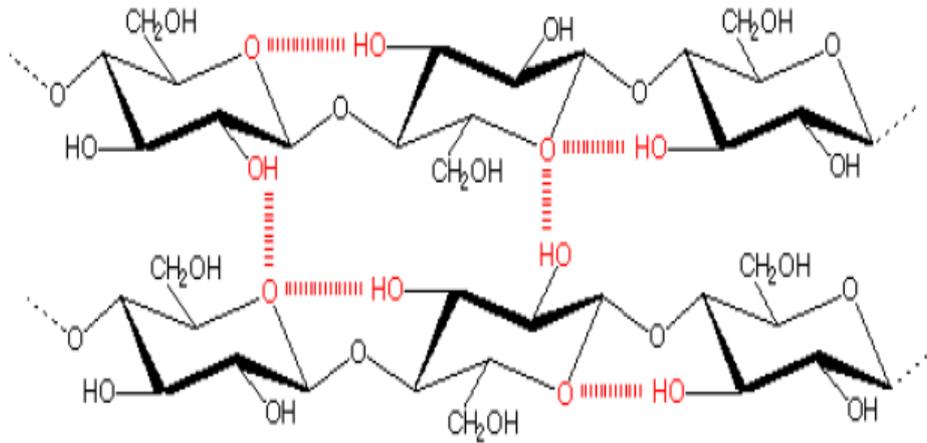


Figure I. 3. Schéma du type d'organisation cristalline de deux molécules de cellulose [22]

Les microfibrilles de cellulose sont constituées d'édifices cristallins ordonnés ainsi que de zones dites amorphes beaucoup plus sensibles aux agressions physiques et chimiques [23].

C'est ces édifices cristallins qui rendent la cellulose résistante à l'hydrolyse enzymatique [24] [25].

Enfin, même si la cellulose est considérée comme homopolymère car son analyse révèle que celle-ci est constituée à plus de 95% de glucose, d'autres sucres peuvent être présents tels que le galactose, le mannose ou le xylose [26].

I.2.1.2 Les Hémicelluloses

La famille des hémicelluloses représente le second composé en terme d'abondance dans les végétaux [27].

Les hémicelluloses ont un rôle structural dans les végétaux lignocellulosiques. En effet, elles permettent de faire la liaison entre la cellulose et la lignine.

Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses forment une famille de composés hétéropolysaccharidiques variés. Les unités monomériques de ces macromolécules glucidiques sont des pentoses (principalement xylose et arabinose), des hexoses (principalement glucose, mannose, galactose) et des acides carboxyliques (principalement les acides mannuronique et galacturonique). La Figure I. 4 montre les unités monosaccharidiques les plus représentées dans les différentes familles d'hémicelluloses.

La voie biologique pour les biocarburants

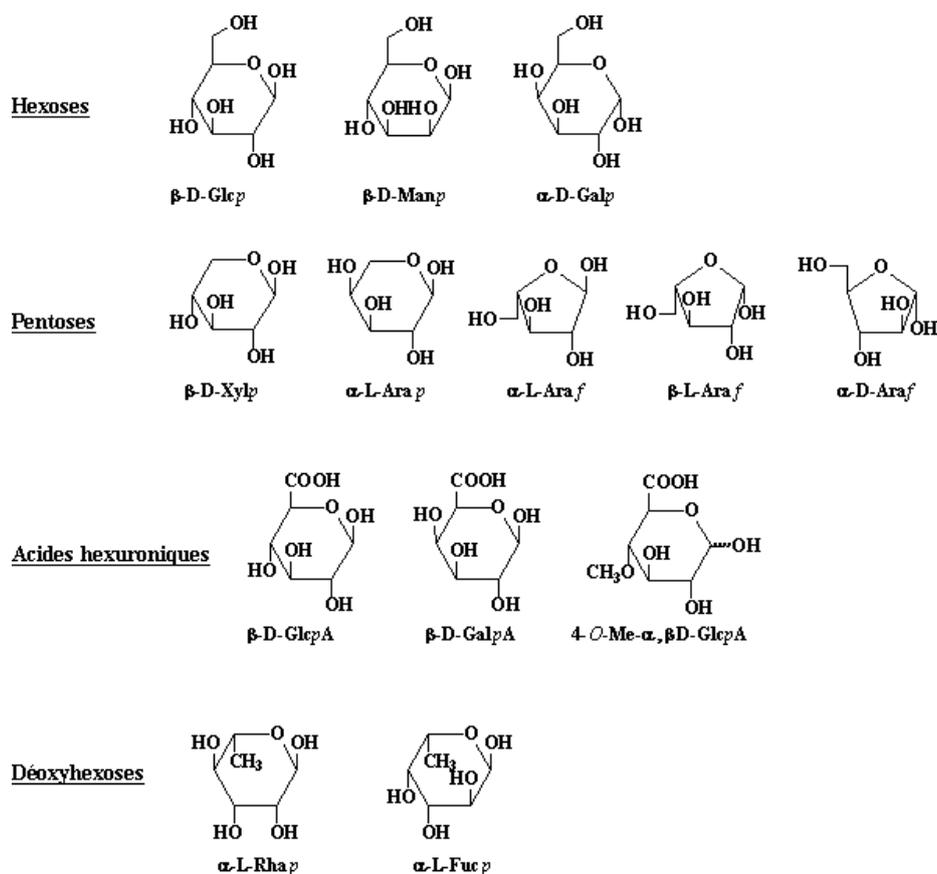


Figure I. 4. Principaux glucides constituant l'hémicelluloses [27]

Les unités monomériques sont assemblées en chaînes ramifiées et constituent des macromolécules de nature amorphe [28].

Le xylane, homopolymère constitué de xylose, est le constituant majeur des hémicelluloses (exemple de composition en différents sucre dans la paille de blé dans leTableau 2). La Figure I. 5 représente le schéma d'une molécule de xylane.

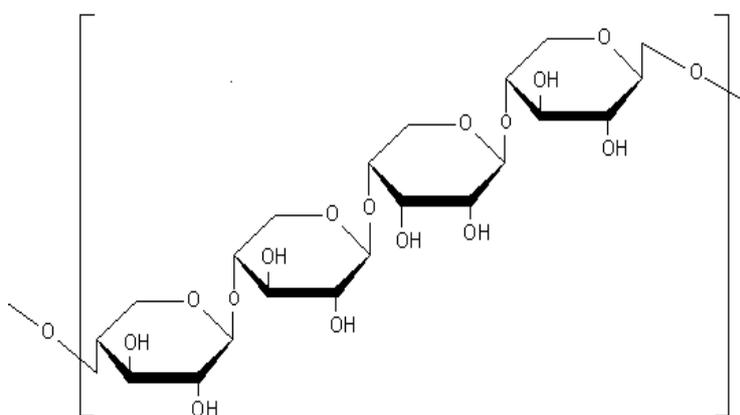


Figure I. 5. Schéma d'une molécule de xylane [27]

La voie biologique pour les biocarburants

Tableau 2. Taux des différents sucres (% relatifs) et acide uronique (%) constitutifs des hémicelluloses de paille de blé [29]

Sugars/uronic acid	Hemicellulose B	
	>300 μm TMP fiber	\leq 300 μm TMP fiber
Arabinose	10.0	10.8
Xylose	83.1	82.6
Mannose	0.5	0.5
Galactose	4.0	3.8
Glucose	2.4	2.3
Uronic acid	4.2	5.3

Comparé à la cellulose, les hémicelluloses présentent de plus petites chaînes amorphes, ce qui facilite leur hydrolyse. En effet, les hémicelluloses sont solubles dans l'eau et peuvent être extraites de la paroi des cellules végétales par des solutions acides.

I.2.1.3 La lignine

La lignine est le troisième polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose [30], et constitue le seul groupe de polymères biosynthétisés à squelette aromatique.

Le taux de lignine dans les végétaux varie selon la provenance et c'est le bois tendre qui en contient la plus grande quantité avec 25-35% massique, suivie par le bois dur avec 20-25%. Les résidus agricoles contiennent le moins de lignine avec 5-15%.

La lignine est polymérisée à partir de trois monomères phénylpropanoïdes, les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique, qui sont aussi connus comme monolignols H, G et S respectivement (Figure I. 6).

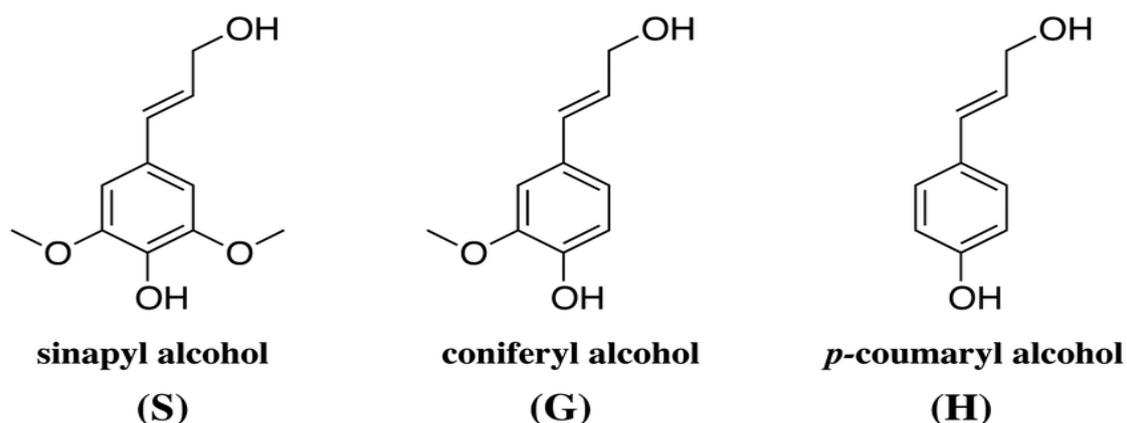


Figure I. 6. Les trois principaux monomères qui composent la lignine [31]

La voie biologique pour les biocarburants

Dans la lignine de paille de blé, le taux de chaque unité phénolique de la lignine est le suivant [32]

- H = 5%
- G = 49%
- S = 46%

I.2.1.4 Les cendres contenues dans la biomasse

Les cendres sont principalement composées de calcium de potassium, sodium magnésium, fer, soufre, chlore, phosphore et silicium. Elles représentent environ 1% de la masse totale de la biomasse lignocellulosique. Cependant ce taux atteint 7,7% de la masse totale dans le cas de la paille de blé [33].

I.2.2 Étapes de fabrication des biocarburants de 2ème génération

La fabrication des biocarburants à partir de la biomasse lignocellulosique nécessite donc la mise en œuvre de trois étapes :



Le prétraitement a pour objectif la destruction de l'organisation cristalline de la matière lignocellulosique. L'étape d'hydrolyse quant à elle a pour but de transformer les chaînes de polymères complexe en sucre simple. Enfin, l'étape de fermentation, consiste à convertir les sucres en éthanol.

I.2.2.1 Le prétraitement

Comme indiqué précédemment, la lignocellulose est une matière très récalcitrante à l'hydrolyse; c'est pour cela qu'un prétraitement est requis avant l'étape d'hydrolyse [34]. Ce prétraitement a pour objectif de désorganiser la structure cristalline des macro et microfibrilles lignocellulosique, afin d'augmenter la surface des pores et ainsi rendre la cellulose plus accessible aux enzymes [35] [36]. La subtilité de ce prétraitement réside dans la nécessité de ne pas dégrader les sucres de l'hémicellulose car cette dégradation conduit à une formation d'inhibiteurs de la fermentation [13] et ainsi abaisse le rendement global du procédé de production du bioéthanol.

La voie biologique pour les biocarburants

Même si le prétraitement représente plus de 20% du coût total de fabrication du bioéthanol [37][38], cette étape est incontournable car elle permet d'augmenter le rendement d'hydrolyse de 20% (sans prétraitement) jusqu'à plus de 90% avec prétraitement [39][40].

Le procédé de prétraitement diffère considérablement d'une matière lignocellulosique à une autre en raison des variations de leurs propriétés physico-chimiques [34][41]. Plusieurs méthodes de prétraitement ont été développées.

1.2.2.1.1 Le prétraitement mécanique

Le prétraitement mécanique consiste à réduire la taille des particules constituant la biomasse afin de réduire la cristallinité de la lignocellulose et d'augmenter les surfaces accessibles et ainsi favoriser l'hydrolyse ultérieure. Généralement, c'est un broyage intense de la matière lignocellulosique jusqu'à l'obtention de fragments de moins de 2 mm.

Cependant, des études sur des substrats micronisés montrent de meilleurs résultats que ceux obtenus pour des substrats broyés.

La micronisation permet d'augmenter le rendement de façon significative. En effet, Ibrahim [42] a montré qu'un prétraitement jusqu'à l'obtention d'une granulométrie 53-149 μ m augmente le rendement de 39% pour le glucose et 20% pour le xylose après 24h d'hydrolyse comparé au même substrat simplement broyé de granulométrie 2-4 cm.

Telebnia et al [36], ont quant à eux montré que le rendement de l'hydrolyse enzymatique pour un échantillon micronisé est de 61,1% alors qu'il n'est que de 17,1% pour un échantillon non prétraité.

Enfin, ce traitement ne produit pas d'inhibiteurs des levures responsables de la fermentation ultérieure tels que le furfural [38] qui se forme lors de la dégradation chimique des hémicelluloses et des composés phénoliques qui eux sont formés lors de la dégradation de la lignine [44].

1.2.2.1.2 Prétraitement physico-chimique

La solubilité des différents composés de la lignocellulose dépend de la température, du pH et de l'humidité du matériau. Les procédés physico-chimiques jouent sur ces paramètres. L'hémicellulose est la fraction la plus sensible à la chaleur et aux attaques

La voie biologique pour les biocarburants

chimiques, elle est en partie solubilisée dans de l'eau à 150°C [42], parmi ces procédés physico-chimiques on trouve :

- L'explosion à la vapeur qui consiste à chauffer rapidement le substrat par injection de vapeur saturée à haute pression puis à l'amener à pression atmosphérique par une détente brutale, qui désintègre la matière [36][45][46]. Elle est généralement effectuée dans une gamme de températures de 160 à 260 °C et une gamme de pression de 0,69 à 4,83 MPa [13] [47]. Ce type de prétraitement, a un faible coût d'investissement, a un impact moindre sur l'environnement et permet l'extraction totale des sucres [13][48]. Cependant, au cours de ce procédé, développé industriellement, une partie des pentoses et de la lignine est dégradée, ce qui entraîne une perte de rendement et la formation d'inhibiteurs de fermentation.
- Le procédé hydrothermal (liquid hot water) est l'un des prétraitements appliqué à la lignocellulose depuis plusieurs décennies. Il consiste à faire bouillir la lignocellulose dans l'eau sous pression ($T= 170-230^{\circ}\text{C}$ et $P > 5\text{MPa}$) [49][36] [50]. Il a un taux de récupération élevé en sucres d'hémicellulose de (88 à 98% (30)) et n'entraîne pas la production d'inhibiteurs à condition de maintenir le pH entre 4 et 7. La température et le temps de réaction sont les deux paramètres qui ont le plus d'impact sur ce prétraitement. Pérez et al (2008) [51], ont démontré, que pour la paille de blé, une quantité maximale d'hémicellulose est récupérée pour une température de 188°C et un temps d'exposition de 40 min.

1.2.2.1.3 Prétraitement chimique

Lors de ces prétraitements, différents réactifs chimiques tels que acides, bases et agents oxydants sont utilisés. Selon le réactif chimique utilisé, l'impact sur la matière lignocellulosique est différent. L'enjeu majeur des ces procédés de prétraitements est de rendre la cellulose facilement accessible tout en évitant des conditions trop sévères susceptibles d'entraîner la dégradation des sucres.

- L'hydrolyse à l'acide est le procédé le plus utilisé et peut être utilisé soit comme prétraitement avant l'hydrolyse enzymatique dans le cas de l'utilisation d'acides dilués, soit comme méthode d'hydrolyse directe de la lignocellulose en sucres fermentescibles dans le cas d'utilisation d'acide fort [47].

La voie biologique pour les biocarburants

Lors du prétraitement, un acide inorganique tels que l'acide sulfurique, nitrique ou chlorhydrique, est utilisé dilué (0,5-3%) pour solubiliser l'hémicellulose en monomères et augmenter ainsi la digestibilité de la cellulose par les enzymes [52].

Ce procédé de prétraitement a l'avantage d'avoir un rendement élevé de conversion du xylane en xylose [47]. Toutefois, ce procédé produit des inhibiteurs tels que l'acide acétique, le furfural et le 5-hydroxymethylfurfural [50], de plus il est nécessaire de neutraliser le pH avant l'étape d'hydrolyse [53].

- Le prétraitement en milieu alcalin vise à solubiliser la lignine et une partie des hémicelluloses. Cela induit un gonflement des fibres et rend ainsi la cellulose plus accessible aux enzymes[53].

Du sodium, du potassium, ou bien encore du calcium peuvent être utilisés même si l'hydroxyde de sodium est le plus utilisé. Ce procédé de prétraitement s'effectue à basse température et pression comparé aux autres techniques de prétraitement [54].

Ce prétraitement est efficace pour les résidus agricoles comme la paille de blé [49] parce qu'il peut largement augmenter la digestibilité de la cellulose et ne dégrade pas autant l'hémicellulose que le traitement à l'acide. Cependant, son application est entravée par le coût élevé des réactifs utilisés.

I.2.2.1.4 Prétraitement biologique

C'est un procédé de délignification qui utilise des enzymes de type peroxydases et laccases ou des champignons de pourriture blanche. Ce sont ces derniers qui semblent être les plus efficaces pour causer la dégradation de la matière lignocellulosique [55] [56].

Des paramètres tels que le type de biomasse, la taille des particules, la teneur en humidité, la température ainsi que le type de microorganismes peuvent affecter l'efficacité de ce prétraitement.

Wan et al (2010) [57] ont étudié les effets de la taille des particules lignocellulosiques, de leur teneur en eau, du temps de prétraitement, et de la température sur la dégradation de la lignine et le rendement de l'hydrolyse enzymatique de la canne de maïs en utilisant le champignon *Ceriporiopsis subvermispora*. Le rendement le plus élevé en glucose global est de 66,61%, et a été obtenu à 28 ° C avec la teneur en humidité de 75% et la taille des particules de 5 mm, et pour une durée de 38 jours.

La voie biologique pour les biocarburants

Les avantages que présentent le prétraitement biologique sont le bas coût énergétique et le faible impact sur l'environnement [58]. Cependant, son utilisation reste actuellement limitée à une échelle laboratoire du fait du coût élevé des enzymes d'une part et la lenteur des réactions d'autre part [13][59] [56].

Pour résumer, le prétraitement est une étape incontournable pour la fabrication du bioéthanol, mais il n'existe pas de procédé qui rassemble à ce jour toutes les qualités : rapidité, faible coût, accessibilité optimale.

Cependant, les techniques les plus attrayantes semble être l'explosion à la vapeur, la thermo-hydrolyse et le prétraitement à l'acide dilué [59]. De plus, il est possible de combiner 2 ou 3 techniques de prétraitement pour améliorer le rendement en éthanol. Par exemple, Chen et al (2008) [48] ont couplé l'explosion à la vapeur avec le traitement peroxyde alcalin.

I.2.2.2 Hydrolyse de la biomasse lignocellulosique

La fabrication du bioéthanol nécessite une étape d'hydrolyse qui a pour objectif de dépolymériser la cellulose et/ou l'hémicellulose en sucres simples fermentescibles.

A cause de sa structure cristalline, l'hydrolyse de la cellulose est plus difficile que celle de l'hémicellulose. Par conséquent, l'hydrolyse de la cellulose nécessite d'être catalysée soit par un acide, on l'appelle alors hydrolyse chimique, soit par des enzymes spécifiques, on l'appelle alors hydrolyse enzymatique (appelée aussi hydrolyse biochimique ou saccharification) [60].

I.2.2.2.1 Hydrolyse chimique

Deux procédés d'hydrolyse chimique ont été développés:

- L'hydrolyse à l'acide dilué est un procédé qui utilise de l'acide sulfurique à une concentration de 1 à 3% pendant une courte période de l'ordre de 3 min et des températures de 180 à 240°C. Le rendement maximal en glucose atteint dans l'hydrolysate reste faible et est de 60%, de plus, une grande partie des pentoses est transformée en furfural. C'est dans le but d'améliorer le rendement et de palier le problème des inhibiteurs, que l'hydrolyse en 2 étapes à été mise en place. En effet, une première étape à 140-160°C où seule les hémicellulose sont solubilisées et une deuxième étape à 160-180°C lors de laquelle la cellulose est transformée. Le taux de récupération des sucres peut alors atteindre un maximum de 80%.

La voie biologique pour les biocarburants

- L'hydrolyse à l'acide fort est également un procédé à deux étapes mais cette fois-ci, l'acide utilisé à une concentration de 20 à 40%, à des températures plus faibles (de 50 à 100°C). Ce procédé présente l'avantage d'atteindre un rendement de 90% de récupération des sucres, mais nécessite un coût d'investissement plus élevé pour faire face à la corrosion et au recyclage de l'acide [40].

Actuellement, à cause du prix des réactifs et de la production d'inhibiteurs qui peut impliquer une étape supplémentaire de purification, l'hydrolyse chimique est devenue moins attrayante et peu compétitive.

1.2.2.2 Hydrolyse enzymatique

Les enzymes sont généralement des protéines de masses moléculaires élevées (million de Dalton) ce sont des catalyseurs biologiques hautement spécifiques, polyvalents et très efficaces donnant des taux de conversion beaucoup plus élevés par rapport aux réactions catalysées chimiquement dans des conditions ambiantes.

L'hydrolyse enzymatique des polysaccharides est la transformation biochimique de la cellulose et des hémicelluloses en sucres simples par des enzymes sécrétées par des microorganismes (bactéries et champignons). Des enzymes hautement spécifiques favorisent à 100% la transformation de la cellulose en glucose sans formation de produits indésirables (inhibiteurs), ce qui rend ce procédé très attractif par rapport à l'hydrolyse chimique [61]. De plus, les conditions opératoires moins agressives (50°C, pH 5) que l'hydrolyse chimique n'entraînent pas de problème de corrosion des installations.

Même si cette technique présente des perspectives d'amélioration plus grandes que l'hydrolyse chimique qui a fait l'objet de recherche depuis plusieurs décennies [59][62], l'hydrolyse enzymatique est actuellement considérée comme l'un des deux verrous majeurs de la filière de transformation de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol par voie biologique au coté de la mauvaise valorisation en éthanol des sucres issus de la fragmentation des hémicelluloses [63] . En effet, le coût de production des enzymes et la quantité nécessaire à la transformation de la matière lignocellulosique du fait du manque d'efficacité de l'hydrolyse enzymatique de cette matière complexe est un frein au développement du bioéthanol de 2^{ème} génération.

C'est pour cela que les efforts de recherche et développement ont été axés sur la réduction des coûts des enzymes en améliorant l'activité des enzymes ou en proposant de

La voie biologique pour les biocarburants

nouveaux cocktails cellulolytiques et essayer ainsi d'atteindre ou de rapprocher le niveau de rendement et de coût que pour l'étape d'hydrolyse enzymatique des amylicées (substrat utilisé pour la production d'éthanol de 1^{ère} génération).

Enfin, d'après Broust *et al* (2013) [62], la viabilité économique du bioéthanol ligocellulosique dépend principalement de l'amélioration de l'étape d'hydrolyse enzymatique.

(a) *Paramètres influant l'hydrolyse enzymatique*

Du fait de leur nature protéique, les cellulases sont très sensibles à la température. En effet, une des études menée sur ce sujet, a montré qu'après 5h d'incubation à différentes températures, ces enzymes sont stables jusqu'à une température de 37°C et qu'elles perdent 20 % de leurs activités entre 37 et 50°C. Au-delà de 50°C l'activité décroît brusquement pour n'avoir presque plus d'activité au-dessus de 70°C [64].

Par ailleurs, Pardo *et al* [65] ont montré que la température optimale pour l'activité du système de cellulase se situait entre 50 et 55 °C, avec un optimum de stabilité entre 23 °C et 37°C après une période d'incubation de 72 h.

La concentration en substrat a aussi une influence sur la cinétique d'hydrolyse enzymatique ; une trop grande quantité peut inhiber l'enzyme et ralentir ainsi la cinétique [66]. L'étendue de cette inhibition par substrat dépend du rapport de la quantité d'enzymes sur la quantité de substrat [67].

Par ailleurs les cellulases sont inhibées par leurs propres produits (inhibition par les produits) ici le cellobiose et le glucose [15][44].

Le substrat lignocellulosique étant complexe, il ne peut être hydrolysé par une seule enzyme, c'est pour cela qu'un cocktail enzymatique est souvent utilisé.

(b) *Hydrolyse de la cellulose*

L'hydrolyse de la cellulose est réalisée grâce à la cellulase. Les cellulases produites à partir de plusieurs bactéries tels que *Bacillus subtilis* et *E. coli* sont un ensemble d'enzymes qui mises en contact avec la cellulose attaquent la liaison glucosidique β _1,4 de la cellulose et libèrent ainsi le glucose. C'est un processus complexe dont la compréhension reste incomplète. Néanmoins, trois types d'activités enzymatiques complémentaires sont reportés [46], schématisés dans la Figure I. 7 et explicités ci-dessous.

La voie biologique pour les biocarburants

- Les exoglucanases ou cellobiohydrolase (CBH) agissent sur la cellulose hydrolysant à partir des extrémités réductrices (type I ou CBHI) ou à partir des extrémités non réductrices (type II ou CBHII) pour libérer du cellobiose et du glucose. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline.
- Les endoglucanases (EG) opèrent de façon aléatoire sur les zones amorphes de la cellulose générant des oligosaccharides de différentes tailles et créant ainsi des sites d'attaque supplémentaires pour les exoglucanases.

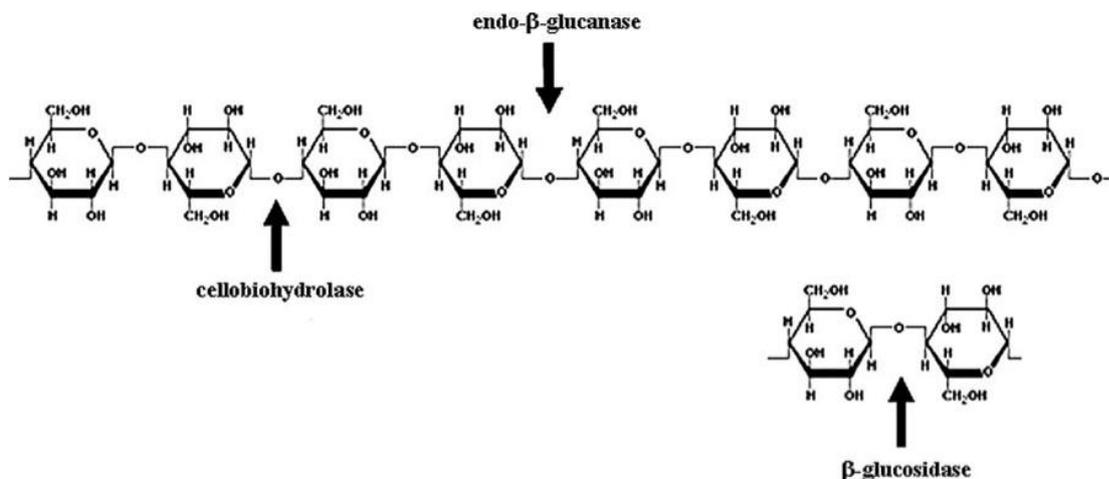


Figure I. 7. Schéma du mécanisme d'action de la cellulase sur la cellulose [68]

- Les β -glucosidases ou cellobiases hydrolysent le cellobiose et les cello-oligosaccharides (degré de polymérisation inférieur à 6) pour générer le glucose. Ces enzymes n'hydrolysent pas la cellulose non soluble (DP supérieur à 6) [69].

En plus de leur complémentarité, ces enzymes présentent une grande synergie ce qui signifie que leur activité commune est plus grande que la somme de leurs activités [70].

Les conditions optimales pour l'action des cellulases sont, une température de 45 à 50°C et un pH de 4,8. Le temps d'action, lui, dépend de la quantité de l'enzyme utilisée et de son activité [71]. Cependant Tengborg et al (2001) [72], ont montré que la température optimale est dépendante du temps de contact ou de réaction et qu'une température de 38°C et un pH de 4,9 sont les conditions optimales pour un temps d'hydrolyse plus long (144 h).

Le rapport quantité de substrat sur la quantité d'enzyme est le facteur limitant du rendement et de la vitesse initiale de l'hydrolyse de la cellulose par la cellulase en lien avec un problème d'inhibition d'une part [67] et un problème d'agitation et de transfert de matière

La voie biologique pour les biocarburants

d'autre part. L'augmentation de la quantité de cellulase augmente le rendement et la vitesse d'hydrolyse mais cet ajout augmente aussi le coût du procédé. Par conséquent, on utilise généralement de 5 à 35 UFP /g de substrat [66].

(c) Hydrolyse de l'hémicellulose

L'hydrolyse de l'hémicellulose a été moins étudiée que celle de la cellulose, mais son intérêt n'est pas moindre puisque la matière lignocellulosique en contient une quantité importante qui peut être transformée en bioéthanol.

Vue la composition variée de l'hémicellulose, un cocktail enzymatique également varié appelé hémicellulase, est nécessaire pour son hydrolyse. Ce cocktail est constitué entre autres des enzymes suivantes : endoxylyanase, exoxylyanase, β -xylosidase, α -arabinofuranosidase, acetyl xylane estérase [13]. Mais les plus importantes sont les 3 premières citées. L'endoxylyanase a pour fonction de couper le xylane en oligomères plus petits et la β -xylosidase transforme le xylo-oligomère en xylose [73]. La Figure I. 8 montre les étapes d'hydrolyse du xylane en xylose

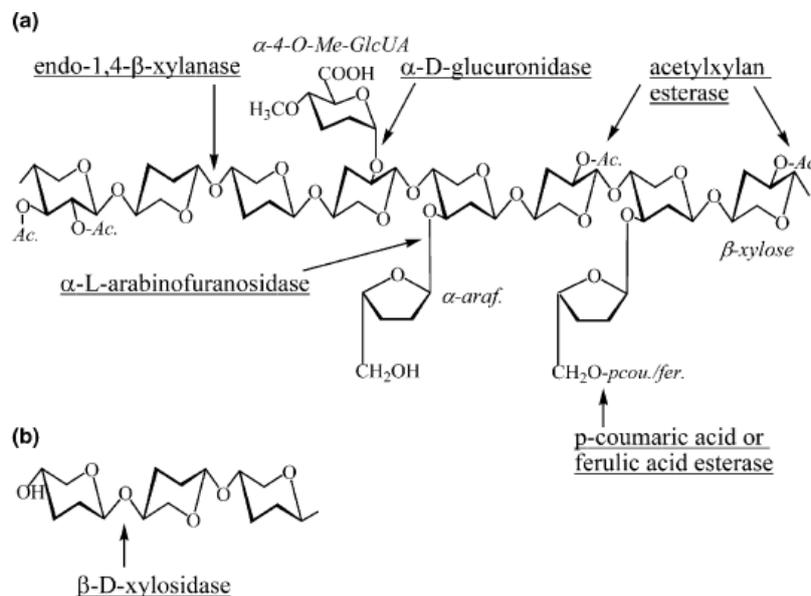


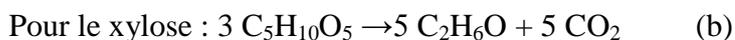
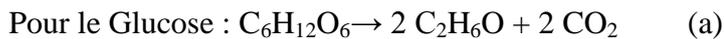
Figure I. 8. Schéma du mécanisme d'action de la xylanase sur le xylane [74]

La voie biologique pour les biocarburants

I.2.2.3 La fermentation

La fermentation est un processus biologique catalysé par des enzymes sécrétées par des microorganismes qui transforment les sucres simples en molécules plus petites telles que les acides et alcools.

La fermentation en ethanol des deux sucres les plus répandus se fait selon les deux réactions suivantes :



Il existe un grand nombre de bactéries et de levures qui sont capables de fermenter ces sucres qui sont nécessaires à leurs métabolismes et leur reproduction. *Saccharomyces cerevisiae* et *Zymomonas mobilis* sont les deux espèces actuellement utilisées à l'échelle industrielle pour la production d'éthanol.

Saccharomyces cerevisiae est l'espèce la plus utilisée et étudiée pour la production du bioéthanol car elle est robuste et adaptée à la fermentation du glucose issu de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique . Cependant, elle n'est pas capable de fermenter les pentoses issus de l'hydrolyse des hémicelluloses leur fermentation nécessite donc d'autres microorganismes fermentaires [75].

Même si *Zymomonas mobilis* a un meilleur rendement et une meilleur productivité car elle produit moins de biomasse et qu'elle a un métabolisme plus intensif, elle est moins utilisée car plus sensible aux contaminations [76].

Par ailleurs, en plus du besoin en substrat énergétique carboné nécessaire à l'ensemble du métabolisme de fermentation, la fermentation alcoolique nécessite un milieu riche en nutriment tel que l'azote, le soufre et le phosphore qui non seulement assurent la synthèse des composants cellulaire mais aussi influent sur la productivité ainsi que la tolérance du microorganisme au stress causé par l'éthanol et/ou par le substrat.

D'autre part, des paramètres physicochimiques tels que le pH et la température influent sur la fermentation [77]. Ainsi, la température optimale de production d'éthanol pour *Saccharomyces cerevisiae* est de 33°C [78]. En ce qui concerne le pH, la production d'éthanol optimale se situe entre 4,0 et 4,8 [79].

La voie biologique pour les biocarburants

L'éthanol produit lors de la fermentation devient toxique pour les levures, et les effets inhibiteurs de ce dernier apparaissent à partir d'une concentration de 7% (v/v) [80].

Le rendement théorique maximal de fermentation du glucose en éthanol calculé à partir de l'équation (a), appelé aussi rendement de Gay-Lussac, est de 0.511 g d'éthanol /g glucose. Ce rendement ne tient pas compte des pertes en sucre nécessaires à la production de biomasse et la transformation du glucose en glycérol et en d'autres produits.

En tenant compte de ces pertes le rendement maximal est estimé à 94,7% du rendement de Gay-Lussac soit 0,484 g d'éthanol /g glucose. Ce rendement est aussi appelé rendement de Pasteur.

I.2.3 Procédés de fabrication du bioéthanol

La biomasse lignocellulosique peut être convertie en éthanol par la voie biochimique en suivant plusieurs schémas lors desquels l'hydrolyse et la fermentation sont réalisées dans le même réacteur ou séparément

I.2.3.1 Hydrolyse et fermentation séparée (SHF)

Dans ce procédé, les réactions d'hydrolyse et de fermentation sont effectuées dans deux réacteurs distincts et en deux temps (Figure I. 9). Ce procédé a l'avantage de proposer des conditions optimales de travail pour l'hydrolyse et pour la fermentation. En effet et comme indiqué précédemment, les températures optimales pour les deux étapes sont différentes, elle est de 45 à 50°C pour la cellulase (hydrolyse) et de 30 à 37°C pour les microorganismes qui produisent l'éthanol (fermentation) [66]. Mais ce procédé présente aussi des inconvénients, comme, l'inhibition de la cellulase par la cellulose et le glucose. En effet, il a été montré qu'une teneur accrue en glucose dans l'hydrolysate entraîne une augmentation des degrés d'inhibition de la β -glucosidase et de la cellulase [81] [82][83][84].

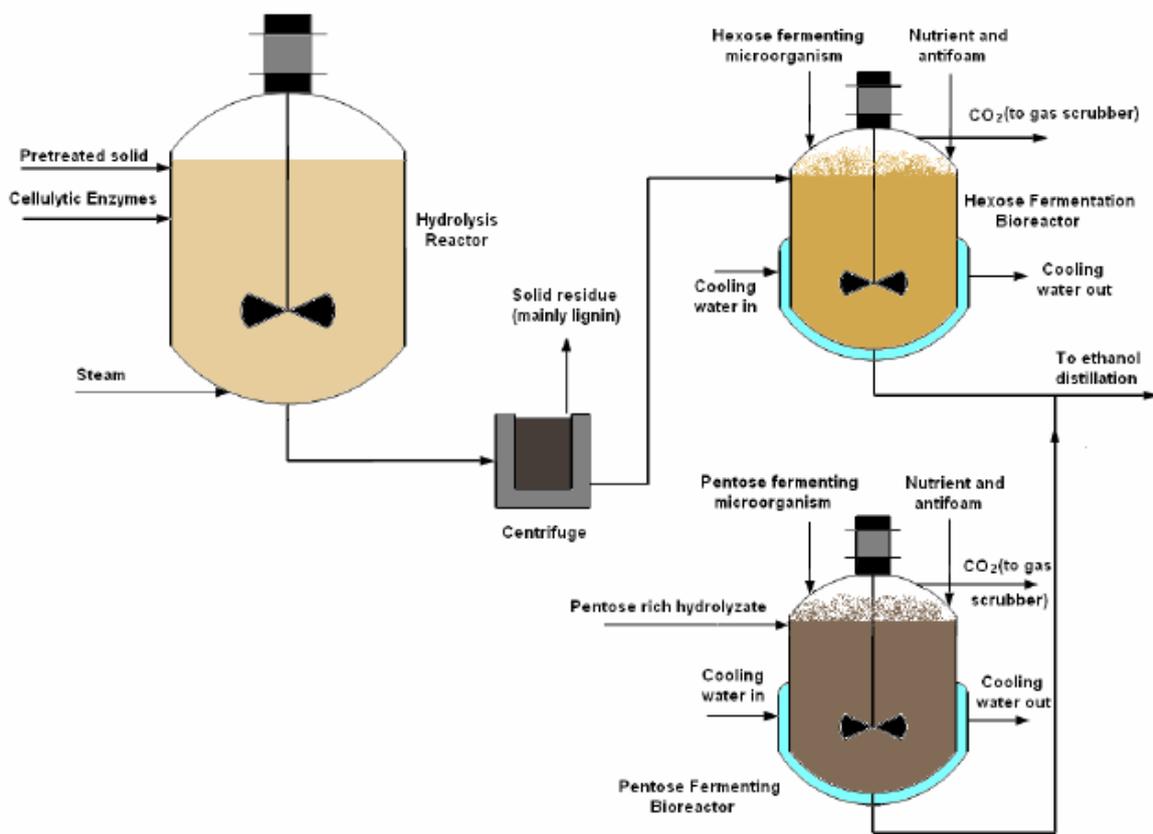


Figure I. 9. Schéma du procédé d'hydrolyse et fermentation séparée (SHF) [66]

L'augmentation de l'investissement nécessaire à la réalisation de ce procédé est aussi évoquée en raison de l'utilisation de deux réacteurs [83] bien que ce 2^{ème} réacteur ne soit pas toujours nécessaire et ce en travaillant en mode discontinu.

Cependant, le procédé SHF offre la possibilité de recycler les levures de fermentation ce qui n'est pas toujours possible avec les autres procédés [85].

I.2.3.2 Saccharification et fermentation simultanée (SSF)

Ce procédé est le plus utilisé. Il consiste à effectuer les deux étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation éthanolique, dans un même réacteur et en même temps (Figure I. 10). Il présente plusieurs avantages, coûts d'investissement moindre par rapport au précédent présenté (un seul réacteur), les sucres sont fermentés immédiatement après leur production, les risques d'inhibition des enzymes par les produits terminaux d'hydrolyse (glucose et cellobiose) ainsi que les risques de contamination sont donc réduits [15].

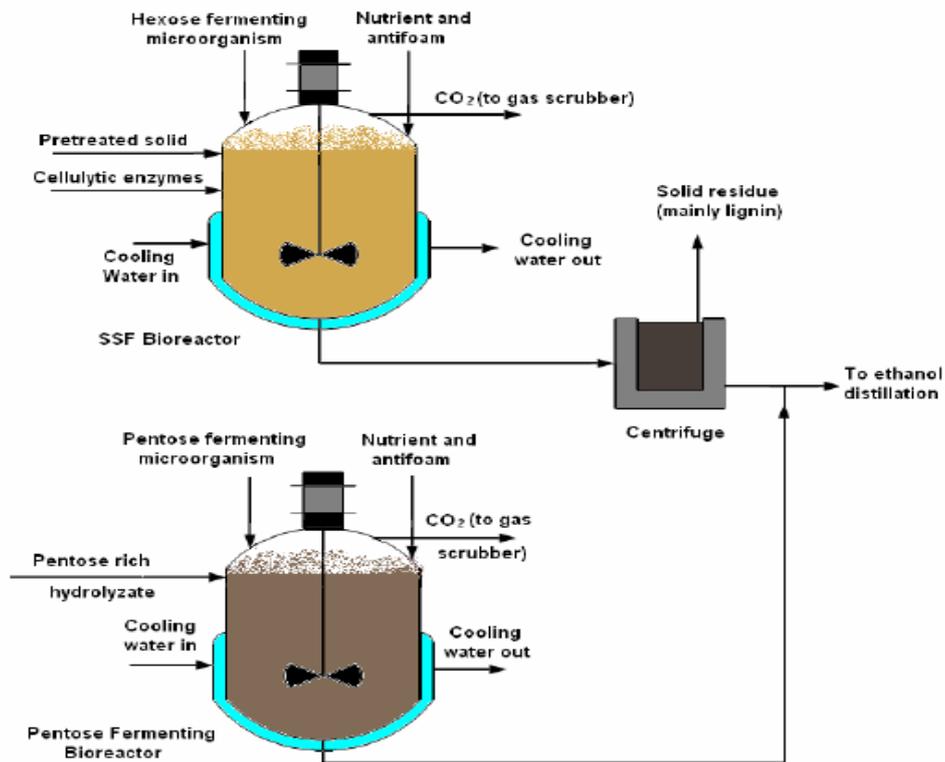


Figure I. 10 Schéma simplifié du procédé de saccharification et fermentation simultanée (SSF) [66]

L'inconvénient majeur que présente le procédé SSF réside dans le rendement enzymatique qui n'est pas maximal car la température utilisée lors de ce procédé est inférieure à la température optimale de travail des enzymes ($< 37^{\circ}\text{C}$) afin de ne pas détruire les levures [13]. Pour résoudre ce problème, des levures thermophiles ont été utilisées par plusieurs auteurs notamment par Krishna et al [81].

Par ailleurs, Triwahyuni et al (2015) [86] ont montré qu'une importante charge peut être traitée en introduisant le substrat progressivement. En effet, cette technique permet d'obtenir une concentration de 83.40 g/l d'éthanol en utilisant un titre en substrat de 25% (g/mL).

Hydrolyse et fermentation séparée (SHF) et saccharification et fermentation simultanées (SSF) sont les deux configurations principales des procédés pour la production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Globalement le procédé de saccharification et fermentation simultanée est réputé être meilleur que le procédé d'hydrolyse et fermentation séparée tant pour le rendement que pour la concentration en éthanol obtenue [87].

La voie biologique pour les biocarburants

T. Niklitschek *et al* (2010) [88] ont comparé les deux procédés SSF et SHF pour différentes concentrations en substrat et ont observé que, dans tous les cas, la concentration en éthanol était plus élevée pour le procédé SSF dans des conditions similaires avec une productivité en éthanol de 0.34 g/L.h.

Rana *et al* (2014) [89] ont aussi comparé ces deux procédés en utilisant deux substrats différents et ont conclu que quels que soient les conditions et le substrat, le rendement en éthanol est meilleur pour le procédé SSF par rapport au procédé SHF.

Cantarella *et al* (2004) [90] ont, eux, obtenu un meilleur rendement avec le procédé SHF (à 45°C pour l'étape d'hydrolyse et 35°C pour l'étape de fermentation) avec 92% de la valeur théorique mais le temps de traitement du procédé SSF (à 35°C) était plus court (24-38 h) que celui du procédé SHF (\approx 100 h), ce qui conduit à une productivité en éthanol meilleure dans le processus SSF (de 0,64 à 1,08 g / 1 h pour SSF et de 0,11 à 0.37 g / 1 h pour SHF).

I.2.3.3 Pré hydrolyse saccharification et fermentation simultanée (PSSF)

C'est dans le but de palier le problème rencontré lors du procédé SSF d'une hydrolyse à une plus faible température que la température optimale que ce procédé a été développé. En effet le procédé PSSF correspond au procédé SSF auquel on a apporté des améliorations pour s'affranchir du problème de la température d'hydrolyse. Lors de ce processus une certaine quantité d'enzyme effectue une pré hydrolyse à la température optimale de 50°C pendant une durée de 24h puis la température est abaissée à 35°C environ et la levure est ajoutée à ce même réacteur [91]. Cela permet une augmentation de 2 à 3 de l'activité des cellulases par rapport à une hydrolyse à 30°C ce qui permet de réduire de 30 à 40% la quantité d'enzyme utilisée [92].

Mesa *et al* (2011) [93], ont comparé les trois procédés. Les meilleurs rendements en éthanol obtenus sont de 81,6, 59,4 et 68,4% du glucose théorique dans la matière sèche respectivement pour les procédés SHF (Hydrolyse 50°C pendant 24h, fermentation 35°C pendant 12h, SSF(à 35°C pendant 24 h) et PSSF (pré hydrolyse à 50°C pendant 10 h puis ssf à 35°C pendant 24 h).

Une autre étude a montré que l'utilisation du procédé PSSF permet de traiter jusqu'à 23% en matière sèche et de produire 31,1g/l d'éthanol alors que le procédé SSF ne permet le

La voie biologique pour les biocarburants

traitement que de 17% en matière sèche avec un rendement de 19,7g/l et ce en effectuant un prétraitement hydrothermal [91].

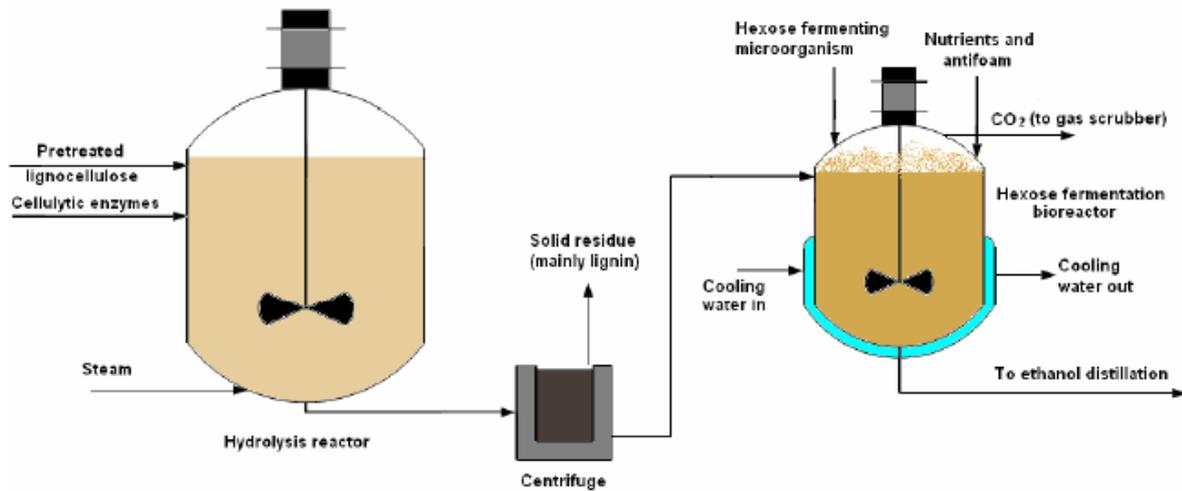


Figure I. 11. Pré hydrolyse saccharification et fermentation simultanée (PSSF) [66]

I.2.3.4 Saccharification et co-fermentation simultanée (SSCF)

A ce jour, la plus part des procédés rejettent le xylose ou réalisent la fermentation en deux étapes. Dans le but de réduire davantage les coûts d'investissement, le procédé SSCF est utilisé. En effet ce procédé permet d'effectuer les étapes d'hydrolyse et fermentation des deux sucres, glucose et xylose, simultanément et dans le même réacteur (Figure I. 12).

Ce procédé requiert donc l'utilisation de microorganismes capables d'assimiler les deux sucres avec un rendement élevé. Si la levure *Saccharomyces cerevisiae* est bien connue pour la fermentation du glucose, celle-ci a un rendement médiocre pour la fermentation du xylose.

Plusieurs études ont été menées dans le but d'améliorer ce rendement et ont abouti au développement de microorganismes et de techniques qui fermentent plus au moins le glucose et le xylose. Ainsi, des chercheurs en ingénierie génétique tentent d'améliorer ce rendement en insérant certaines voies métaboliques des pentoses dans les levures. Ohgren et al (2006) [94] ont utilisé une souche recombinée TMB3400 de *S.cerevisiae* et l'ont comparé à la souche industrielle mère. La souche recombinée a permis d'augmenter le rendement en éthanol de 54 à 64% dans un réacteur batch et ce sans détoxification préalable. Lors de la même étude, ces

La voie biologique pour les biocarburants

auteurs ont démontré que la concentration du glucose influe sur la consommation de xylose et que le mode fed batch est indiqué pour éviter l'accumulation de glucose.

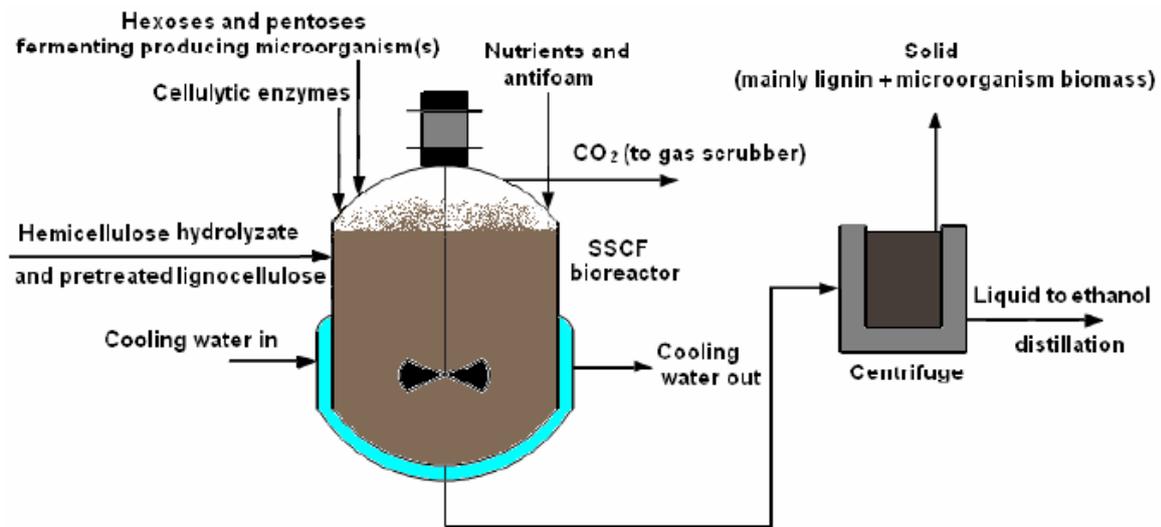


Figure I. 12. Schéma simplifié du procédé de saccharification et co-fermentation simultanée (SSCF)[66]

I.2.3.5 La conversion directe (consolidate bioprocessing) (CBP)

La conversion directe est un procédé qui s'effectue en une seule étape Figure I. 13. En effet, ce procédé intègre la production d'enzyme, la saccharification et la fermentation par un micro-organisme spécial ou consortium microbien en un seul processus sans nécessiter le prétraitement du substrat même si un certain nombre d'auteurs ont étiqueté leurs procédés comme étant CBP alors qu'un prétraitement du substrat a été effectué où des enzymes ont été ajoutées [95] [96].

Ce procédé est attrayant car il permet de réduire le nombre de réacteurs, simplifie les opérations et ainsi augmente la compétitivité du bioéthanol lignocellulosique. Ceci nécessite toutefois la conception d'un micro-organisme / consortium microbien approprié ce qui reste un verrou technologique [84].

La voie biologique pour les biocarburants

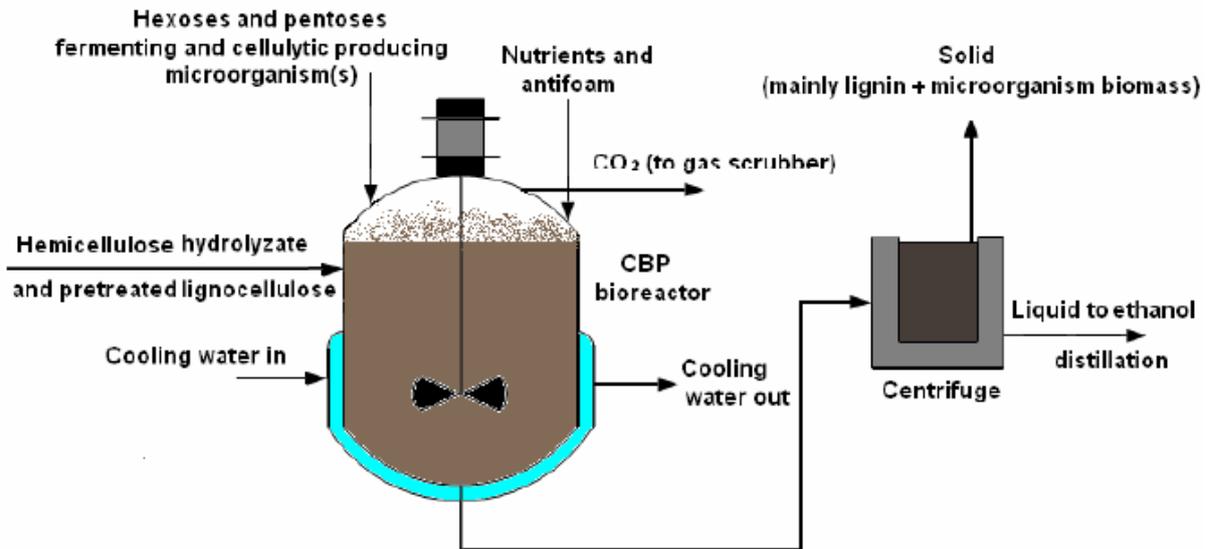


Figure I. 13. Schéma du procédé d'hydrolyse et fermentation directe (CBP) [66]

Le Tableau 3 résume quelques exemples de procédés appliqués à la paille de blé et les résultats obtenus.

Tableau 3. Résultats de quelques procédés appliqués à la paille

Procédés	Prétraitement	Biomasse $\frac{g_{\text{biomasse}}}{g_{\text{tampon}}}$ %	Rendement en éthanol %	Productivité en éthanol $\frac{g_{\text{éthano}}}{L_{\text{tampon}} \cdot h}$	Auteur
SHF	Explosion à la vapeur	2,5-10	81	0,313	[97]
	hydrothermal	30	73,1	0,36	[98]
SSF	Explosion à la vapeur	2,5-10	68	0,837	[97]
	hydrothermal	2	85,71	/	[99]
SSCF	Explosion à la vapeur	10	43	0,7	[100]
CBP	Hydrolyse à l'acide	10	63	0,27	[101]

Le Tableau 3 montre que pour le même type de prétraitement donné et une concentration en substrat du même ordre de grandeur, la meilleure productivité est observée dans le cas du procédé SSF tandis que le meilleur rendement de production en éthanol, quant à lui, est obtenu avec le procédé SHF.

La voie biologique pour les biocarburants

Par ailleurs, le rendement le plus élevé est observé lors de l'application du prétraitement hydrothermal conjugué avec le procédé SSF avec un rendement de plus de 85% mais celui-ci n'est pas significatif vu que la charge de départ est très faible (2%).

I.3 conclusions

L'analyse bibliographique sur la production du bioéthanol de 2^{ème} génération a permis de mettre en évidence une très grande variété des expérimentations que ce soit en termes de la matière première utilisée, de prétraitement appliqué ou encore de procédés de transformation mis en œuvre. Il est donc difficile de comparer ces différentes études.

Il apparait que l'un des verrous majeurs pour l'industrialisation du procédé de production du bioéthanol de 2^{ème} génération est l'étape d'hydrolyse. En effet, le coût élevé lié à la fois au procédé de production des enzymes et aux quantités d'enzymes nécessaires pour convertir la biomasse rendent ce bioéthanol peu attractif.

La solution serait donc, d'une part d'améliorer l'efficacité des cocktails enzymatiques en testant d'autres enzymes et de déterminer les conditions opératoires correspondant à ces nouveaux cocktails et d'autre part, une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels régissant l'hydrolyse enzymatique est nécessaire.

Le chapitre suivant est donc consacré à l'étude de la littérature concernant les modèles cinétiques régissant les réactions enzymatique.

II CINETIQUES ENZYMATIQUE PAR CALORIMETRIE ISOTHERME

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

Dans le présent chapitre, dans un premier temps l'étude bibliographique portant sur les modèles cinétiques régissant ces réactions biochimiques sont exposés puis la pertinence de l'utilisation de la calorimétrie isotherme pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique est explicitée.

II.1 Cinétique enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est l'une des étapes clé de la conversion de la biomasse lignocellulosique pour la production des biocarburants de 2ème génération [102]. La viabilité économique de ces biocarburants passe entre autres par la compréhension des mécanismes réactionnels de cette hydrolyse et l'optimisation des conditions opératoires. Pour cela, plusieurs modèles ont été proposés.

II.1.1 Modèle en phase homogène

II.1.1.1 Modèle de Michaelis-Menten en phase homogène

Leonor Michaelis et Maud Menten furent les premiers à proposer une théorie en catalyse enzymatique et ce en 1913.

L'équation proposée est la suivante :

$$v = \frac{V_M \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1) \text{ (équation de Michaelis-Menten)}$$

Avec :

v : vitesse initiale

V_M : vitesse maximale

$[S]$: concentration en substrat

K_m : Constante de Michaelis-Menten

Les constantes cinétiques des réactions enzymatiques sont définies et déterminées comme suit:

La vitesse maximale

La vitesse maximale (Figure II. 1) est la vitesse maximale initiale v atteinte pour la concentration en enzyme $[E]$ et pour une concentration en substrat $[S]$ très grande devant K_m .

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

La constante de Michaelis-Menten

La constante de Michaelis-Menten K_m correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale (absence de produit) est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale $V_{max}/2$. Elle est donc exprimée en mol.L^{-1} . Celle-ci est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

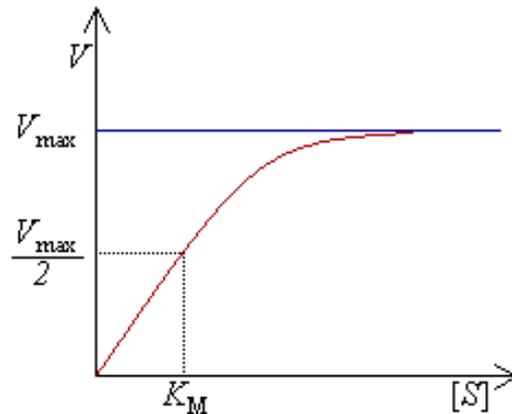


Figure II. 1. Evolution de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat [103]

La vitesse maximale est l'asymptote de la branche hyperbolique représentant l'équation de Michaelis-Menten. Cette branche est aussi appelée courbe de saturation de l'enzyme par le substrat.

La Figure II.1 schématise l'évolution de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat. Expérimentalement, il n'est possible de déterminer qu'une valeur approchée de V_{max} . De ce fait plusieurs linéarisations ont été développées pour représenter l'équation de vitesse dont deux sont largement utilisées. Parmi ces linéarisations, on peut citer la représentation de Lineweaver et Burk équation (2) et celle de Hanes-Woolf équation (3)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_M} \left(\frac{1}{[S]_0} \right) + \frac{1}{V_M} \quad (2)$$

Cette équation (12) représente une droite de pente K_m / V_M

L'intersection sur l'axe vertical est $1/ V_M$ et sur l'axe horizontal $-1 /K_m$

$$\frac{[S]_0}{v} = \frac{K_m}{V_M} + \frac{1}{V_M} [S]_0 \quad (3)$$

Cinétique enzymatique par calorimétrie isotherme

Cette représentation est une droite de pente $1/V_M$

L'intersection sur l'axe horizontal est $-K_m$.

- La constante catalytique

La constante catalytique k_2 (ou k_{cat}) représente la fréquence à laquelle l'enzyme accomplit l'acte catalytique ($k_{cat} = \frac{V_M}{[E]_0}$). Celle-ci donne la mesure de l'efficacité de la catalyse par l'enzyme sur le substrat.

L'unité officielle de l'activité enzymatique est le katal (k_{cat}) qui est équivalent à la quantité d'enzymes qui catalyse la transformation de 1 mole de substrat par seconde.

II.1.1.2 Modèle de Michaelis-Menten avec inhibition

Plusieurs modèles d'inhibition ont été reportés dans la littérature pour prendre en compte ces phénomènes importants et améliorer le Modèle de Michaelis-Menten. En effet, l'équation de Michaelis-Menten telle qu'elle est présentée précédemment ne prend pas en compte l'impact de certains produits qui peuvent ralentir ou même bloquer complètement l'activité d'une enzyme. On distingue deux grandes catégories d'inhibition: l'inhibition compétitive et l'inhibition non compétitive auxquelles on peut ajouter des formes mixtes telle que l'inhibition incompétitive.

Le Tableau 4 regroupe ces modèles d'inhibition et les modifications apportées aux constantes cinétiques.

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

Tableau 4. Récapitulatif des modèles d'inhibition

Type inhibition	Inhibition Compétitive	Inhibition Non Compétitive	Inhibition Incompétitive
Equation de réaction	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$ $E + P \xrightleftharpoons[k_{P-1}]{k_p} EP$	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$ $EP + S \xrightleftharpoons[k_m]{k_m} ESP$	$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + p$ ESP
Impact	Empêche la liaison E/S	Formation d'un complexe ESP Site différents sur l'enzyme	Liaison de Inhibiteur sur le complexe ES
Equation de vitesse	$V = \frac{V_m[S]_0}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_m}\right) + [S]_0}$	$V = \frac{V_m[S]_0}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_m}\right) + [S]_0}$	$V = \frac{V_m[S]_0}{K_m + [S]_0 \left(1 + \frac{[P]}{K_m}\right)}$
Impacte sur les constantes de vitesse	Modification de K_m , Pas de modification de V	Modification de V Pas de modification de K_m	Modification de K_m et V
Détermination graphique	Point d'intersection sur l'axe des ordonnées (0; 1/V)	Point d'intersection sur l'axe des abscisses (- 1/ K_m ;0)	Droites parallèles entre elles

Le modèle Michaelis-Menten avec ou sans inhibition est utilisé pour décrire l'hydrolyse du cellobiose par la β -glucosidase. En effet Sorensen et al [104] ont utilisé ce modèle pour déterminer les constantes cinétiques de la β -glucosidase dans le but de les comparer avec les constantes d'autres souches et ont trouvé respectivement pour V_M et K_m 7,5 U/mg et 1,6 mmol/L.

D'autres auteurs ont déterminé la constante Michaelis-Menten pour cette même enzyme dans des conditions d'inhibition non compétitive et ont trouvé une constante K_m de 2,42 mmol/L [105].

II.1.2 Modèles cinétiques en phase hétérogène

II.1.2.1 Modèle de Michaelis-Menten en phase hétérogène

Le modèle de Michaelis-Menten développé pour décrire la cinétique enzymatique en phase homogène (enzymes en solution) est aussi utilisé par de nombreux auteurs pour décrire

Cinétique enzymatique par calorimétrie isotherme

les réactions en milieu hétérogène, ainsi le substrat, en dépit d'être un solide, est traité comme un réactif soluble, caractérisé par sa concentration [106]. Bezerra et al [107] ont testé huit modèles de Michaelis-Menten modifiés sur l'hydrolyse de l'Avicel par CBHI pour 24 ratio enzyme/ substrat différents et ont conclu que le modèle d'inhibition compétitive par le cellobiose permettait une bonne description de la cinétique.

D'autres auteurs ont reporté que le modèle de Michaelis-Menten avec inhibition compétitive est applicable à condition de prendre en compte la quantité de substrat effective [108].

Le Tableau 5 présente les constantes de Michaelis-Menten déterminées dans la littérature pour différentes enzymes sur deux substrats cellulosique.

Tableau 5. Récapitulatif des constantes de Michaelis-Menten sur deux substrats cellulosiques

Enzymes	Substrat	V _{max} (U/mg)	k _{cat} (h ⁻¹)	K _M (μM)	Inhibition	K _i (μM)	réf
CBHI+BGL	Whatman	-	0,022	4,243	-		[109]
CBHII+BGL		-	0,026	3,301	-		
CBHI	Avicel	-	1	4400	-	-	[107]
		-	2	3800	Compétitive	41	

- CBHI: Cellobiohydrolases I
- CBHII: Cellobiohydrolases II

Par ailleurs, d'autres modèles de cinétique enzymatique en phase hétérogène sont référencés dans la littérature. Ces modèles sont classés dans deux autres grandes catégories en plus de celle qui se base sur l'équation de Michaelis-Menten, à savoir : les modèles empiriques et les modèles prenant en compte l'adsorption des enzymes sur le substrat[110]. Ces modèles sont abordés ci-après.

II.1.2.2 Les modèles empiriques

Ces modèles visent à quantifier l'effet de différents substrats et/ou enzymes sur la cinétique d'hydrolyse. Ce sont des modèles basés sur des corrélations qui ne sont applicables que dans les conditions dans lesquelles ils ont été développés et ne fournissent aucune indication sur les détails mécanistiques du processus [110] [111].

Cinétique enzymatique par calorimétrie isotherme

II.1.2.3 Les Modèles d'adsorption

Ce sont des modèles qui prennent en compte l'adsorption de l'enzyme sur le substrat lors de l'hydrolyse (substrat insoluble) soit en déterminant expérimentalement des isothermes d'adsorption (isotherme de Langmuir) soit en utilisant des équations cinétiques qui prennent en compte l'adsorption.

Kadam et al (2004) [112] ont modélisé l'adsorption des enzymes par une isotherme de Langmuir selon l'équation 14 :

$$E_l = \frac{E_{\max} K_d E_f S}{1 + K_d E_f} \quad (16)$$

Avec

E_l : Quantité d'enzymes liées ($\text{mol.g}_{\text{substrat}}^{-1}$);

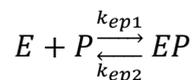
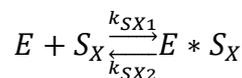
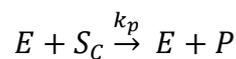
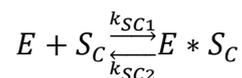
E_{\max} : Nombre de sites ($\text{mol.g}_{\text{substrat}}^{-1}$);

E_f : Concentration d'enzymes libres à l'équilibre (M);

K_d : Constante de dissociation (M),

S : concentration en substrat.

Gan et al (2003) [113] quant à eux ont utilisé l'équation cinétique suivante pour décrire la quantité d'enzyme adsorbée :



Avec :

$E*S$: Complexe actif

S_C : Substrat actif

k_{SC1} : Constante de vitesse de formation du complexe actif $E*S$

k_{SC2} : Constante de vitesse de dissociation du complexe actif $E*S$

k_p : Constante de vitesse de formation du produit P

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

$E * S_X$: Complexe non productif

S_S : Substrat non actif

k_{SX1} : Constante de vitesse de formation du complexe non productif

k_{SX2} Constante de vitesse de dissociation du complexe non productif

k_{ep1} : Constante de vitesse de formation du complexe productif EP

k_{ep2} : Constante de vitesse de dissociation du complexe EP

Les vitesses de formation des différents complexes intermédiaires et le produit P s'écrivent alors comme suit :

$$\frac{dC_{E*S_C}}{dt} = k_{SC1}C_EC_{S_C} - k_{SC2}ES_C - k_pC_{ES_C} \quad (17)$$

$$\frac{dC_{E*S_X}}{dt} = k_{SX1}C_EC_{S_X} - k_{SX2}C_{E*S_X} \quad (18)$$

$$\frac{dC_{EP}}{dt} = k_{EP1}C_EC_P - k_{ep2}C_{EP} \quad (19)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_pC_{E*S_C} \quad (20)$$

C_E : Concentration en enzyme

S_C : Substrat actif

C_{S_C} : Concentration en substrat actif

ES_C : Complexe enzyme /substrat actif

C_{ES_C} : Concentration en complexe enzyme/substrat actif

Ainsi, même si le mécanisme réactionnel de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique n'est pas encore parfaitement établi, c'est le modèle de Michaelis-Menten qui est largement utilisé.

Par ailleurs, ces modèles sont issus de résultats de dosage des produits ou substrats contenus dans des prélèvements effectués au fur et à mesure de l'avancement de la réaction par spectrophotométrie ou autres. Or un suivi en direct, in situ et qui serait applicable à n'importe quelle biomasse est plus adapté pour l'étude des cinétiques enzymatiques en vue de la production du bioéthanol.

C'est dans cette optique que nous proposons d'étudier ces réactions biochimiques et ce par calorimétrie isotherme.

Cinétique enzymatique par calorimétrie isotherme

En effet, la calorimétrie isotherme est une technique analytique souple qui permet de mesurer l'affinité et d'autres paramètres thermodynamiques concernant la liaison de deux molécules [114]. Elle se base sur le fait que toute interaction libère ou absorbe une certaine quantité d'énergie. Le calorimètre isotherme est donc considéré comme un détecteur universel [115].

Les mesures calorimétriques apparaissent ainsi pertinentes dans le cadre de cette étude, car comme dans le cas des réactions chimiques, les réactions biologiques sont accompagnées d'un dégagement ou d'une consommation de chaleur [116][117]. Grâce à ce flux de chaleur engendré, l'enthalpie est calculée de laquelle un certain nombre de paramètres peuvent être déduits, ce qui va être démontré ci-après

II.1.3 Principe de la calorimétrie isotherme

La calorimétrie isotherme est une technique dans laquelle l'échantillon contenu dans une cellule d'essai est maintenu à une température constante imposée par l'appareil. Lorsqu'une variation de température est enregistrée (du fait d'une réaction par exemple), le système de chauffage se met en marche et se régule automatiquement pour maintenir la température de l'enceinte constante. La quantité d'énergie qui est mise en jeu par le calorimètre est alors directement proportionnelle à la chaleur de réaction [118].

II.1.4 Avantages et inconvénients de la calorimétrie

La calorimétrie isotherme présente un ensemble intéressant d'avantages. En effet cette méthode permet, un suivi direct de processus chimique, physique ou biologique en mesurant la production ou la consommation de chaleur engendrée [119]. De plus cette analyse est précise, et peut être utilisée pour les substrats naturels comme pour les substrats synthétiques.

Mais le plus grand avantage de cet instrument pour l'étude des réactions enzymatiques est la possibilité de faire les essais sur le réactif brut sans aucune préparation ou ajout d'autres réactifs au préalable, [120][121]. En effet, contrairement à d'autres méthodes nécessitant des modifications des échantillons à tester en ajoutant par exemple des marqueurs fluorescents ou radioactifs qui peuvent avoir un impact sur la cinétique enzymatique, cette méthode permet de tester l'échantillon dans les mêmes conditions opératoires de réaction. De plus ces échantillons peuvent encore être soumis à des mesures supplémentaires après la mesure calorimétrique car cette méthode est non destructrice.

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

Par ailleurs, cette méthode permet le suivi des échantillons qui sont difficiles à surveiller en temps réel à l'aide d'autres méthodes telles que les transformations qui se déroulent sur des solides poreux opaques [122][123].

La calorimétrie, longtemps réservée au processus chimique, est maintenant utilisée pour caractériser directement la thermodynamique des interactions de liaison de biopolymère et la cinétique des réactions catalysées par des enzymes.[124] Ceci est rendu possible grâce aux avancées technologiques et l'amélioration des instruments [116].

La calorimétrie s'est avérée comme étant un bon outil pour la détermination des cinétiques enzymatiques dans un certain nombre d'études [125] [126].

Ces propriétés font de la calorimétrie isotherme un outil précieux, unique, puissant et universel pour étudier la cinétique enzymatique [127].

Le principal inconvénient du calorimètre est que celui-ci mesure un signal global non spécifique. En effet, l'enthalpie mesurée et observée lors d'une expérience prend en compte non seulement la chaleur de la réaction proprement dite, mais aussi des sources de chaleur supplémentaires associées à cette réaction y compris les effets du solvant, la chaleur liée à la dilution et celle purement mécanique telle que la chaleur résultant de l'agitation de l'échantillon. Ainsi, une préparation minutieuse de solutions et de mesure des chaleurs de fond appropriées sont nécessaires pour obtenir des paramètres thermodynamiques qui reflètent fidèlement la réaction étudiée [114][122].

II.1.5 Calorimétrie et cinétique enzymatique

La calorimétrie isotherme est utilisée pour mesurer les paramètres des cinétiques enzymatiques en utilisant la puissance thermique générée par la conversion du substrat en produit où la vitesse de réaction est directement proportionnelle à la puissance thermique :

$$\Omega = \frac{dQ}{dt} \quad (21)$$

Ω est la puissance du signal calorimétrique et Q est le flux de chaleur échangée qui est également

$$Q = n \cdot \Delta H_{app}[P]_t \cdot V \quad (22)$$

Avec

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

n : nombre de mole transformé

V : volume réactionnel

$[P]_t$: concentration molaire du produit

ΔH_{app} : enthalpie molaire expérimentale de la réaction que l'on obtien par intégration sur le temps bornes du phénomène étudié:

$$\Delta H_{app} = \frac{1}{n} \int_{t=t_i}^{t=t_f} \frac{dQ}{dt} \quad (23)$$

En combinant (21) et (22), il vient

$$\Omega = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \cdot V \cdot \Delta H_{app} \quad (24)$$

Où $\frac{d[P]}{dt}$ est la vitesse de formation du produit (vitesse de réaction)

Ainsi on obtient la vitesse de la réaction v :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dQ}{dt} \quad (25)$$

Deux approches utilisant la calorimétrie isotherme pour la détermination des constantes cinétiques ont été développées : la calorimétrie isotherme à injection multiple et la calorimétrie isotherme à injection unique

II.1.5.1 Calorimétrie isotherme à injection multiple

La technique des injections multiples est réalisée pour mesurer dQ/dt après chaque injection (Figure II. 2) de substrat en maintenant des conditions stationnaires (concentration en substrat plus importante que celle du produit). Cette méthode est recommandée pour des K_m plus grand que $10\mu M$. Dans le cas contraire, l'essai en continu lui est préféré.

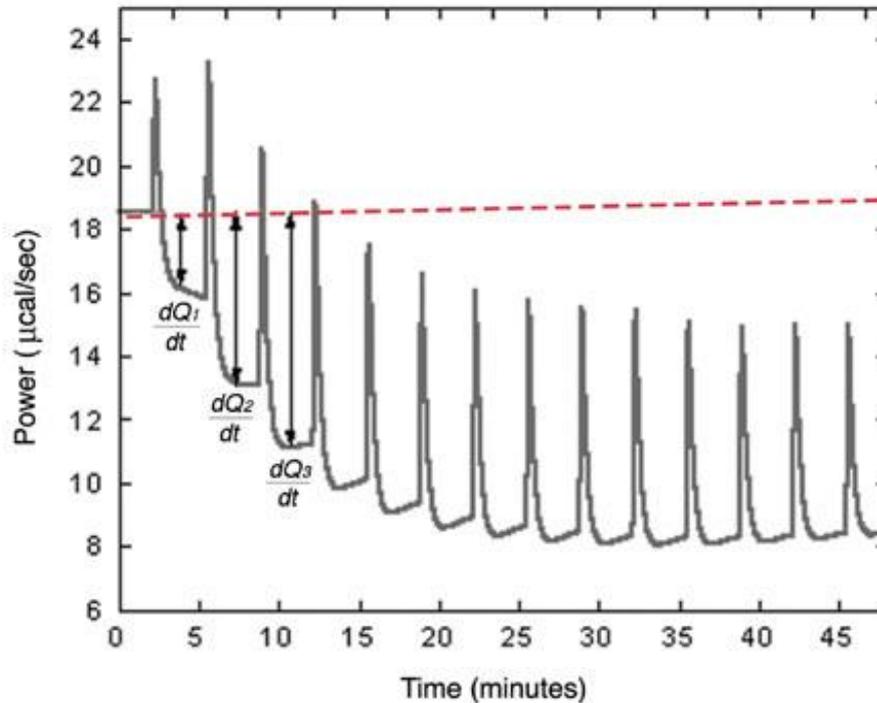


Figure II. 2. Exemple de thermogramme obtenu par la méthode de l'injection multiple [128]

La vitesse de réaction est déterminée par la mesure de la différence de chaleur détectée par le calorimètre qui suit l'ajout du substrat. Pour chaque ajout de substrat, on observe généralement un pic dû à la dilution du substrat, suivi d'une décroissance rapide du signal (après 2 à 3 min) et un nouvel état d'équilibre s'établit au cours duquel le substrat réagit à vitesse constante jusqu'à ce qu'un second aliquote de substrat soit ajouté. Cette opération d'ajout est répétée typiquement entre 10 et 30 fois avec des intervalles de 2 à 5 minutes [129]

$\frac{dQ}{dt}$ est déterminé par la mesure de la différence entre la ligne de base et la nouvelle ligne de base qui s'établit après chaque injection de substrat comme indiqué sur la Figure II. 2 [68].

Les concentrations en substrat et enzyme [S] et [E] sont calculés après chaque injection, en utilisant les concentrations initiales en enzyme et substrat et les volumes injectés. Et remplaçant les valeurs dQ/dt dans l'équation (15), la courbe de Michaelis-Menten peut être tracée (Figure II. 3).

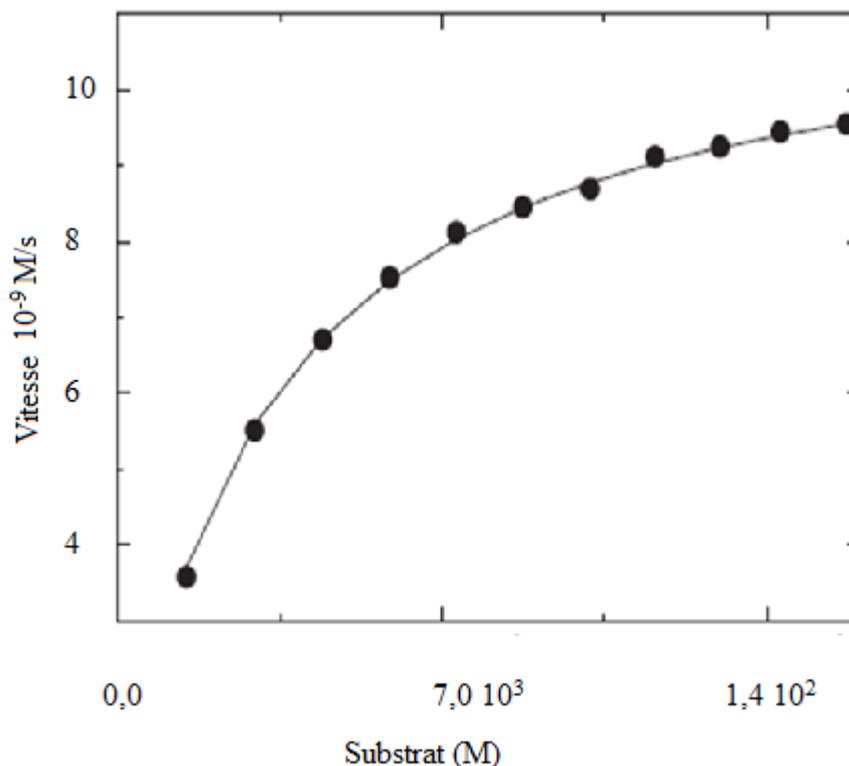


Figure II. 3. Courbe de Michaelis-Menten obtenue à partir du thermo gramme [128]

Cette technique a été utilisée entre autre pour l'étude de la catalyse de la pénicilline G par de la pénicillinase par Todd et al (2001) [129]. Ils ont obtenu une constantes K_M de 120 μM .

Plus récemment Mazzei et al (2014) [127] ont étudié l'hydrolyse enzymatique de l'urée par *Canavalia ensiformis* (jack bean) uréase et les valeurs obtenues respectivement pour K_M et k_{cat} sont en accord avec les données précédentes rapportées dans la littérature avec respectivement une constante K_M de 3.45 mM k_{cat} 3.02 10⁴ sec⁻¹ obtenus lors de cette étude et K_M de 3.9 mM et k_{cat} de 6.1 10⁴ sec⁻¹ pour les essais menés par Krajewska et al (2012)[130] et un K_M de 4 mM et une constante catalytique k_{cat} 3.6 10⁴ sec⁻¹ pour les résultats obtenus par Brian et al (2005)[131].

II.1.5.2 Injection unique (essai en continu)

La méthode à injection unique est simple et polyvalente, elle permet l'étude des réactions à cinétique rapide ou faible. Les premiers à avoir utilisé cette méthode sont Morin et Freir[132]. Ces essais sont réalisés avec des concentrations en substrat plus importantes que le K_M en présence d'enzyme en excès. Lors de cette méthode la puissance thermique est

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

suivie de façon continue tant que le substrat est converti en produit et jusqu'à ce que le flux thermique retourne à la ligne de base, ce qui indique que tout le substrat à été consommé. La Figure II. 4 donne un exemple de courbe obtenue par cette méthode.

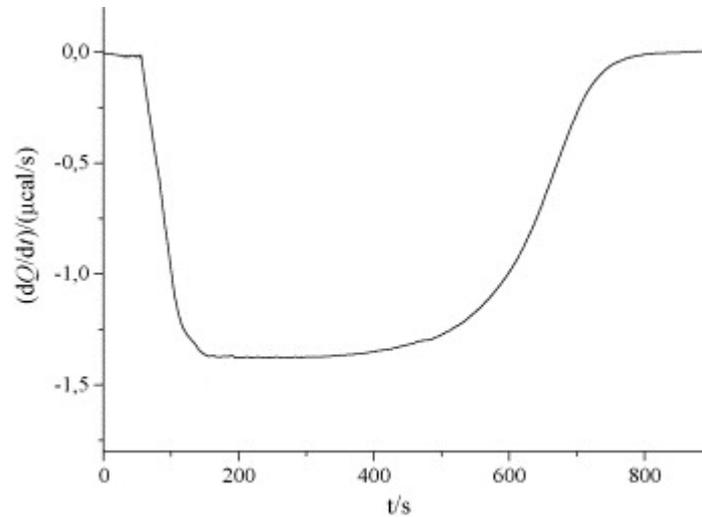


Figure II. 4. Exemple de thermogramme obtenu par la méthode de l'injection unique [133]

L'enthalpie de réaction est obtenue par intégration de l'aire sous la courbe. Pour chaque instant t , la concentration en substrat ($[S]$) est déterminée par l'équation (18)

$$[S] = S_0 - \frac{\int_0^t \Omega dt}{V_0 \cdot \Delta H_{app}} \quad (18)$$

Les valeurs de la concentration en substrat S ainsi obtenus sont remplacés dans la fonction $v=f([S])$. La Figure II. 5 présente un exemple de courbe de Micaelis-Menten obtenu à partir du thermogramme présenté en Figure II. 4 .

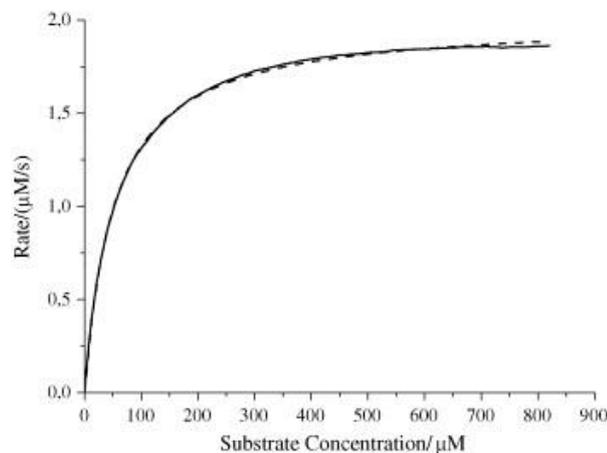


Figure II. 5. Courbe de Micaelis-Menten obtenue à partir du thermogramme [133]

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

D'autre part, il est possible de détecter la production d'inhibiteurs lors de la réaction enzymatique en injectant un deuxième aliquote (Figure II. 6) ; si la réaction n'a pas produit d'inhibiteurs, un pic similaire au premier est enregistré.

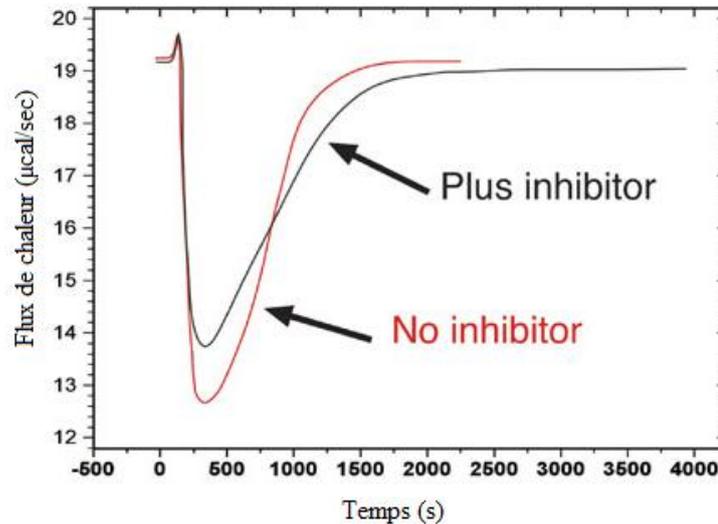


Figure II. 6. Exemple de courbe obtenue par la méthode injection unique en présence et absence d'inhibiteur [134]

L'effet d'inhibiteurs compétitifs peut être déterminé en présence d'une concentration connue de l'agent inhibiteur. La Figure II. 6 présente un exemple pour des essais en continu en présence et en absence d'inhibiteur.

La différence entre le K_m observé en présence d'inhibiteur et le K_m observé en absence d'inhibiteur permet de déterminer la constante d'inhibition K_i grâce à l'équation (19).

$$K_i = \frac{[\text{inhibiteur}]}{\frac{K_{M\text{obs}}}{K_M} - 1} \quad (19)$$

Une étude reportée par O'Brien et al (2004) [118], réalisée sur l'hydrolyse N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) par la trypsine en présence et en absence d'inhibiteur (benzamidine) donne un $K_M = 4.17 \mu\text{M}$, un $V_{\text{max}} = 0.091 \mu\text{Mol/s}$ et un $k_{\text{cat}} = 17.8 \text{ s}^{-1}$ pour le cas sans inhibiteur et un $K_M = 35.1 \mu\text{M}$, un $V_{\text{max}} = 5.9 \times 10^{-4} \mu\text{Mol/s}$ un $k_{\text{cat}} = 0.11 \text{ s}^{-1}$ et $K_i = 18.4 \mu\text{M}$ pour le cas avec inhibiteur.

Par ailleurs, Olsen (2006) [135] a étudié les propriétés cinétiques de la phosphorylation du glucose par l'enzyme hexokinase par les deux méthodes d'injection, il a obtenu $K_M = 176 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 284 \text{ s}^{-1}$ pour la méthode à injection unique et $K_M = 181 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 238 \text{ s}^{-1}$ pour la méthode à injection multiple

Cinétiques enzymatique par calorimétrie isotherme

Le Tableau 6 présente un comparatif des paramètres de Michaelis-Menten déterminés par calorimétrie isotherme avec ceux de la littérature. On observe une très bonne concordance entre les valeurs obtenues par calorimétrie et celles obtenues par d'autres méthodes surtout en ce qui concerne la constante K_M .

Tableau 6. Comparatif des constantes cinétiques obtenues par calorimétrie et celles obtenues par d'autres méthodes de mesure

enzyme	Substrat	Par calorimétrie isotherme			Autres méthodes		
		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	auteur	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	auteur
Hexokinase	Glucose	176 (1)	284(1)				[136]
		181 (2)	238 (2)	[135]	100	450	
		72 (2)	270 (2)	[129]	167	-	[136][137]
	Glucose+ASB	140 (1)	300(1)	[135]	-	-	-
Trypsine	BAEE	4 (1)	15 (1)	[129]	5	2,12	[138]
Trypsine	BAEE+ Benzamidine	16 (1)	15 (1)	[129]	-	-	-
β -glucosidase (<i>A.niger</i>)	Cellobiose	800(2)	234(2)	[139]	880	-	[140]
<i>T.fusca</i>	cellobiose	220(2)	16,3(2)	[125]	190	10,4	[125]
<i>D-hydantoinase</i>	D-ethyl-hydantoin	7,9	24.9	[128]	6,6	24,7	[128]

- (1) Injection unique
- (2) Injection multiple
- BAEE : N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester
- ASB : Albumine de sérum bovin

II.2 Conclusion

L'étude bibliographique portant sur les réactions biochimiques a montré que plusieurs modèles pouvant décrire l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique ont été développés. Mais aucun ne fait à la fois une bonne description de la réactivité des enzymes et

Cinétique enzymatique par calorimétrie isotherme

du substrat. De même, si le modèle de Michaelis-Menten a été développé pour décrire les réactions en phase homogène, celui-ci reste largement utilisé pour décrire l'action des cellulases en phase hétérogène.

Enfin l'étude a révélé que la calorimétrie isotherme est une méthode ad hoc pour la mesure des constantes cinétiques des réactions enzymatiques. Toutefois celle-ci est largement utilisée dans le cas de réactifs solubles mais reste très peu utilisée pour les substrats insolubles.

C'est donc dans l'optique d'améliorer l'étape d'hydrolyse enzymatique que s'inscrivent les travaux de cette thèse en étudiant le cocktail enzymatique d'une part et en déterminant les conditions opératoires optimales d'autre part et ce en utilisant la calorimétrie isotherme.

Les suivis par calorimètre permettront la détermination des constantes cinétiques enzymatiques et ainsi d'avoir une image en direct des flux de chaleur générés pendant les différents procédés de fabrication du bioéthanol.

III MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre sera consacré à la présentation des substrats et des enzymes utilisés pour la réalisation de cette étude et les méthodes de caractérisation et de dosage qui sont utilisés.

Puis, le matériel calorimétrique ainsi que les méthodes de suivi des réactions biologiques par ce dernier seront présentés. Enfin, les méthodes d'analyses des différents produits des réactions seront exposées.

III.1 Les réactifs utilisés lors de l'hydrolyse et la fermentation

Les substrats, les enzymes ainsi que les différents réactifs utilisés pour la réalisation de cette étude sont les suivants:

III.1.1 Substrats

Le substrat utilisé est de la paille de blé (*Triticum aestivum*, Apache) issue de la récolte effectuée en France en 2011. Selon l'application, celle-ci est utilisée soit broyée, soit micronisée ou encore explosée à la vapeur. Les compositions massiques ont été déterminées par le laboratoire de Biotechnologie et Champignons Filamenteux et sont reprises dans la Figure III. 1. La différence entre ces deux compositions est due au prétraitement appliqué.

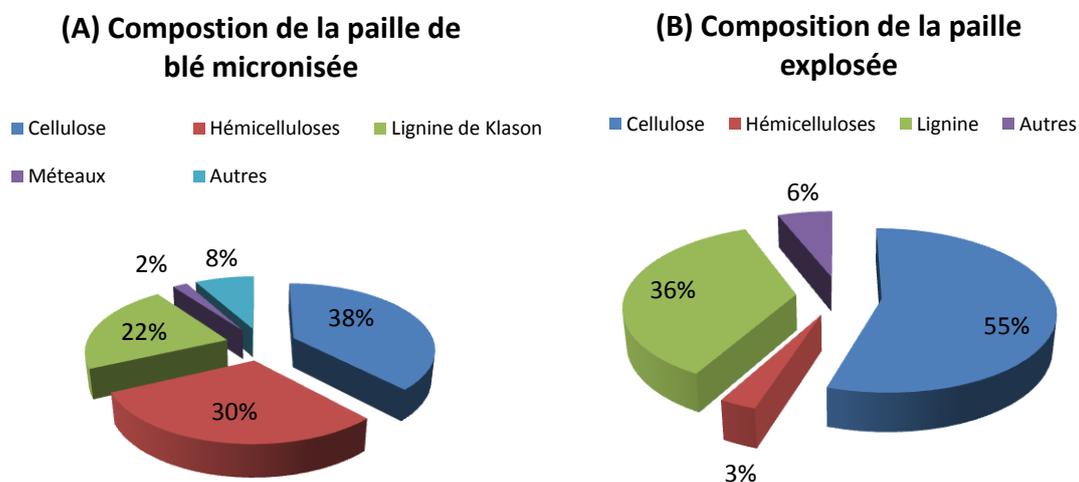


Figure III. 1. (A) Composition massique de la paille de blé broyée, (B) Composition massique de la paille de blé explosée.

➤ Détermination de la matière sèche dans le substrat

La teneur en matière sèche est éterninée par gravimétrie en mesurant la perte de masse après séchage à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. La mesure est réalisée en triplicata

et le résultat trouvé est de $92\% \pm 1$ pour la paille micronisée, $94,3 \pm 0,8$ pour la paille broyée et $77,12 \pm 1,4$ pour la paille explosée.

III.1.2 Les enzymes

Deux types de cellulases commerciales ont été utilisés, GC220 (Genencor-Danisco, Rochester, NY, USA) de *T. reesei* et Novozyme 188 (Novozyme, Franklinton, NC, USA) de *Aspergillus Niger*. Le cocktail enzymatique GC220 est composé d'Endoglucanase, Exollobiohydrolase, β -glucosidase et xylanase. L'enzyme N188 quant à elle est constituée d'Endoglucanase, Exollobiohydrolase et β -glucosidase. Les activités de chaque enzyme sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Enzymes utilisées et leurs activités

			Activité U/mg
Enzymes	GC220	Endoglucanase	1,41
		Exollobiohydrolase	0,17
		β -Glucosidase	0,79
		Xylanase	3,85
	SP188	Endoglucanase	0,18
		Exollobiohydrolase	0,06
		β -Glucosidase	1,15

Une troisième enzyme, le cellobiose déshydrogénase (CDH) fournie par le laboratoire de Biotechnologie des champignons filamenteux de Marseille a également été utilisée. Cette enzyme est produite par *Pycnoporus cinnabarinus* lors de la dégradation de la matière lignocellulose. Son activité est de 0,25U/mg.

III.1.2.1 Mesure des constantes cinétiques de la SP188 (Dosage par temps fixe)

Le dosage de l'activité de la β -glucosidase se fait selon la méthode développée par Miller [141].

Cette approche consiste à faire réagir une quantité d'enzyme avec différentes concentrations en substrat et à incubé pendant un certain temps t.

Le dosage est réalisé sur le cellobiose selon le protocole expérimental présenté en Figure III. 2. L'hydrolyse du cellobiose est réalisée dans des tubes eppendorf en milieu tamponné pH= 4,8 pour un même temps, fixé à 4 min au bain Marie .

Dans des tubes Eppendorf et à partir d'une solution mère de 100 mM, 8 solutions de concentrations différentes en cellobiose allant de 0 mM à 100 mM sont préparées. Ces tubes sont ensuite placés dans un bain thermostaté sec à 45°C sous agitation mécanique à 400 tr/min. Dans chaque tube 8 µl d'enzyme sont ajoutés. Après 4 min d'incubation l'enzyme est dénaturée à 95°C.

Le glucose ainsi formé est analysé par spectroscopie en employant la méthode décrite en III.3.3.2 .

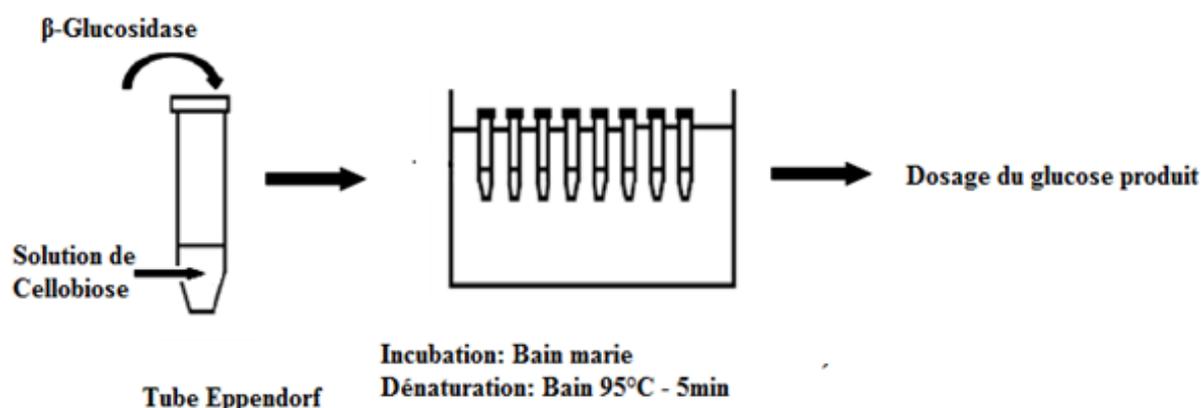


Figure III. 2. Protocole expérimental pour l'étude de la β-glucosidase à temps fixe

Les concentrations en produit ainsi éternimées sont rapportées au temps d'incubation (4 min dans ce cas) pour obtenir les vitesses de formtion. Ces vitesses sont alors reportées sur un graphique en fonction du substrat qui représente la courbe de Michaelis-Menten et déterminer ainsi les constantes cinétiques.

III.1.3 Levure

Dans le but de transformer le glucose produit lors de l'hydrolyse en éthanol, des levures sont utilisées.

La souche utilisée au cours de ce travail est *Saccharomyces cerevisiae* ZYMAFLORE® 011 BIO. Il s'agit d'une souche utilisée pour la vinification commercialisée par la société Laffort. Celle-ci a une tolérance à l'alcool avoisinant les 16% [142].

III.1.4 Tampon

Les réactions enzymatiques nécessitent des milieux réactionnels à pH contrôlé. Pour cela une solution de tampon phosphate citrate à 50 mM et à pH 4,8 a été utilisée pour étudier l'hydrolyse enzymatique [143].

III.1.5 Antifongique

Afin d'éliminer toute réaction parasite due aux champignons, du cycloheximide d'une concentration de 10 mg/ml a été utilisé. 160 µl de cette solution sont utilisés pour 40 ml de préparation.

III.1.6 Antibiotique

Afin d'éliminer toute réaction parasite due aux bactéries, une masse de 12,5 mg de tétracycline est solubilisée dans 1 ml d'éthanol à 75%. 240 µl de cette solution sont utilisés pour 20 ml de préparation.

III.2 Appareil de mesure calorimétrique

Deux appareils de mesure calorimétrique de capacités différentes ont été utilisés pour la réalisation de cette étude

III.2.1 Calorimètre C80

III.2.1.1 Descriptif et principe

Le capteur calorimétrique utilisé au cours de cette étude est un calorimètre SETARAM C80 de la famille des calorimètres de type Calvet. Celui-ci se présente sous la forme d'un cylindre fixé sur un socle rectangulaire comme illustré en Figure III. 3(échelle 1/6).

Le calorimètre C80 offre la possibilité de travailler en régime isotherme ou programmé entre la température ambiante et 300°C, et peut détecter des phénomènes thermiques de très faible puissance. Il est destiné aux mesures de chaleur de mélange et de réactions utiles aux industries chimiques, para-chimiques, pétrochimiques, pharmaceutiques, alimentaires, ... etc.

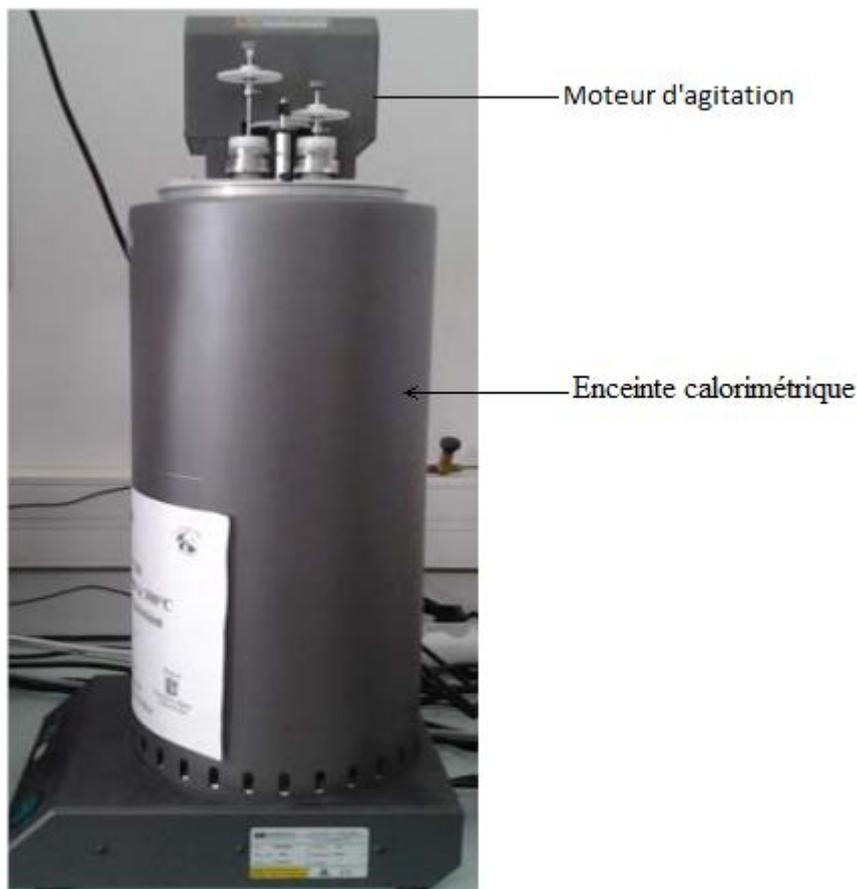


Figure III. 3. Photo du Calorimètre C80, illustré avec le moteur d'agitation

Ce calorimètre est constitué de deux puits identiques (diamètre 17 mm et de 120 mm de profondeur) et chaque puits reçoit une cellule ; l'une de mesure et l'autre servant de référence.

Chaque puits est équipé avec son propre fluxmètre pour mesurer la puissance thermique échangée entre les cellules et le bloc calorimétrique. Ces deux fluxmètres sensibles sont constitués de 162 thermocouples connectés en série entourant les cellules et les reliant thermiquement au bloc calorimétrique. Ils transmettent une tension proportionnelle au flux de chaleur à mesurer représentatif des échanges thermiques entre les cellules et le bloc calorimétrique.

La mesure de la température est assurée par une sonde en platine (Pt) 200 Ω d'une précision de 0,01 K. celle-ci est placée entre les deux puits calorimétriques (Figure III. 4). La régulation de la température de consigne s'effectue elle aussi par une sonde à résistance en platine placée en périphérie du bloc.

Le chauffage est assuré par un élément chauffant placé en périphérie. Le refroidissement du calorimètre quant à, lui se fait grâce à l'air ventilé circulant dans une gaine entourant le bloc calorimétrique qui constitue le thermostat de l'appareil.

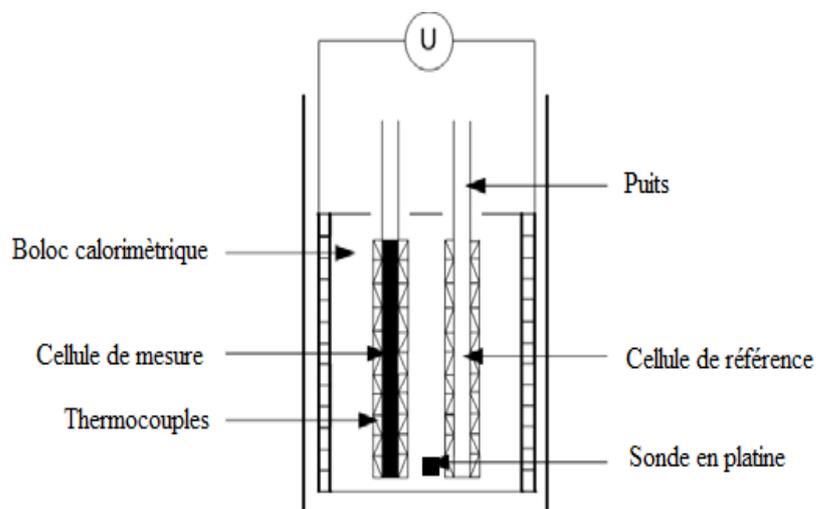


Figure III. 4. Schéma de l'enceinte calorimétrique et du système de détection

Les spécifications les plus importantes du calorimètre C80 sont regroupées dans le

Tableau 8

Tableau 8: Spécifications du Calorimètre Calvet C80 ci-dessous.

Tableau 8: Spécifications du Calorimètre Calvet C80

Calvet C80	
Gamme de température	Ambiante à 300 °C
Résolution Calorimétrique (μW)	0,12
Constante de Temps (s)	100
Volume échantillon (cm^3)	3,5 à 12
Vitesse de programmation (Chauffe)	0,01 à $2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$
Limite de détection de puissance (μW)	2 à 5
Gamme de mesure calorimétrique (mV)	+/- 660 MW – +/- 2000 mW

Le C80 est exploité par le logiciel CALISTO. Celui-ci comprend deux parties indépendantes :

- **Calisto acquisition**, conçu pour le contrôle des analyseurs thermiques de SETARAM
- **Calisto processing**, dédié aux traitements des données d'analyse thermique

III.2.1.2 Cellules utilisées

Le calorimètre C80 peut s'utiliser avec un certain nombre de cellules selon l'application. Lors de cette étude le choix des cellules (mesure et référence) s'est naturellement orienté vers les cellules de mélange à membrane. En effet, le substrat étudié est de la paille micronisée et celle-ci a tendance à décanter. Une agitation en continue est nécessaire pour remettre la paille en suspension. D'autre part cette cellule permet la séparation de la paille et des enzymes et de ne déclencher la réaction qu'une fois que le système a atteint la température de mesure fixée.

Cette cellule est constituée d'un corps cylindrique où deux compartiments sont séparés et isolés l'un de l'autre par une membrane en aluminium d'épaisseur 0,02 mm et de 13 mm de diamètre.

Le volume du compartiment bas est approximativement de 2 cm³ et celui du compartiment haut est de 3 cm³.

La partie inférieure du corps cylindrique reçoit un récipient d'un volume approximatif de 2 ml dans lequel on place l'un des constituants; ce récipient est fermé par une membrane circulaire détenue entre deux bagues (bagues 1 et 2) en Téflon, qui s'emboîtent l'une dans l'autre en enserrant la membrane. Une fois ce dernier préparé, il sera fixé dans la partie inférieure du corps cylindrique.

La partie supérieure du corps cylindrique d'un volume de 3 ml, quant à elle reçoit le deuxième réactif et est fermé par un bouchon perforé et traversé par un tube fin dont l'une des extrémités est un mobile d'agitation qui sert aussi à la perforation de la membrane tandis que l'autre extrémité est reliée au moteur d'agitation. La Figure III. 5 présente une photographie des pièces constituant la cellule de mélange à membrane.

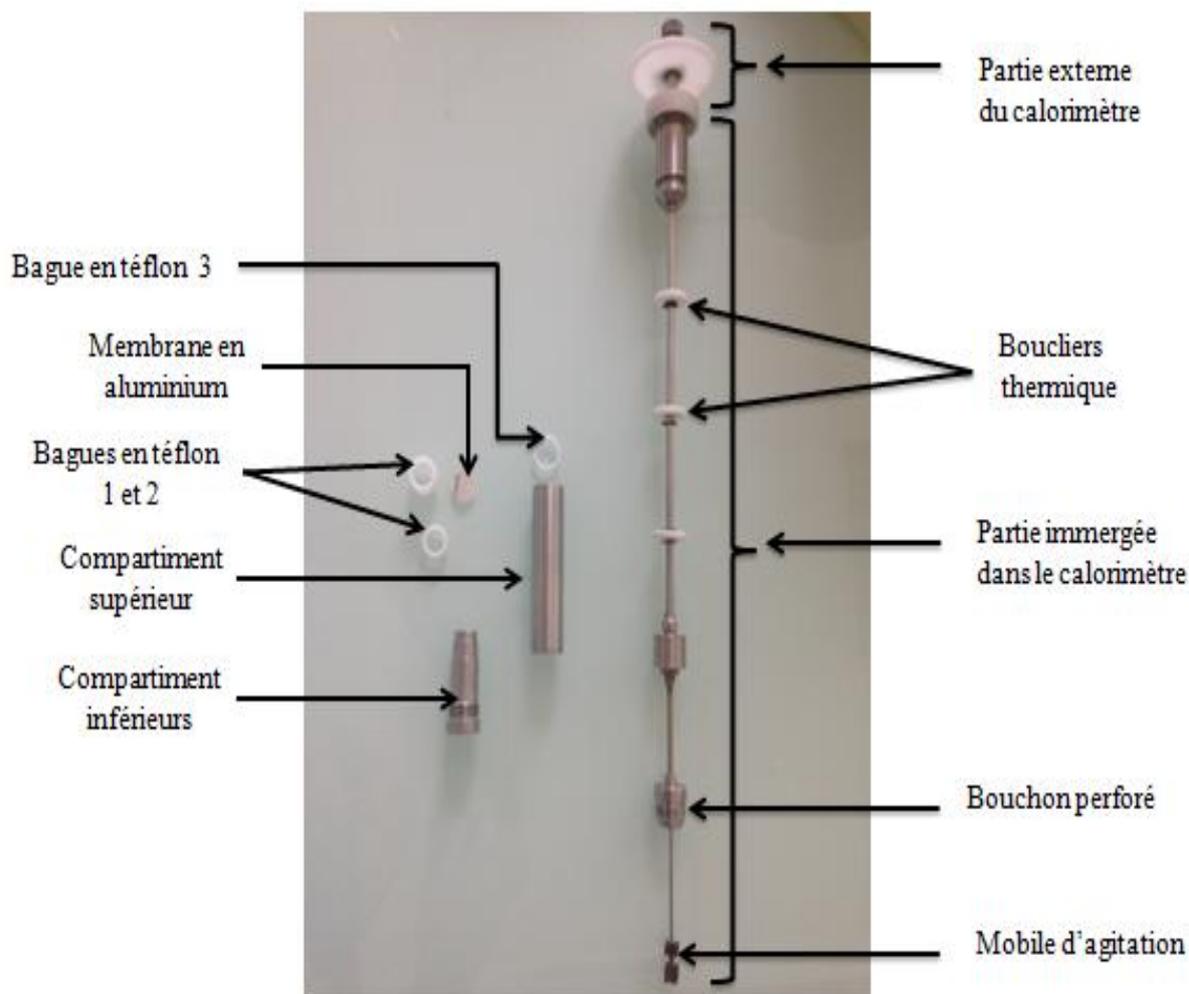


Figure III. 5. Photographie des pièces constituant la cellule de mélange à membrane

III.2.2 Calorimètre OptiMax TM 1001

III.2.2.1 Descriptif et principe

Le deuxième appareil utilisé au cours de cette étude est l'OptiMax de Mettler Toledo (Figure III. 6).

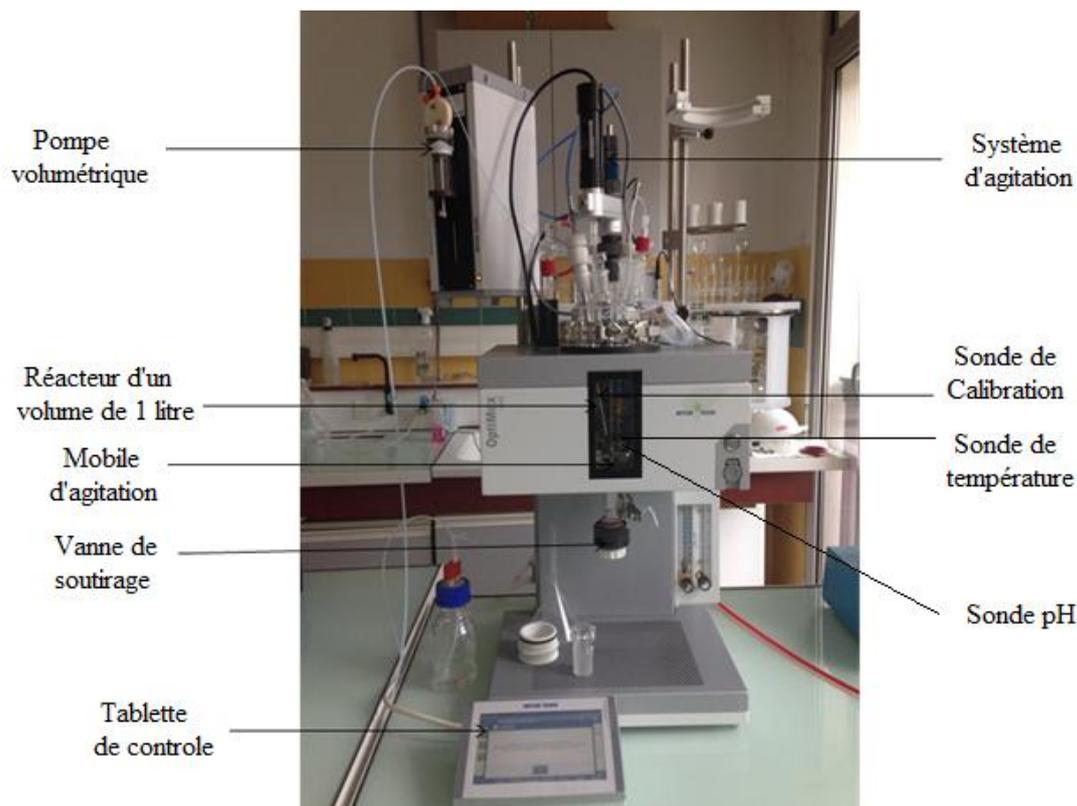


Figure III. 6. Photographie de l'OptiMax et ses accessoires

Les spécifications les plus importantes de l'OptiMax sont regroupées dans le Tableau 9 ci-après :

Tableau 9 : Spécifications de l'OptiMax

OptiMax	
Gamme de température	-40°C à 180°C
Type de calorimètre	Flux de chaleur
Vitesse d'agitation	De 30 rpm à 1200 rpm
Volume	de 500 à 1000 mL
Sensibilité	$\leq 0,4$ W
Température de contrôle	1) Température du réacteur (T_r) par ajustement rapide 2) Température de la jaquette (T_j) par un thermostat interne

OptiMax est un calorimètre réactionnel produisant des informations calorimétriques dans des conditions isothermes comme non isothermes. Le chauffage et le refroidissement sont rapides et ne requièrent aucun cryostat, mais uniquement une circulation d'eau froide.

Le chauffage électrique et le refroidissement par effet Peltier garantissent un contrôle précis de la température de -40 °C à 180 °C .

Cet appareil est piloté par un logiciel (iControl 5.2) qui permet de réaliser des actions séquentielles, avec un ajustement de différents paramètres (T, pH, vitesse d'agitation, ajouts volumétriques de réactifs liquides) et d'enregistrer tout au long de l'expérience l'ensemble des paramètres de la réaction.

À la fin d'une expérience, les résultats sont résumés et un rapport, contenant tableaux et courbes, est produit automatiquement.

L'OptiMax ne requiert aucun essai de référence. En effet, pendant les essais, l'appareil mesure la température du milieu réactionnel et le logiciel fourni avec l'appareil propose de calculer la chaleur liée à chaque phénomène (chaleur de dosage, chaleur d'agitation, chaleur accumulée par la masse de réactif et des différents constituants...) ainsi, la chaleur liée à la réaction peut être isolée (détails dans le paragraphe suivant).

Cependant, cet appareil nécessite deux étalonnages pour chaque essai; le premier avant la réaction à étudier et le second après la réaction et ce afin de calculer le coefficient de transfert moyen U et la chaleur spécifique moyenne de la masse réactionnelle nécessaire au calcul des enthalpies de réactions, C_p .

L'étalonnage se fait par une sonde électrique qui injecte une quantité connue de chaleur et grâce à une autre sonde qui mesure la température du milieu, le système calcule la chaleur reçue et la compare à la chaleur injectée par la sonde.

La Figure III. 7 montre une capture d'écran qui illustre les étalonnages faits pendant les essais et repérés par les échelons de chaleur.

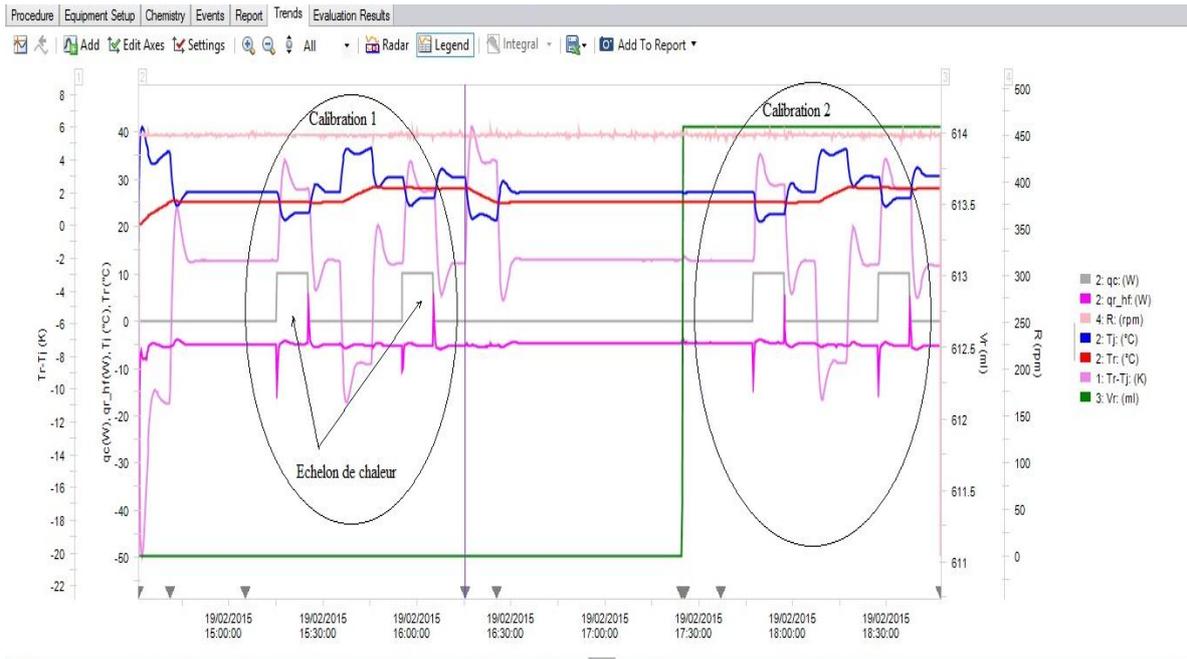


Figure III. 7. Étalonnage nécessaire aux mesures de l'OptiMax

III.2.2.2 Méthode de calcul des chaleurs de réaction par l'OptiMax

Le calcul de la chaleur liée à la réaction se fait par le logiciel en utilisant le bilan thermique suivant :

$$Q_r = Q_{flux} + Q_{acc} + Q_{dos} + Q_{per}$$

Avec ;

Q_r : Chaleur de réaction

Q_{flux} : Chaleur de réaction (renferme les chaleurs de dissolution et de mélange)

Q_{acc} : Chaleur accumulée par la masse réactionnelle et les accessoires (sondes, agitateur,...)

Q_{dose} : Chaleur du dosage (chaleur nécessaire pour ramener la température de l'échantillon dosé de la température T_{dos} (température de l'élément dosé) à la température T_r (température du réacteur))

Q_{per} : Fuite thermique à travers le haut du réacteur

Les différents termes (chaleurs) sont calculés comme suit:

$$Q_{flux} = U * A * (T_r - T_a)$$

U : Coefficient de transfert de chaleur travers la paroi du réacteur

A : Surface d'échange de chaleur

T_r : Température du mélange réactionnel

T_a : Température corrigée de la jaquette appliquée pour calculer le flux de chaleur à travers la paroi du réacteur

Pour la chaleur accumulée:

$$Q_{acc} = q_a + q_i$$

Avec ;

q_a : Chaleur stockée par la masse réactionnelle

$$q_a = M_r * Cp_r * \frac{dT_r}{dt}$$

Avec ;

M_r : Masse réactionnelle

Cp_r : Chaleur spécifique de la masse réactionnelle

$\frac{dT_r}{dt}$: Variation de température de la masse réactionnelle

et q_i : Chaleur accumulée par les accessoires définie par

$$q_i = Cp_i * \frac{dT_r}{dt}$$

Avec ;

Cp_i : Chaleur spécifique de tout les accessoires

Q_{dos} , La chaleur du au dosage :

$$Q_{dos} = \frac{dm}{dt} * Cp * (T_r - T_{dos})$$

$\frac{dm}{dt}$ Débit massique du réactif dosé

C_p : Chaleur spécifique de réactif dosé

T_{dos} : Température de l'échantillon dosé

Et enfin la chaleur perdue par le haut du réacteur :

$$Q_{per} = \alpha * (T_r - T_{amb})$$

Avec ;

α Coefficient de perte de chaleur fourni par le constructeur

T_{amb} Température ambiante

III.3 Suivi par calorimétrie des réactions

Le suivi des réactions enzymatiques par calorimétrie se fait comme suit:

III.3.1 Suivi de l'hydrolyse enzymatique par le C80

Dans cette étude, des cellules de mélange à membrane sont donc utilisées et le mode isotherme est appliqué.

Même si le C80 offre la possibilité de réaliser la mesure des chaleurs liées aux blancs et aux réactions en simultanée (blanc dans la cellule de référence et test dans la cellule de mesure) nous avons choisi de laisser la cellule de référence vide et de découpler les blancs et les tests et ainsi réaliser le blanc et les tests dans la même cellule (cellule de mesure) et ce pour des problèmes d'agitation.

En effet, et comme le montre la Figure III. 8, on constate que lorsque les cellules de mesure et de référence sont agitées à la même vitesse, une chaleur endothermique est enregistrée par le calorimètre (A). Alors que lorsqu'on interchange les cellules, une chaleur exothermique est enregistrée (B).

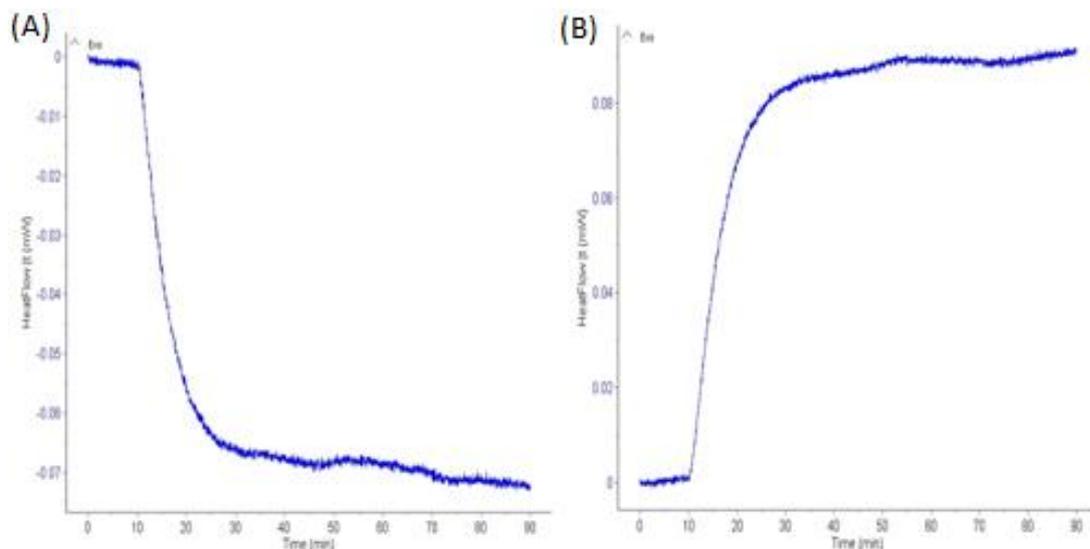


Figure III. 8. Chaleur engendrée lors de l'agitation des deux cellules (vides) au même temps

Cela signifie que les mobiles d'agitation ne créent pas la même quantité de chaleur dans les cellules et donc les chaleurs créées dans chaque puits ne se compensent pas (la chaleur créée par l'agitation dans la cellule de référence est plus importante que celle générée dans la cellule de mesure).

III.3.1.1 Préparation des essais tests et références

Les essais tests et référence sont préparés comme suit :

III.3.1.1.1 *Essais tests*

Pour l'essai de mesure, le compartiment inférieur de la cellule reçoit une quantité de substrat (cellobiose ou de paille de blé) et 1ml de tampon citrate-phosphate à pH 4,8. Le deuxième compartiment est rempli par 1,5 ml du même tampon citrate-phosphate, les différentes enzymes, l'antifongique (le cycloheximide) et l'antibiotique (la tétracycline). La Figure III. 9 présente un schéma de préparation de la cellule avec la paille de blé avant la rupture de la membrane.

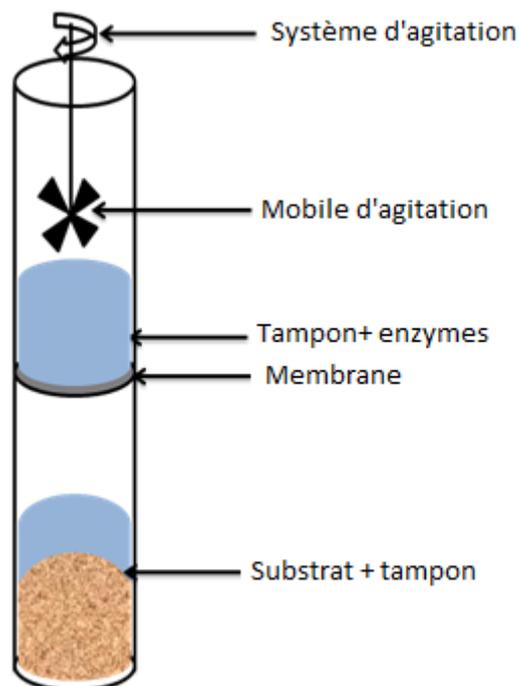


Figure III. 9. Schéma de remplissage de la cellule de mélange à membrane

III.3.1.1.2 Essais références

Lors de l'étude avec le cellobiose, la cellule pour l'essai de référence est préparée de la même manière que lors des essais tests en remplaçant l'enzyme de la β -glucosidase dans le compartiment supérieur par le même tampon citrate-phosphate.

Pour les essais de références (blanc) avec la paille de blé ; celle-ci (la paille) a été préalablement hydrolysée avec les mêmes proportions d'enzymes et de tampon dans des flacons en plastiques sous agitation pendant un temps correspondant à la moitié du temps d'hydrolyse réalisé lors des essais tests.

Ces pré-hydrolyses réalisées sur paille de blé sont effectuées dans le but d'avoir des chaleurs liées à l'agitation lors des essais de références et des essais tests les plus proches possible.

En effet, lors des essais tests, la viscosité du milieu diminue au fur et à mesure que l'hydrolyse de la paille avance (du faite de la délignification), ce qui signifie que la chaleur dégagée diminue aussi.

C'est pour compenser ces diminutions de viscosité que ces pré-hydrolyses sont réalisées.

Après ces pré-hydrolyses, les contenus des flacons sont filtrés et séchés à 105°C à l'étuve.

En ce qui concerne la préparation de la cellule, celle-ci est préparée de la même manière que les essais tests en utilisant la paille pré-hydrolysée et en remplaçant les enzymes par du tampon.

III.3.1.2 Réalisation des enregistrements

Pour chaque expérience (essais tests et blancs), les cellules d'échantillon et de référence sont introduites dans le calorimètre et ont été stabilisées à la température souhaitée avant le perçage des membranes (environ 2 h).

Après avoir enregistré une ligne de base de 10 min (choix arbitraire), la membrane en aluminium est percée grâce au mobile d'agitation. La mise en contact des réactifs est alors réalisée. Tout au long des expériences, une agitation douce est maintenue (40 tr/min pour les essais avec du cellobiose et 60 tr/min pour les essais avec la paille de blé). Ces tests ont été effectués 2 à 3 fois.

Le flux de chaleur dû à la réaction biochimique est donc la différence entre les flux enregistré lors des essais tests et des essais de référence (blanc). Cette opération est obtenue grâce au logiciel d'exploitation "Callisto processing" fourni avec le calorimètre Setaram C80.

Après 1h30 du début de l'acquisition, les échantillons sont transvasés dans des tubes Eppendorf et placés dans un bain-marie à 95°C pendant 5 min afin de dénaturer les enzymes. Les échantillons sont alors centrifugés dans une microcentrifugeuse MiniSpin à 400 tr/min pendant 5 min et filtrés à l'aide d'un filtre seringue pour séparer la paille résiduelle de l'hydrolysat.

La paille hydrolysée est séchée à l'étuve puis stockée dans des tubes Eppendorf pour être observé au microscope.

L'hydrolysat recueilli dans des tubes Eppendorf est quant à lui stocké au réfrigérateur à 4°C pour être dosé ultérieurement.

III.3.2 Suivi des procédés de production du bioéthanol par OptiMax

Le calorimètre OptiMax est utilisé pour le suivi des procédés de production d'éthanol (SSF et SHF). Lors de cette étude du cellobiose, de la paille broyée ou encore de la paille explosée sont testées.

III.3.2.1 Procédé SHF

Ce procédé est réalisé en deux temps ; dans un premier temps l'hydrolyse enzymatique du substrat est effectuée et dans un deuxième temps la fermentation est réalisée sur la solution préalablement hydrolysée.

III.3.2.1.1 Hydrolyse enzymatique

Les essais d'hydrolyse sont réalisés à la température optimale déterminée précédemment par le calorimètre C80 à savoir 45 °C.

Dans un premier temps 600 à 700 mL de tampon phosphate citrate 50mM sont introduits dans le réacteur aux quels sont ajoutés une certaine quantité de cellobiose (5 et 12 g) ou de paille de blé (8 et 12 g) selon l'essai.

Après cela la température du mélange réactionnel est stabilisée à la température de consigne (Tr), puis un premier étalonnage du système (réacteur + accessoires + tampon...) nécessaire pour le calcul du coefficient de transfert U et la chaleur spécifique massique Cp est effectuée.

Le premier étalonnage terminé, et après avoir atteint la stabilité thermique du système, l'enzyme β -glucosidase est ajoutée dans le cas de l'étude sur le substrat du cellobiose où bien un cocktail enzymatique constitué de cellulases est utilisé dans le cas de l'étude sur paille de blé.

Pendant la réaction, des prélèvements sont effectués à intervalle de temps de 15 min dans un premier temps puis l'intervalle est rallongé. Les prélèvements sont réalisés par le haut du réacteur (orifice) et ce grâce à une micropipette de 1 ml à laquelle les embouts sont réduits d'un tiers dans le cas des essais sur la paille pour permettre le prélèvement (autrement ils se bouchent).

Après 24 h ou 48 h (selon que le test soit effectué sur le cellobiose ou la paille) du début de réaction un deuxième étalonnage est effectué.

III.3.2.1.2 Fermentation

Dans le but de mesurer la chaleur liée uniquement à la fermentation (car procédés SHF), les mélanges réactionnels obtenus après la première étape d'hydrolyse sont chauffés dans le même réacteur à 75°C pendant 30 min et ce dans le but de dénaturer les enzymes et d'arrêter ainsi l'action de celles-ci.

Pour la réalisation du procédé SHF ; lors des essais de fermentation la température de consigne est abaissée à 34°C (température optimale de fermentation) pour permettre le bon fonctionnement des levures.

Comme dans le cas de l'hydrolyse, un premier étalonnage est effectué puis le mélange réactionnel est refroidi pour atteindre la température optimale de 34°C (pour la mesure du Cp une rompe de température est nécessaire et est réalisée pendant l'étalonnage). Après cela, les levures lyophilisées sont ajoutées à la solution de paille (ou de cellobiose). Pendant la réaction, des prélèvements sont effectués chaque 15 min pendant les premières heures, puis l'intervalle de temps entre deux prélèvements est rallongé. Ces échantillons ainsi prélevés sont alors chauffés dans un bain Marie à 85°C pendant 15 min dans le but de détruire les levures. Enfin un deuxième étalonnage est effectué.

III.3.2.2 Le procédé SSF

Comme indiqué dans le premier chapitre, lors de ce procédé SSF, les deux étapes d'hydrolyse et fermentation sont réalisées en même temps et dans le même réacteur. Ce procédé est réalisé à 37°C.

Après avoir introduit le tampon phosphate citrate et la paille de blé (de 12 à 130 g) ou le cellobiose (8 ou 12 g) dans le réacteur ce mélange réactionnel est porté à une température de 80°C et ce dans le but d'éliminer le maximum de microorganismes qui pourraient consommer les sucres qui seront ultérieurement produits par hydrolyse. Cette température est maintenue pendant 30 min après lesquelles la température est abaissée à 37°. Puis 22 g de levure lyophilisée sont ajoutés au mélange.

Après avoir stabilisé la température du système et effectué le premier étalonnage nécessaire au calcul du coefficient de transfert et la chaleur spécifique, le cocktail enzymatique constitué de la G220+SP18 dans le cas des études sur la paille de blé (où l'enzyme SP188 seule dans le cas des études sur le cellobiose) est ajouté au mélange réactionnel par le haut du réacteur.

Préalablement à l'ajout, les enzymes sont tempérées dans un bain Marie dans le but de se rapprocher de la température du mélange réactionnel afin de perturber le moins possible la stabilité thermique du système. Aussi la température des enzymes est mesurée juste avant l'ajout et ce dans le but de prendre en compte la chaleur liée au dosage dans le calcul de la chaleur des réactions d'hydrolyse et fermentation.

Ici encore des prélèvements à intervalle de temps de 15 min sont effectués dans un premier temps et après 2h de l'ajout des enzymes les intervalles de temps entre deux prélèvements sont augmentés. Le premier échantillon est prélevé juste avant l'ajout des enzymes.

Ces échantillons sont alors chauffés à 85°C puis stockés au congélateur pour être analysés ultérieurement.

Après que le signal thermique soit retourné à la ligne de base, le deuxième étalonnage est effectué.

III.3.3 Analyse des produits

Les différents prélèvements récoltés lors de ces essais sont préparés et analysés comme suit :

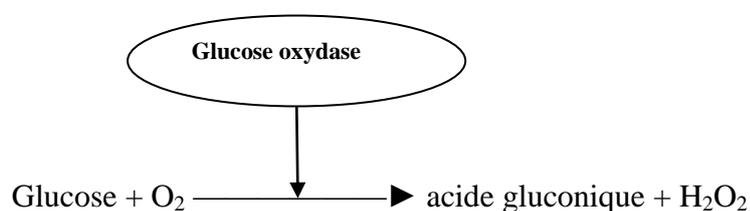
III.3.3.1 Préparation des échantillons

Avant analyse, les échantillons doivent être totalement dépourvus de particules solides. C'est pour cela qu'une centrifugation des échantillons suivi d'une filtration par des filtres seringues sont réalisées au préalable des analyses.

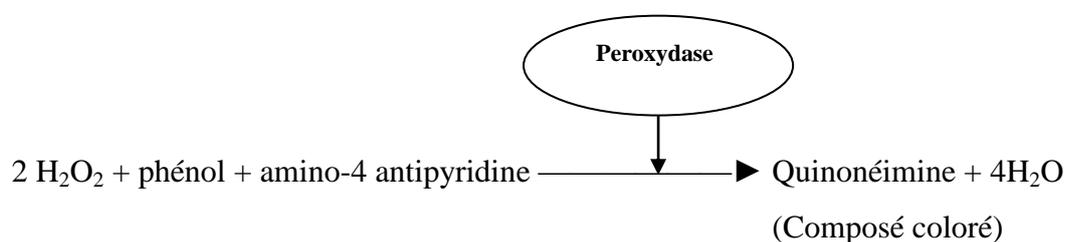
III.3.3.2 Dosage du glucose

III.3.3.2.1 Principe

Le dosage du glucose se fait en utilisant des kits de glucose RTU ND (bioMérieux réf 61269/270). Ce kit utilise la séquence glucose oxydase- peroxydase- chromogène suivant les réactions :



L'eau oxygénée ainsi formée est dosée selon la réaction de Trinder (1969) [144] :



L'intensité de la coloration des différents échantillons est alors mesurée par spectrophotométrie.

III.3.3.2 Méthode de dosage

Après avoir dilué le contenu de chaque tube Eppendorf afin de se trouver dans la gamme des étalons utilisés, 10 μ l du contenu de chaque tube Eppendorf sont introduits dans une plaque en PVC de Fisher à 96 puits.

Le glucose formé lors des différents essais réalisés est révélé par ajout de 200 μ L de la solution RTU et l'absorbance est mesurée par lecture au scanner (Multiskan Ascent) à une longueur d'onde de 505 nm. La concentration est alors déterminée en utilisant une droite étalon obtenue à partir d'une gamme de glucose entre 0 et 10 mM. Cette courbe d'étalonnage est déterminée à chaque dosage du glucose. Un exemple de droite d'étalonnage est présenté en annexe (1).

III.3.3.3 Détermination des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs sont des sucres simples donneurs d'électrons dans une réaction d'oxydo-réduction (comme le glucose, le fructose et le maltose). Ces sucres ont été dosés par la méthode de Miller (1959) [141], [106]. Cette technique se base sur la réduction de l'acide 2,3-dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique par les sucres, à chaud selon la réaction décrite en Figure III. 10. Le produit de la réaction en milieu basique développe une coloration jaune orangé.

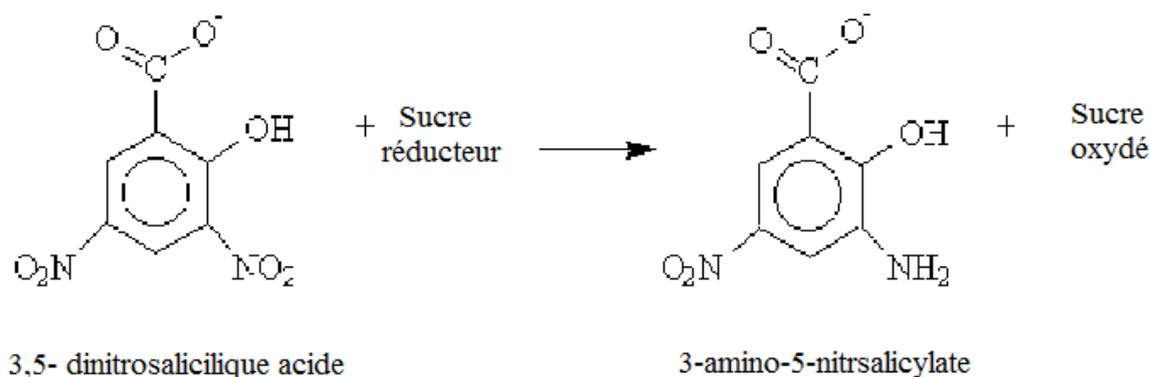


Figure III. 10. Réaction du DNS avec un sucre réducteur

Le DNS ou dinitrosalicylique est préparé à partir des réactifs suivant :

- 2,5 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique

- 75 g de sodium potassium tartrate
- 4 g d'hydroxyde de sodium

Ces réactifs sont dissous, dans l'ordre, dans 250 ml d'eau distillée. La préparation est ensuite conservée à l'obscurité.

Les échantillons à doser ont été dilués convenablement dans de l'eau distillée de façon à obtenir des concentrations de sucre réducteur entre 0 et 1,8 g/L. 30 μ L de chaque échantillon et 90 μ L de DNS sont placés dans une plaque en PCR. Cette plaque est recouverte d'une feuille d'aluminium pour empêcher l'évaporation. La plaque est ensuite placée dans une étuve afin de porter les mélanges qui s'y trouvent à ébullition et ce pendant 10 min puis celle-ci est refroidie à température ambiante.

80 μ L de chaque puits sont alors transférés dans une plaque transparente en PVC de Fisher à 96 puits.

La densité optique est lue à 575 nm. La courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de glucose. Celle-ci est déterminée à chaque dosage des sucres réducteurs. Un exemple de droite d'étalonnage est présenté en annexe (2).

III.3.3.4 Détermination des différents carbohydrates et l'acide gluconique

L'acide gluconique produit par l'hydrolyse enzymatique de la paille a été dosé par la méthode décrite par Bye et al (2011) [143]. Cette technique se base sur la chromatographie haute performance échangeuse d'anion couplée à une détection ampérométrique (PAD) (ICS 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant de l'acide gluconique (Sigma-Aldrich) à des concentrations entre 0 et 2 mM. Tous les essais sont effectués en triple.

III.3.3.5 Dosage de l'éthanol

Le dosage de l'éthanol produit est effectué par chromatographie gazeuse. L'appareil utilisé est le GC Varian 3800 qui est constitué d'un injecteur, d'une colonne capillaire et d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est la CP-Sil 5 CB de Varian de 60 m de longueur et de 0,32 mm de diamètre interne.

Les injections sont réalisées à l'aide de micro-seringues en verre.

Les réglages de l'appareil GC Varian 3800 sont comme suit :

- Température d'injection : 70°C pendant 10 min

- Pression de la colonne : 11,4 psi
- Gaz vecteur : Hélium
- Volume injecté : 1µl

La méthode d'étalon interne a été utilisée pour quantifier l'éthanol présent dans les échantillons. Celle-ci est détaillée en annexe (3).

III.3.3.6 Observation au Microscope électronique à balayage (MEB)

Des échantillons de paille avant et après hydrolyse sont séchés à température ambiante et placés sur des rubans adhésifs fixés sur des plots. Ces échantillons sont métallisés pendant 1 min dans un métaliseur Quorum SC7620 Mini Sputer Coater. Les clichés de microscopie électronique à balayage ont été réalisés au microscope de paillasse de la marque Hitachi TM3000.

III.4 Conclusion

A travers ce chapitre, une description détaillée des calorimètres utilisés ainsi que les méthodes expérimentales basées sur la calorimétrie, notamment les techniques utilisées pour le suivie des réactions enzymatiques et des procédés de production d'éthanol ont été exposées.

La suite du chapitre été consacrée à la présentation des différentes techniques expérimentales utilisées pour analyser les produits des réactions mis en œuvre lors des différents tests.

Le chapitre suivant présentera les résultats expérimentaux obtenus à partir de mesures utilisant ces techniques.

**IV HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR
MICROCALORIMETRE C80**

Ce chapitre est consacré à la présentation et discussion des résultats obtenus pour l'étude de l'hydrolyse enzymatique réalisée dans le microcalorimètre C80.

Dans un premiers temps, la fiabilité du calorimètre C80 est vérifiée par l'étude de l'hydrolyse enzymatique du cellobiose par la β -glucosidase et par la détermination des constantes cinétiques de cette enzyme en comparaison aux constantes cinétiques obtenues par spectrophotométrie.

Dans un deuxième temps, les résultats du suivi par calorimétrie de l'hydrolyse de la paille sont discutés et les conditions opératoires optimales seront mises en évidence. Puis une méthode de calcul des constantes cinétiques du cocktail enzymatique sera proposée et discutée.

IV.1 Calorimètre C80

L'hydrolyse du cellobiose et de la paille micronisée est étudiée à l'aide de ce calorimètre.

IV.1.1 Hydrolyse du cellobiose

L'hydrolyse enzymatique du cellobiose se fait selon la réaction suivante :



L'obtention du flux de chaleur liée à l'hydrolyse enzymatique se fait donc en deux étapes :

IV.1.1.1 Essais tests

L'hydrolyse du cellobiose a été effectuée en utilisant l'enzyme de la β -glucosidase. Les quantités initiales de ce disaccharide étaient de 50 à 100 mg. La concentration de l'enzyme dans la solution tampon était de 32-80 mg/g solution. Le tampon utilisé était du sodium phosphate 50 mM à pH 4,8.

Après l'obtention d'une ligne de base stable durant 10 min (choix arbitraire), la membrane d'aluminium qui sépare l'enzyme et le cellobiose a été perforée. Le flux thermique a été suivi pendant une durée de 90 mn. L'un des thermogrammes obtenu pour une quantité d'enzyme de 100 μ l est présenté dans la Figure IV.1.

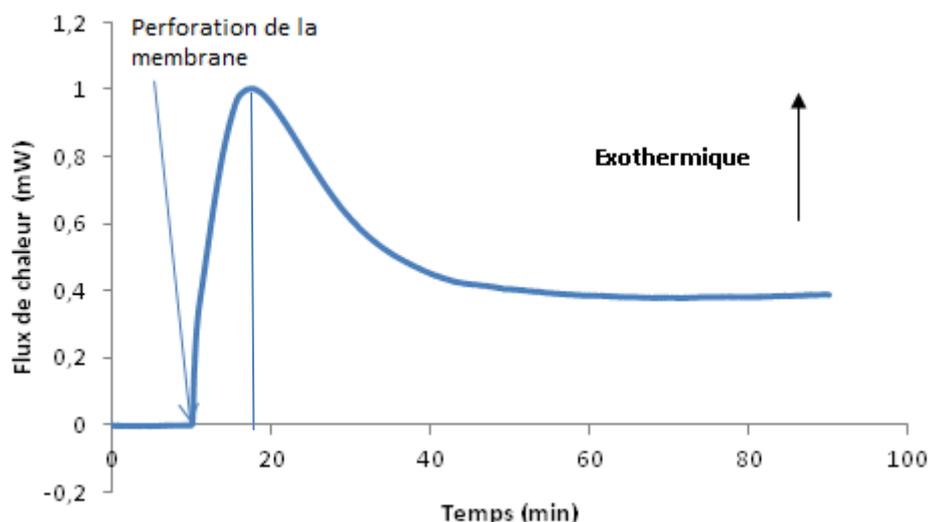


Figure IV. 1. Thermogramme brut obtenu pour 100 μ l de β -glucosidase, 0.1mM de cellobiose dans le tampon 50 mM sodium phosphate (pH 4.8) à 37°C sous agitation constante de 40 rpm.

A partir de ce thermogramme Figure IV. 1, on peut voir qu'après la mise en contact des réactifs et la mise en route de l'agitation, le flux de chaleur augmente rapidement pour atteindre un maximum à 1 mW pour un temps $t = 17$ min environ.

Après cet instant, le flux de chaleur décroît pour atteindre un palier après 50 min du début d'agitation à environ 0,4 mW.

Le non-retour à la ligne de base initiale (0 mW) est tout à fait normal car l'agitation crée de la chaleur et celle-ci n'était pas enclenchée lors de l'enregistrement de la ligne de base. La chaleur créée dans ce cas-là par l'agitation est donc d'environ 0,4 mW.

IV.1.1.2 Essais blancs

Afin de quantifier la chaleur liée aux phénomènes autres que l'hydrolyse telle que l'agitation, des essais blancs sont réalisés.

Ces essais sont réalisés exactement dans les mêmes conditions que les essais tests en remplaçant la quantité d'enzyme par le même volume de tampon. L'un des enregistrements obtenus est présenté dans la Figure IV. 2.

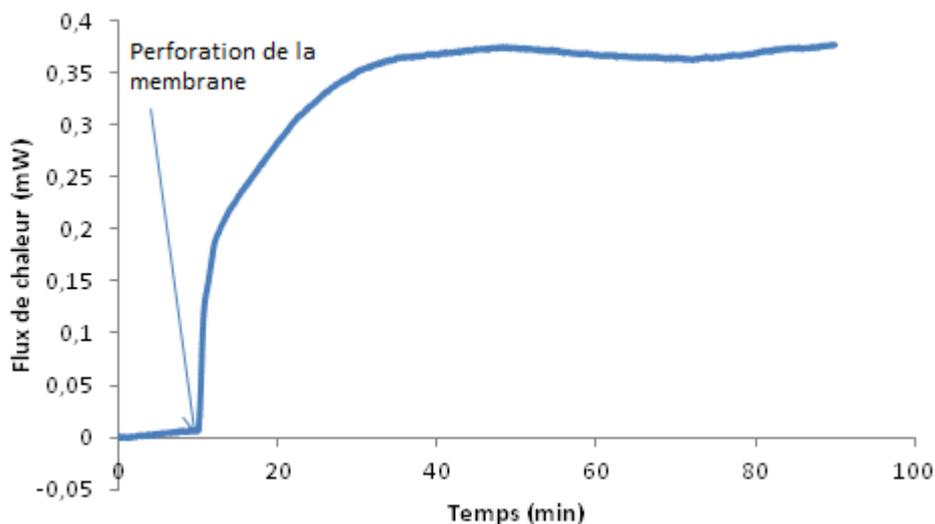


Figure IV. 2. Thermogramme brut obtenu pour un essai sans β -glucosidase, 0,1mM de cellobiose dans le tampon 50 mM sodium phosphate (pH 4.8) à 37°C sous agitation constante de 40 rpm.

A partir de la Figure IV. 2, on remarque qu'à partir de la perforation, une augmentation du flux est enregistrée et que celui-ci se stabilise rapidement aux alentours de 0,38 mW.

IV.1.1.3 Flux de l'hydrolyse

Les flux de chaleur liés à l'hydrolyse sont obtenus par soustraction des flux de chaleur des tests blancs aux flux de chaleur obtenus lors des essais tests. Cette procédure est classique et a été décrite dans J-H. Ferrasse (2000) [145] par exemple. Cette soustraction permet d'obtenir le flux de chaleur associé au phénomène l'on souhaite étudier, ici l'hydrolyse.

On retrouve sur la Figure IV. 3 un exemple de résultat obtenu pour une concentration de 0,1 mM de cellobiose et 100 μ l de β -glucosidase.

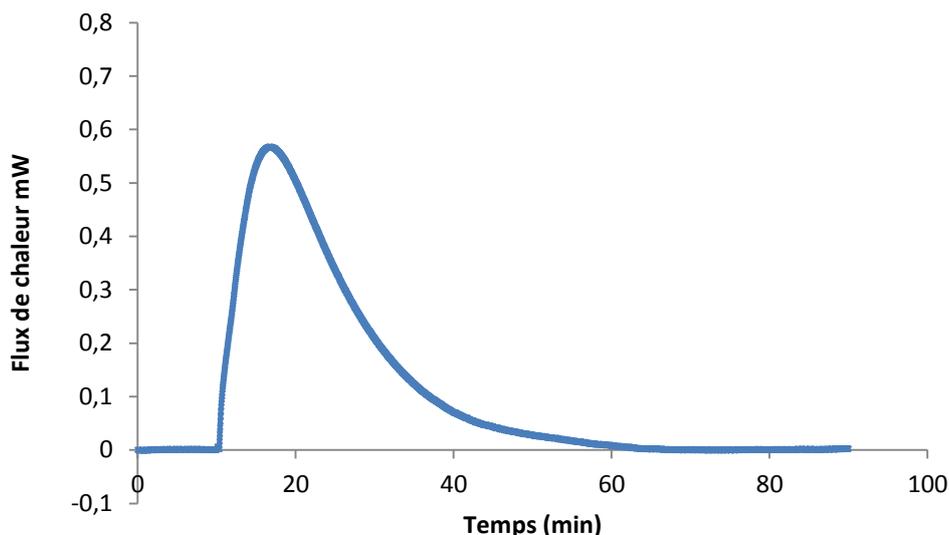


Figure IV. 3. Thermogramme de l'hydrolyse obtenu après soustraction du blanc pour 100 μ l de β -glucosidase, 0,1mM de cellobiose dans le tampon 50 mM sodium phosphate (pH 4.8) à 37°C sous agitation constante de 40 rpm.

A partir de la Figure IV. 3 on remarque qu'après la perforation de la membrane et la mise en contact des réactifs, le flux de chaleur augmente rapidement pour atteindre un maximum aux environs de 0,55 mW après un temps de 9 min. après cet instant, le flux de chaleur diminue progressivement pour retourner à la ligne de base environ 50 min après le début de la mise en contact.

L'augmentation de la puissance thermique produite signifie que l'hydrolyse du cellobiose est exothermique. La puissance thermique retournant à la ligne de base initiale indique qu'il n'y a plus de production de chaleur

L'épuisement du cellobiose au temps supérieur à 90 minutes a été vérifié par le test de l'acide 2,3-dinitrosalicylique (DNS). Le résultat obtenu est supérieur ou égal à 98,7 % de conversion du cellobiose initialement introduit. Ce résultat confirme la conversion quasi-totale du cellobiose en glucose (la β -glucosidase est une enzyme spécifique à la transformation du cellobiose en glucose).

La différence par rapport au 100 % de conversion est certainement due à la non conversion d'une petite quantité de cellobiose (resté sur les parois) où à des erreurs de manipulation.

D'autre part, les résultats pour les essais de différentes concentrations en cellobiose montrent que plus la quantité de cellobiose introduite est importante plus la surface du pic

engendré est importante. Néanmoins il est vérifié que la chaleur dégagée ramenée à l'unité de masse est constante. Les résultats obtenus sont regroupés dans Tableau 10.

Tableau 10. Chaleurs engendrées pour différentes masses de cellobiose

Quantité de cellobiose (mg)	50	85	100
Chaleur engendrée (J)	0,339	0,589	0,697
Chaleur engendrée (J/g)	6,789	6,934	6,971
Chaleur engendrée (kJ/mol)	2.323	2.373	2.386

L'enthalpie molaire d'hydrolyse du cellobiose est calculée en divisant la surface intégrée au-dessus de la ligne de base par la quantité de cellobiose qui a réagi.

La moyenne des enthalpies molaires hydrolyse de la liaison glycosidique β -1-4 calculée à partir des réplicats pour les différentes masses à 37°C est de $-2,38 \pm 0,15$ kJ / mol. Cette valeur est en bon accord avec la valeur relevée dans de la littérature de $-2,34 \pm 0,12$ kJ / mol, elle aussi obtenu par calorimétrie isotherme [146].

D'autre part, les enthalpies molaires d'hydrolyse mesurées par le C80 à des températures de 25 et 45°C sont respectivement de $2,39 \pm 0,09$ et $2,37 \pm 0,18$.

Ces mesures montrent que la température dans la gamme étudiée n'a pas ou peu d'impact sur l'enthalpie molaire d'hydrolyse du cellobiose. Ce résultat est aussi en accord avec des observations antérieures [147].

Ces résultats de mesure de l'enthalpie molaire de l'hydrolyse enzymatique du cellobiose obtenus par le microcalorimètre C80 montrent donc une très bonne concordance avec les résultats issus de la littérature. Ce calorimètre peut donc être considéré comme étant fiable. Une étude crédible de l'hydrolyse de substrats plus complexes est donc envisageable.

IV.1.2 Hydrolyse de la paille

Dans cette partie l'hydrolyse d'un substrat naturel est étudiée et suivie par calorimétrie. Pour cela de la paille de blé micronisée est utilisée. Plusieurs paramètres seront testés, la température, la quantité du chargement qui peut être traité par une quantité d'enzyme donnée et en fin deux cocktails enzymatiques seront étudiés.

IV.1.2.1 Effet de la température

Afin de déterminer l'effet de la température sur l'hydrolyse enzymatique, des températures entre 40 et 55 °C ont été testées. Les expériences ont été réalisées dans des cellules à mélanges avec de la paille micronisée (0,125 g), dans une solution de tampon phosphate sodium 50 mM à pH= 4,8. Pour chaque essai, 15µL SP188, 15µL CDH and 30 µL GC220.10 µL d'antifongique et 20 µL d'antibiotique sont aussi utilisés

Pour ces essais, le même, le même protocole que pour le cellobiose est appliqué. Seuls les résultats après soustraction du blanc seront présentés.

Les résultats obtenus sont repris dans la Figure IV. 4.

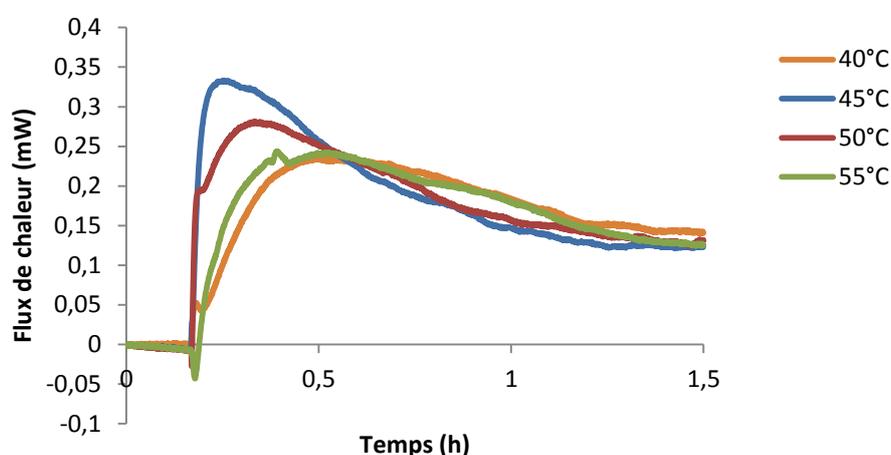


Figure IV. 4. Thermogrammes de l'hydrolyse corrigés pour différentes températures pour une masse de 0,125 g de pailles

La Figure IV. 4 montre que comme pour l'hydrolyse du cellobiose, l'hydrolyse de la paille est aussi exothermique.

Cette exothermicité est prévisible, car la paille de blé est constituée majoritairement de polysaccharides dont la cellulose, qui est comme le cellobiose, constituée d'une chaîne linéaire de molécules de D-glucose liées par des liaisons β -(1→4) et comme cela a été démontré précédemment, la rupture de cette liaison est exothermique.

Les chaleurs d'hydrolyse à différentes températures qui sont obtenues par intégration directe des aires sous les courbes sont reprises dans la Figure IV. 5.

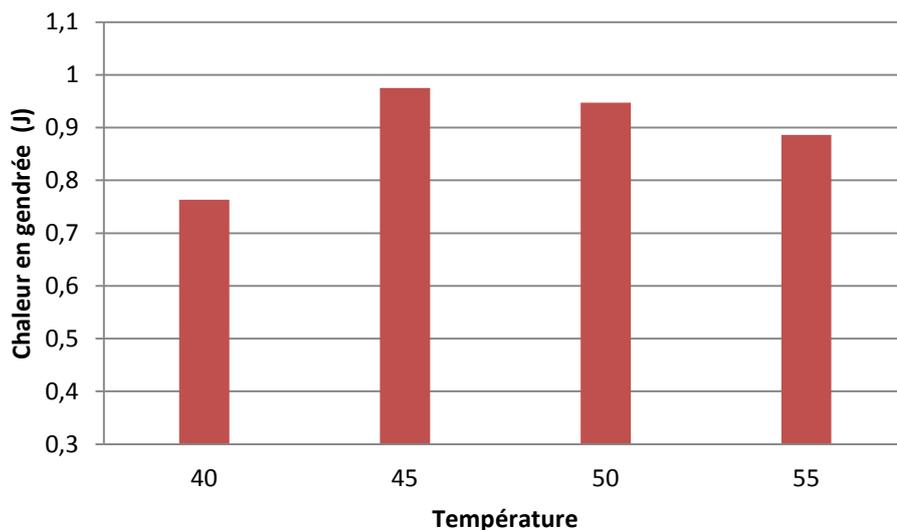


Figure IV. 5. Chaleur d'hydrolyse pour différentes températures

La Figure IV. 5 montre que la chaleur d'hydrolyse la plus importante a été observée à 45°C avec une chaleur de 0,975 J et que la plus petite est relevée à 40°C avec une chaleur de 0,763 J. Néanmoins, la différence entre les aires engendrées pour les températures 45, 50 et 55°C (respectivement de 0,975, 0,947 et 0,886 J) reste minimale et peu significative. En effet l'écart entre le plus grand des pics et le plus petit est inférieur à 10 %.

D'autre part, sur la Figure IV. 5 on peut voir qu'après 80 min de réaction, les courbes de flux de chaleur ne rejoignent pas la ligne de base initiale. Cela signifie qu'il y a encore de la chaleur produite et donc que la réaction d'hydrolyse n'est pas achevée. Ces courbes représentant les essais à 40°C, 45°C, 50°C et 55°C se rejoignent au bout de 80 min et forment des plateaux aux environs de 0,12 mW.

Cela signifie qu'à partir d'un certain temps de mise en contact entre le substrat et les enzymes, la température a peu d'influence sur le flux de chaleur engendré. Autrement dit, la vitesse de réaction en fin d'expérimentation est peu sensible à la température dans le domaine de température étudié.

Afin de vérifier si les chaleurs enregistrées peuvent bien être corrélées avec le taux d'hydrolyse, le glucose produit à la fin des essais précédents (après 90 min d'hydrolyse) a été dosé par DNS. Les résultats obtenus sont repris dans la Figure IV. 6.

Remarque : Les barres d'erreurs présentées sur les figures représentent les écarts types pour différents essais.

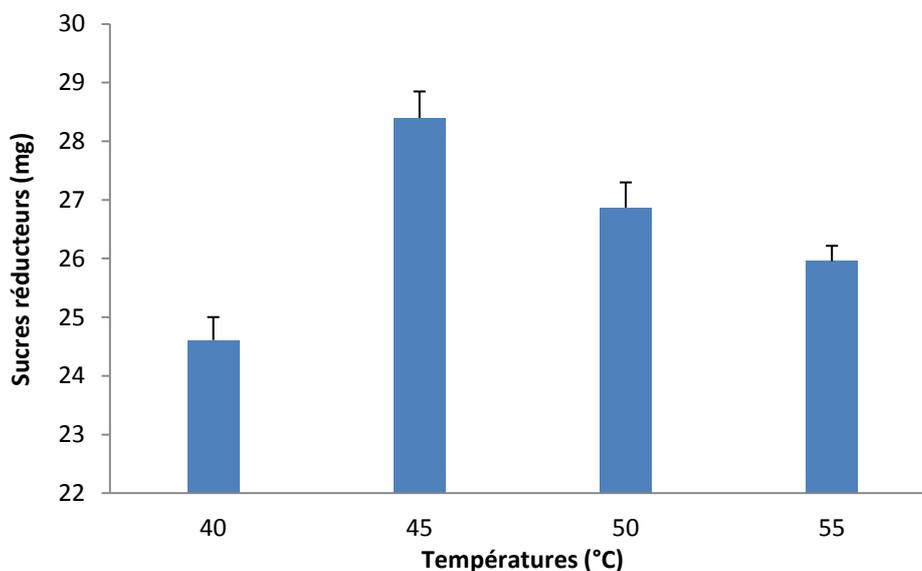


Figure IV. 6. Quantité de glucose produit à différentes températures pour 0.125 g de paille

Le dosage des sucres réducteurs pour les essais à différentes températures illustré en Figure IV. 6 révèle qu'une plus forte production est enregistrée à 45 °C suivi par 50 °C, 55 °C et enfin 40°C.

Cette évolution est la même que celle enregistrée pour la chaleur produite. On peut donc dire que la chaleur enregistrée est proportionnelle à la quantité de sucre produite.

Cela peut être expliqué par le fait que lorsqu'on augmente la température, les enzymes sont plus actives entre 40°C et 45°C, le cocktail enzymatique est moins efficace au-delà de 45°C. En effet les enzymes sont thermosensibles et il est probable que les protéines se dénaturent et perdent donc une partie de leurs activités enzymatiques [148] [149].

Par ailleurs, les taux de conversion des polysaccharides contenus dans la paille en monosaccharides après 90 min d'hydrolyse enzymatique pour différentes températures testées s'échelonnent de 28.95 à 33.41 %. Ces taux sont calculés en rapportant les quantités de sucre produites aux quantités de cellulose et hémicelluloses contenus dans 125 mg.

Enfin, comme le montre la Figure IV. 7 dans le domaine de température étudié, la chaleur engendrée par la réaction d'hydrolyse rapportée au gramme de sucre réducteur est quasiment constante et est de $33,6 \pm 1,8$ J/g ($6,06 \pm 0,33$ kJ/mol (les sucres réducteurs sont assimilés au glucose)). Cela signifie que la température n'a pas ou peu d'impact sur la chaleur massique d'hydrolyse (écart inférieur à 6%), ce qui renforce les observations faites en

paragraphe IV.1.1 et confirme de précédents résultats observés dans la littérature [144], à savoir que la température, dans la gamme étudiée, a peu d'impact sur l'enthalpie d'hydrolyse.

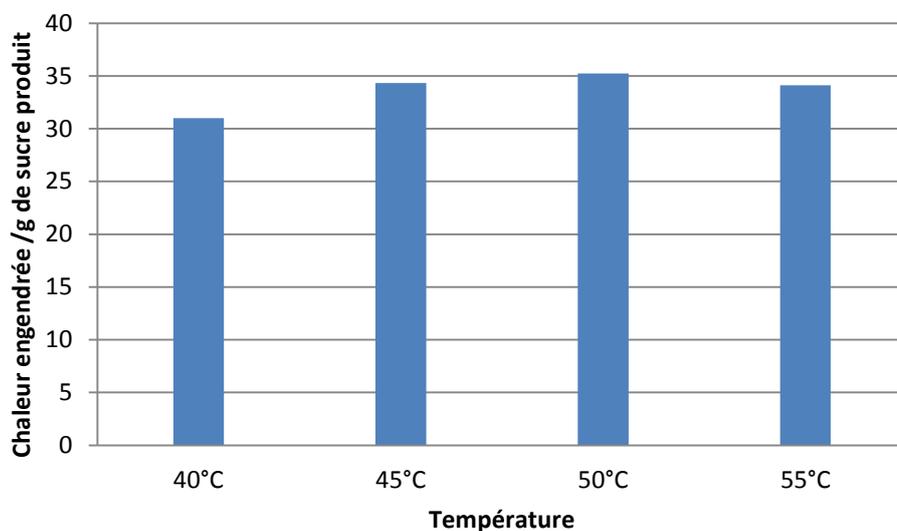


Figure IV. 7. Chaleur produite rapporté à la quantité de sucre produit

IV.1.2.2 Effet de la masse de substrat

Afin d'étudier l'impact de la masse de substrat et d'optimiser la quantité qui peut être hydrolysée par une quantité de cocktail enzymatique donnée (15 μ L SP188, 15 μ L CDH and 30 μ L GC220), les masses suivantes : 0,075 - 0,1g - 0,125g -0,1375 et 0,15g ont été testées pour un volume total de solution de 2,5 ml. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Figure IV. 8

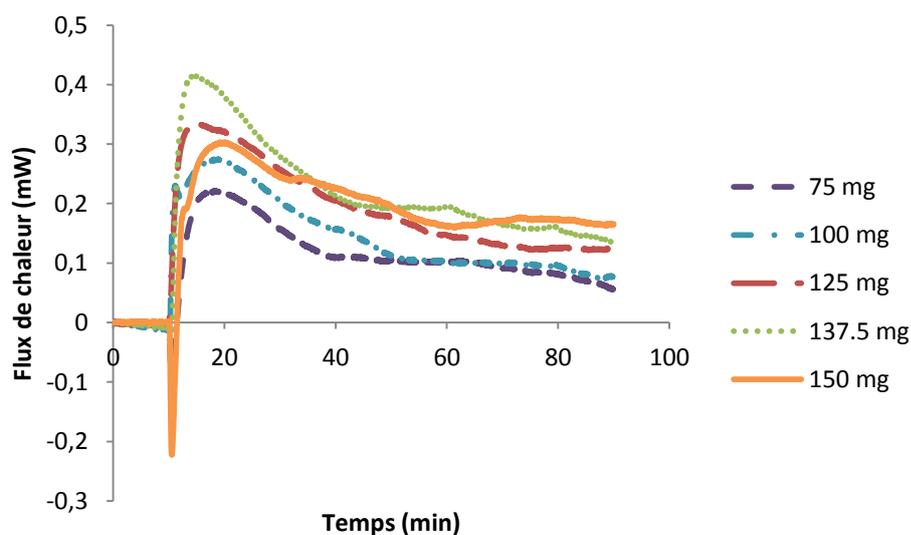


Figure IV. 8. Thermogrammes de l'hydrolyse obtenus après soustraction des blancs pour différentes masse de paille à 45°C

Les thermogrammes illustrés en Figure IV. 8 montrent des pics aigus négatifs observés juste après la perforation de la membrane correspondant à la chaleur de dilution lors de la mise en contact de la solution de substrat et la solution d'enzyme dans la cellule calorimétrique, phénomène reporté par une autre étude [135]. Plus le chargement est grand, plus le pic endothermique l'est aussi.

Par ailleurs, ce phénomène est aussi observé lors des tests à différentes températures (Figure IV. 4), mais celui-ci est plus au moins constant pour toutes les températures testées et surtout moins intense que dans le cas des fortes charges. En effet, la chaleur calculée pour les différentes températures testées varie de 0 mJ à 0,004 mJ alors que pour différentes masses testées, la chaleur engendrée est proportionnelle au chargement et varie de 0 mJ à 0.031mJ.

Cette chaleur endothermique peut être attribuée à la dilution de la paille ou à la dissolution de sels qui composent la paille.

A partir de ces mêmes thermogrammes, il est aussi remarquable de noter que la hauteur des pics est proportionnelle à la charge en paille avec un maximum pour la masse 0,1375 g.

Les chaleurs dégagées (les pics exothermiques uniquement) suivent également la même évolution. En effet, les chaleurs engendrées par la réaction sont proportionnelles à la quantité de paille chargée dans le calorimètre avec un optimum pour la masse de 0,1375 g et au-delà de cette dernière la quantité de chaleur diminue comme illustré sur la Figure IV. 910.

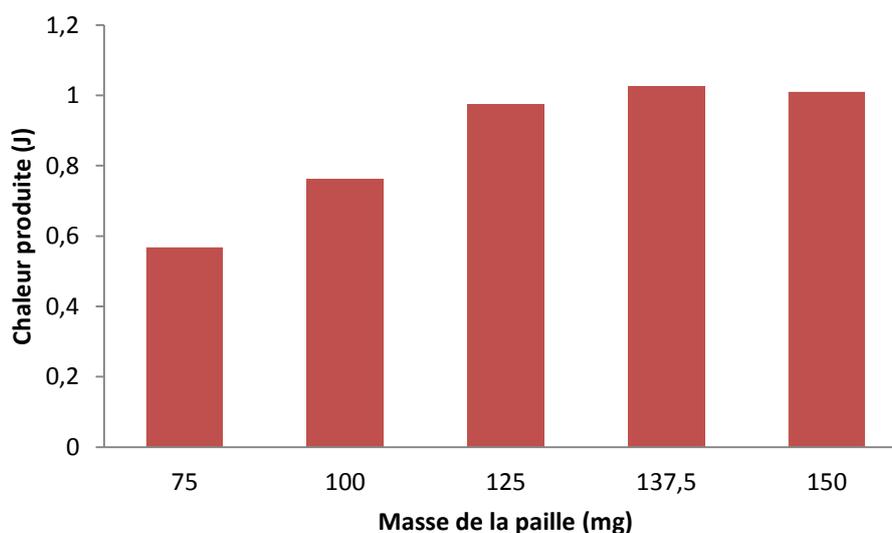


Figure IV. 9. Chaleurs de l'hydrolyse obtenues pour différentes masse de paille à 45°C

En d'autres termes, lorsque la masse de paille est inférieure à 0,1375 g on peut estimer se retrouver dans le cas d'une limitation en substrat.

Les augmentations de quantités de chaleur avec l'augmentation des charges en paille sont attribuées au fait que plus il y a de la paille plus il y a de polysaccharide, et donc de liaisons hydrolysables.

Néanmoins, la chaleur dégagée lors du test avec 0,15 g de paille est moins importante que les autres malgré une plus forte charge. Cela peut être expliqué par l'inhibition de l'enzyme par le substrat ou la lignine; phénomène observé et reporté dans d'autres études [67], ou par le fait que les enzymes soient moins disponibles car adsorbées sur la paille [150], [151] ou encore par un problème de transfert de matière dans le milieu hétérogène.

Par ailleurs, comme le montre la Figure IV. 10, si on rapporte la chaleur engendrée à la quantité de paille hydrolysée, on constate que les différents rapports obtenus sont quasiment constants et sont égaux à plus ou moins à $0.74 \pm 0.4 \text{ J/g}_{\text{paille}}$.

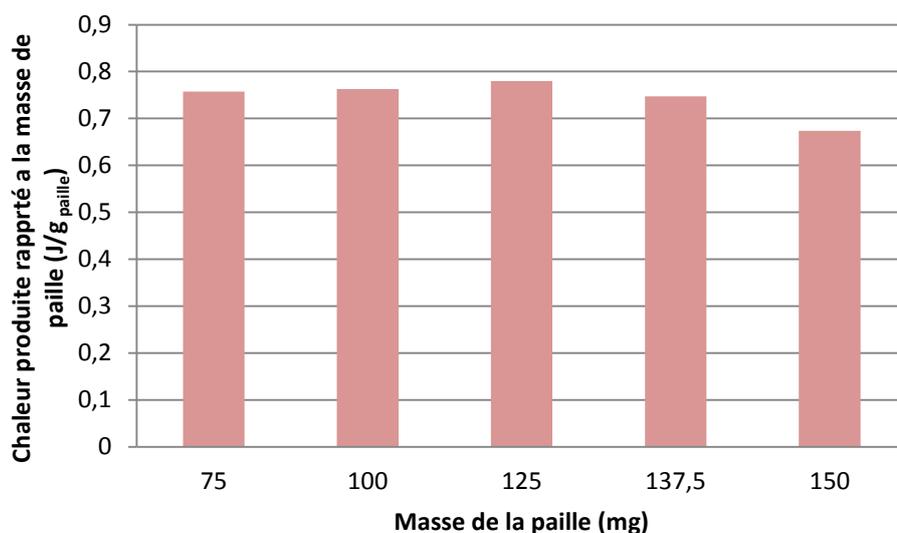


Figure IV. 10. Chaleurs d'hydrolyse rapportées au gramme de paille à 45°C

Lorsqu'on observe la courbe obtenue pour la masse de 0,15g (Figure IV. 8), on constate des ondulations. Celles-ci peuvent être expliquées par le fait qu'à forte concentration en paille, celle-ci crée des agglomérats et au fur et à mesure que ces derniers cassent du fait de l'agitation, les polysaccharides deviennent disponibles et donc l'hydrolyse reprend et donc de la chaleur est produite. Ceci renforce l'hypothèse d'une limitation au transfert de matière.

Ces résultats montrent bien l'impact de la quantité de substrat sur l'hydrolyse enzymatique. En effet une petite quantité fait qu'on se retrouve en limitation de substrat et par conséquent l'enzyme n'est pas exploitée à son maximum.

Une trop grande quantité de chargement quant à elle, empêche le bon déplacement des enzymes (du moins à faible agitation) et donc le substrat (paille) n'est pas exploité dans sa totalité.

Contrairement à la variation de température, les courbes de flux de chaleurs de la variation de quantité de substrat ne se coupent pas (sauf dans le cas de la plus forte charge étudiée) pas mais sont parallèles les unes aux autres.

De plus les hauteurs des paliers à la fin des essais sont proportionnelles à la quantité de substrat introduite. En effet, plus la quantité de substrat est grande, plus le flux de chaleur se stabilise plus haut. Cela signifie qu'à partir d'un certain temps, les vitesses d'hydrolyse se stabilisent mais celles-ci sont fonction de la quantité de substrat ; plus celle-ci est grande plus la vitesse de réaction l'est aussi.

En effet, si on rapporte les flux de chaleurs obtenues à la masse de paille utilisé comme illustré en Figure IV. 11, on remarque que les courbes des différentes masses se superposent plus au moins, sauf pour celle enregistrée pour l'essai avec 150 mg de paille.

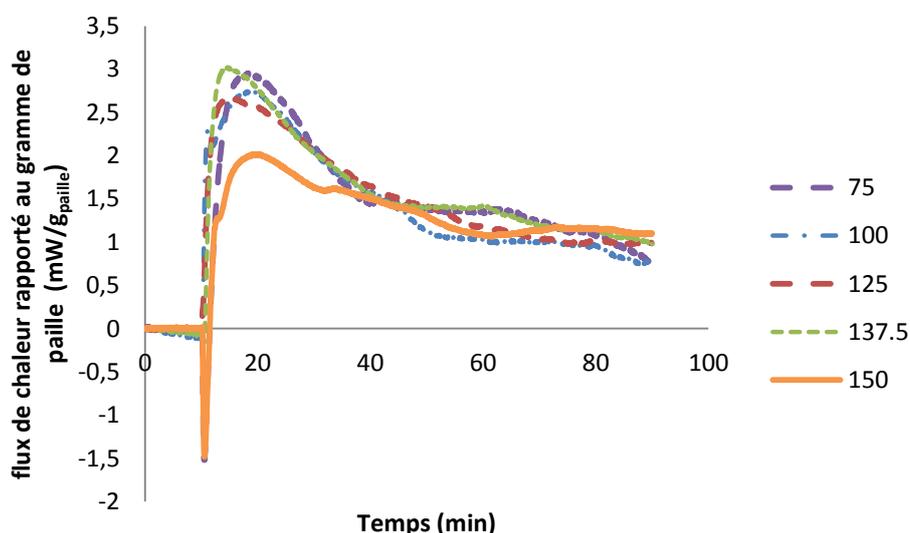


Figure IV. 11. Flux de chaleur rapportés à la quantité de paille utilisée

A partir des observations faites au paragraphe IV.1.2.1 , on peut donc dire que la vitesse de réaction en fin d'expérimentation est impactée par la quantité de substrat qui est mis en réaction mais peu par la température (dans la gamme étudiée) ce qui peut faire penser

qu'à partir d'une certaine quantité de paille initiale, la vitesse est limitée par le transfert de matière au sein de la paille.

Ici encore dans le but de vérifier si les chaleurs enregistrées peuvent bien être corrélées avec le taux d'hydrolyse, les sucres produits ont été dosés par DNS après 90 min d'hydrolyse. Les résultats obtenus sont repris dans la Figure IV. 123.

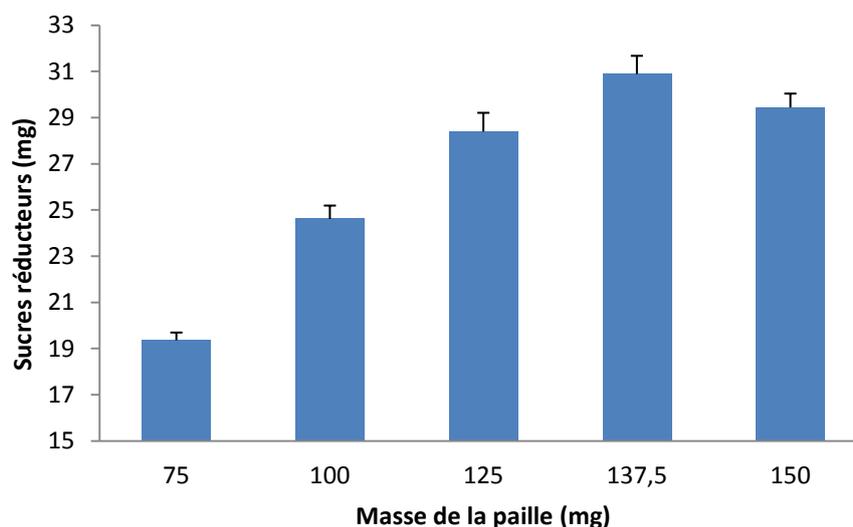


Figure IV. 12. Quantité de sucres réducteurs produite pour différentes masses de paille

La Figure IV. 122 montre clairement un optimum de production. Cet optimum, pour une masse de 0.1375g, coïncide avec l'optimum de chaleurs dégagées présenté en Figure IV. 10.

La Figure IV. 134 permet visualiser le rendement par rapport à la quantité de substrat. Pour cela les quantités de sucres réducteurs mesurées sont rapportées au gramme de paille utilisé et la Figure IV. 145 permet quant à elle de voir le taux de conversion des polysaccharides en monosaccharides

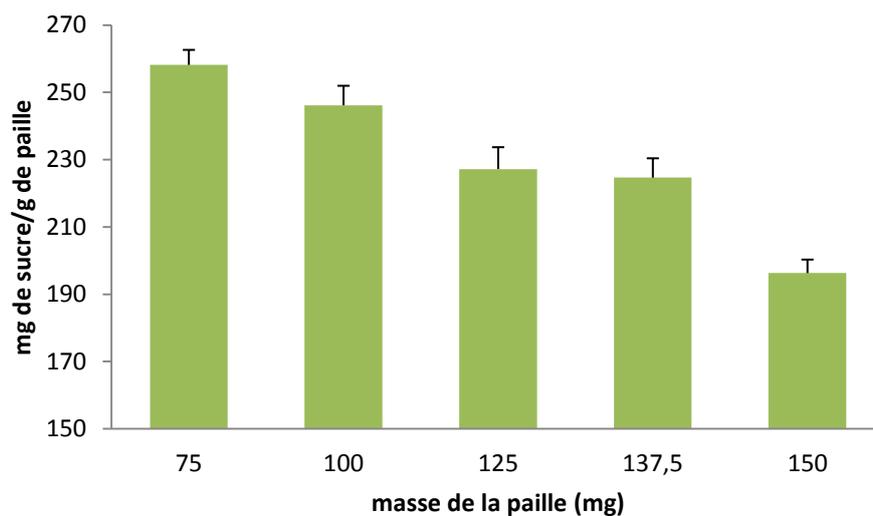


Figure IV. 13. Sucres réducteurs produits rapporté au gramme de paille

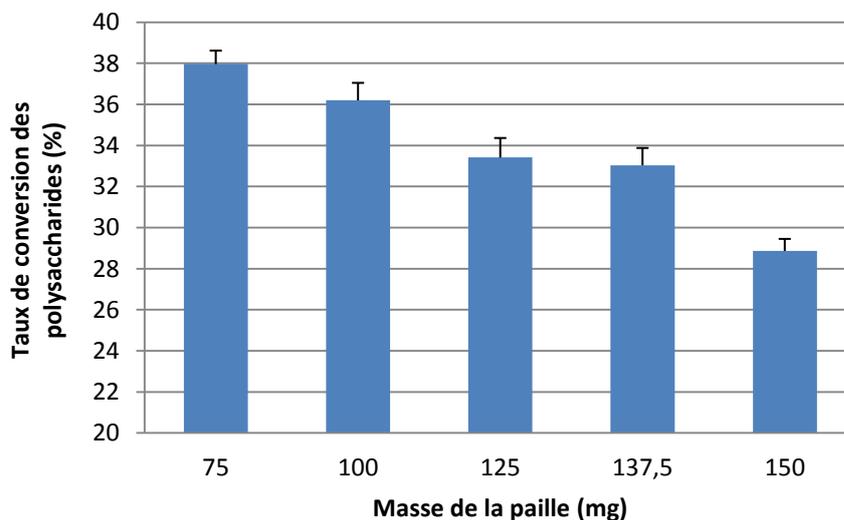


Figure IV. 14. Taux de conversion des polysaccharides en fonction de la masse de paille

La Figure IV. 134 montre que le rendement en sucre réducteur est inversement proportionnel à la quantité de paille chargée. En effet plus on introduit de la paille, plus le rendement est faible.

De même, le taux de conversion des polysaccharides qui est le rapport des sucres réducteurs produits et des polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) contenus initialement dans la paille est inversement proportionnel à la quantité de paille chargée. Ces taux s'échelonnent de 28,86% pour le plus grand chargement à 37,96% pour le plus petit chargement (Figure IV. 145).

Cela peut s'expliquer par le fait qu'à faible chargement, les enzymes sont plus disponibles et dégradent donc plus facilement les polysaccharides contenus dans la paille (la diffusion se fait plus facilement).

Néanmoins, comme les enzymes coûtent cher à produire par rapport au coût du substrat, l'optimisation des enzymes est préconisée. Autrement dit, un maximum de rendement avec un minimum d'enzymes pourrait être favorisé.

IV.1.2.3 Relation entre la chaleur dégagée en fonction des sucres réducteurs produits

Afin de clarifier la relation entre la chaleur et le taux d'hydrolyse, le tracé de la chaleur dégagée en fonction de la quantité de sucres réducteurs produite pour toutes les températures et les masses sont repris dans la Figure IV. 155.

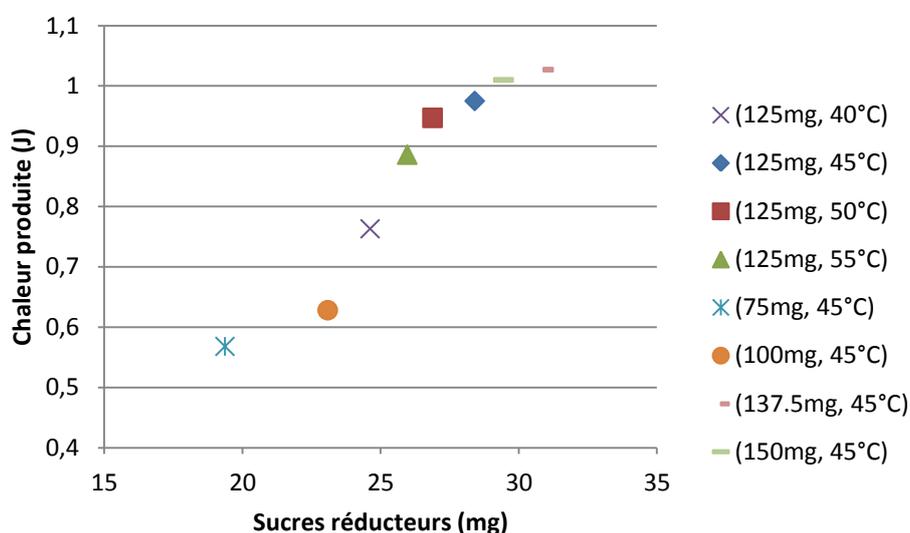


Figure IV. 15. Chaleur dégagée en fonction de la quantité de sucres réducteurs produite

On remarque que la chaleur dégagée est fortement liée à la quantité de sucres réducteurs produite et donc au taux d'hydrolyse.

Cette proportionnalité entre les chaleurs engendrées et les quantités de sucre soluble obtenues pour différents essais confirme que le signal de chaleur fournit une mesure valide de l'activité hydrolytique.

L'enthalpie massique moyenne d'hydrolyse par gramme de sucre produit pour les différents essais (essais pour l'impact de la température et impact de la masse du substrat) obtenue est de $32,18 \pm 3,18$ J/g ; ce qui fait 5,78 kJ/mol, en assimilant tout les monosaccharides au glucose.

Dans le but de comparer cette chaleur d'hydrolyse de la paille de blé à celle obtenue précédemment pour l'hydrolyse du cellobiose, celle-ci est rapportée à la mole de cellobiose. La valeur obtenue est alors de 11.56 kJ/mol, en assimilant les polysaccharides contenus dans la paille de blé à du cellobiose.

On remarque que cette valeur est quasiment 5 fois plus grande que celle obtenue pour l'hydrolyse du cellobiose. Cela signifie que l'hydrolyse des liaisons glycosidiques dans la paille de blé est accompagnée d'autres phénomènes exothermiques et donc des chaleurs dues à d'autres réactions sont mesurées en parallèles

Par ailleurs, une étude menée par Murphy et *al*, 2010 [147] sur la cellulose commercial (Avicel) et la canne de maïs prétraitée, montre des chaleurs d'hydrolyse des liaisons glycosidiques respectivement de $4,32 \pm 0,13$ kJ / mol et $6,7 \pm 0,2$ kJ / mol. Cela confirme que plus le substrat est complexe plus la chaleur d'hydrolyse est importante. Ces auteurs émettent deux hypothèses; un changement structural dans le matrice des polymères ou l'hydratation de polymères nouvellement exposés comme des cellodextrines dissouts. Par ailleurs ces mêmes auteurs n'excluent pas la présence de phénomène endothermique tel que la solubilisation des sels contenus dans la biomasse, relargués pendant la délignification.

Cependant, la chaleur obtenue lors des essais sur la paille de blé est presque 2 fois plus grande (1.72 fois exactement) que celle mesurée par Murphy et *al*, 2010 pour la canne de maïs. Cela peut être expliqué par le fait que le premier substrat garde un degré de cristallinité plus important car celui-ci à été juste micronisé alors que le deuxième a été broyé et traité à l'acide chaud. Une autre hypothèse est que l'utilisation de la CDH lors des essais sur la paille peut expliquer cette différence car en effet, en plus des cellulases utiliser lors de ces deux études, lors des essais présentés précédemment l'enzyme de la CDH est ajoutée.

IV.1.2.4 Effet de la CDH

Afin d'identifier l'impact de la CDH sur la paille, un cocktail enzymatique constitué de cellulases seules a été réalisé et comparé aux essais précédents réalisés avec CDH.

Les résultats des suivis des réactions obtenues pour les essais avec et sans CDH et les chaleurs engendrées sont présentés respectivement dans le graphique de la Figure IV. 167 et Figure IV. 178. Ces essais sont réalisés avec 125 mg de paille à 45°C sous agitation constante de 60 rpm)

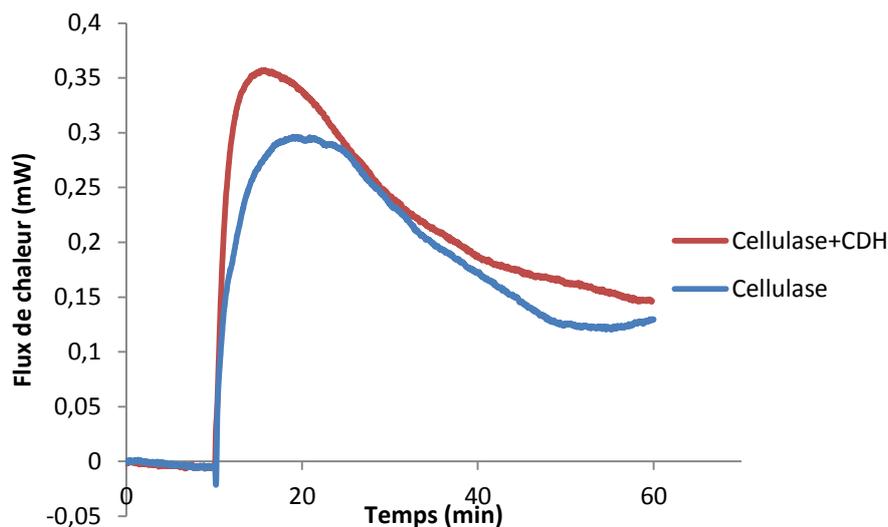


Figure IV. 16. Flux de chaleurs engendré pour deux différents cocktails enzymatiques à 45°C avec 125 mg de paille

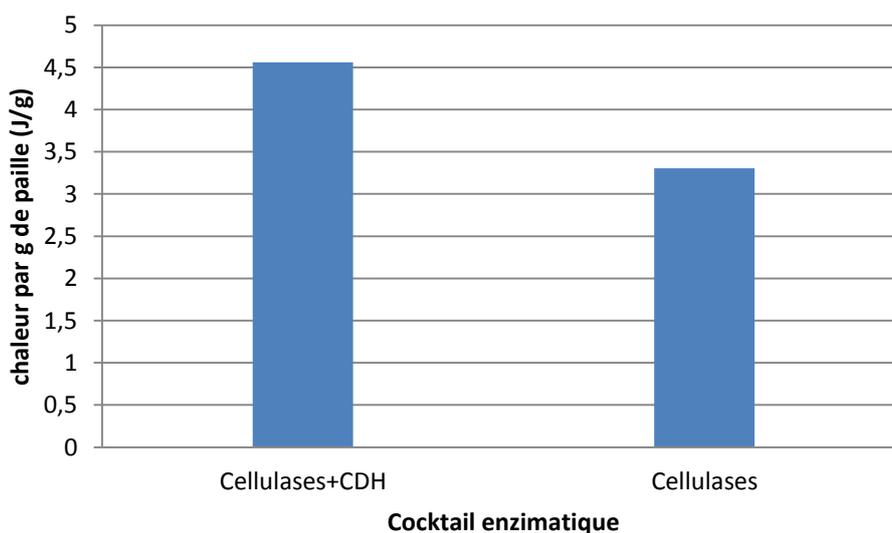


Figure IV. 17. Chaleur d'hydrolyse rapportée au gramme de paille obtenue pour deux différents cocktails enzymatique à 45°C pour une masse de paille de 125 mg

A partir des Figure IV. 167, et Figure IV. 178, on remarque que le cocktail enzymatique constitué de cellulases + CDH produit plus de chaleur que lorsque les cellulases sont utilisées seules. Ceci indique que la CDH ajoute un effet exothermique sur la paille de blé.

La Figure IV. 189 montre les résultats de dosage des sucres réducteurs pour les deux cocktails enzymatiques.

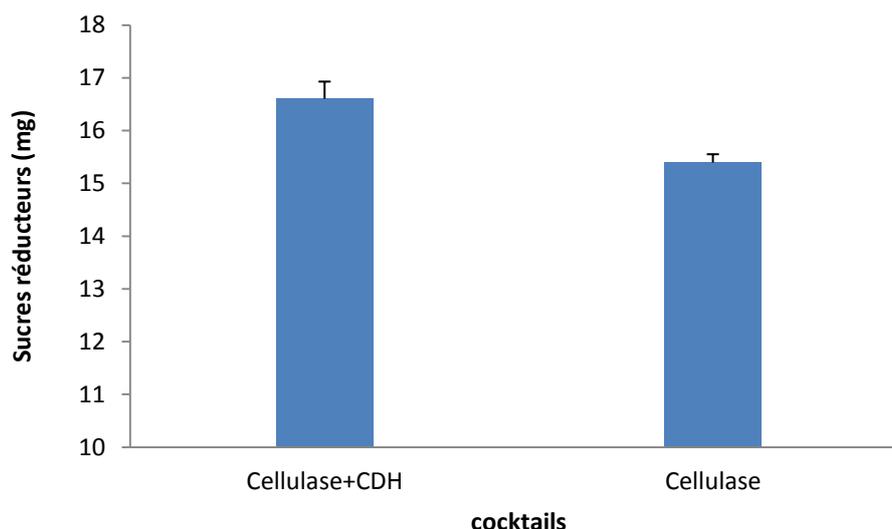


Figure IV. 18. Quantité de sucres réducteurs produite pour différents cocktails enzymatiques

Selon la Figure IV. 189, on remarque que la quantité de sucres réducteurs produite lors de l'utilisation du cocktail enzymatique constitué de cellulase + CDH est quasiment égale à la quantité de sucres produite lors de l'utilisation du cocktail enzymatique constitué uniquement de cellulases. En effet la différence en production de sucres réducteurs est inférieure à 1,21 mg soit 7.28 %.

Ce surplus de sucre devrait être accompagné par une production de chaleur d'environ 0.039 J (d'après le paragraphe IV.1.2.3) soit (32.23 J/g); or, la différence de chaleur produite lors des deux tests est de 0.157 J soit plus de 129 J/g. Ceci indique qu'en plus des sucres réducteurs, la CDH dégrade la paille en produits autres que des sucres réducteurs et que la production de ces derniers est accompagné de chaleur. Cela renforce l'hypothèse de l'augmentation de la chaleur globale de l'hydrolyse lors de l'utilisation de l'enzyme de la CDH émise dans le paragraphe IV.1.2.3 .

Afin d'estimer l'impact de la CDH sur la chaleur produite la Figure IV. 1920 représente la chaleur produite rapportée au gramme de sucres produit est réalisée.

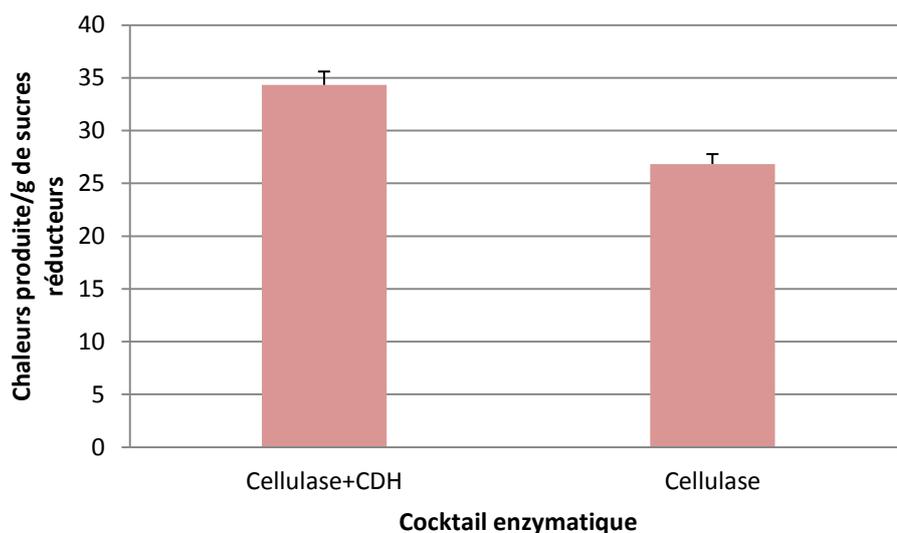


Figure IV. 19. Chaleur d'hydrolyse rapportée à la quantité de sucre pour deux différents cocktails enzymatique à 45°C pour une masse de paille de 125 mg

La Figure IV. 20 montre que la chaleur d'hydrolyse rapportée au gramme de sucres réducteurs lors de l'utilisation des cellulases est bien plus faible que lors de l'utilisation du cocktail enzymatique constitué de cellulases+CDH. En effet, celle-ci est de 34.33 ± 1.26 J/g de glucose lors de l'utilisation du cocktail enzymatique contre $26,86 \pm 0,94$ J/g de glucose lors de l'utilisation des cellulases uniquement ce qui fait respectivement $12,37$ J/mol de cellobiose et $9,67$ J/mol de cellobiose (en assimilant les sucres réducteurs au glucose et les polysaccharides transformé en monosaccharides au cellobiose). Cette valeur est plus proche de celle mesurée par Murphy *et al* (2010), et représente 1,44 fois la valeur de celle-ci contre 1,84 fois lors de l'ajout de la CDH.

Cela indique que la CDH a un effet exothermique lors de l'hydrolyse de la paille de blé et confirme l'inconvénient majeur de la méthode calorimétrique à savoir la mesure d'une chaleur globale et non spécifique.

Analyse des différents carbohydrates produits

Les résultats de l'analyse par DIONEX pour le glucose, le xylose et l'acide gluconique sont regroupés dans la Figure IV. 20.

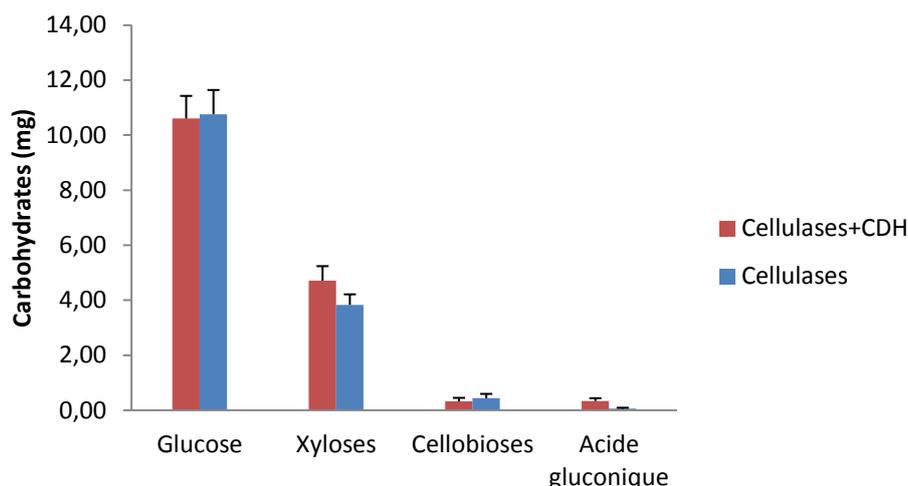


Figure IV. 20. Masse des différents carbohydrates formés

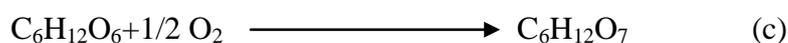
La Figure IV. 20 montre que l'ajout de la CDH aux cellulases fait diminuer très peu la production du glucose mais fait augmenter sensiblement celle du xylose. En effet, l'utilisation de 15 μ l de CDH a fait chuter la production du glucose de près de 0,16 mg soit 1,48 % et produit un surplus de plus 0,88 mg de xylose soit 18,68%.

Les résultats des différents carbohydrates par DIONEX de l'hydrolyse de la paille montrent que les tests effectués avec 15 μ l de CDH produisent en moyenne plus de 0,33 mg d'acide gluconique par rapport aux essais effectués avec la cellulase seule soit 81,81% de production en plus.

Ces tendances (diminution de la quantité de glucose, augmentation de la quantité de xylose et apparition de l'acide gluconique) lors de l'utilisation de la CDH en plus des cellulase ont déjà été observées [143].

Par ailleurs, même si la CDH fait diminuer la quantité de glucose, cette diminution reste modérée comparé au surplus de xylose produit lors de l'utilisation de cette enzyme. De plus cette enzyme permet la production d'une quantité non négligeable d'acide gluconique qui pourrait amener une valeur ajoutée au processus.

La formation de l'acide gluconique par oxydation de la fonction aldéhyde du glucose selon la réaction (c) peut expliquer le surplus de chaleur observé lors des essais cellulases + CDH lors des suivis des réactions d'hydrolyses enzymatiques par calorimétrie.



En effet, cette réaction est fortement exothermique et les valeurs de la littérature de la variation d'enthalpie se situent entre 80 à 125 kJ/mol.

Le calcul de la chaleur de l'oxydation du glucose en acide gluconique à partir des résultats calorimétrique est de 69.14 kJ/mol cela fait donc un écart de 10.86 kJ/mol par rapport à la borne inférieure trouvée dans la littérature soit une erreur de 13,57 %.

Cette différence peut être expliquée par la présence de phénomène endothermique telle que la solubilisation des sels contenus dans la paille comme déjà mentionné et suggéré par Murphy et al [147].

IV.1.3 Observation par microscopie électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage est utilisé pour observer l'effet de l'hydrolyse enzymatique sur les changements morphologiques de la paille de blé. Les clichés A et B de la Figure IV. 21 montrent la structure de la paille micronisée avant hydrolyse à différents grossissements (2000 et 4000 respectivement). Les C et D montre la paille de blé après hydrolyse enzymatique respectivement aux grossissements 2000 et 4000.

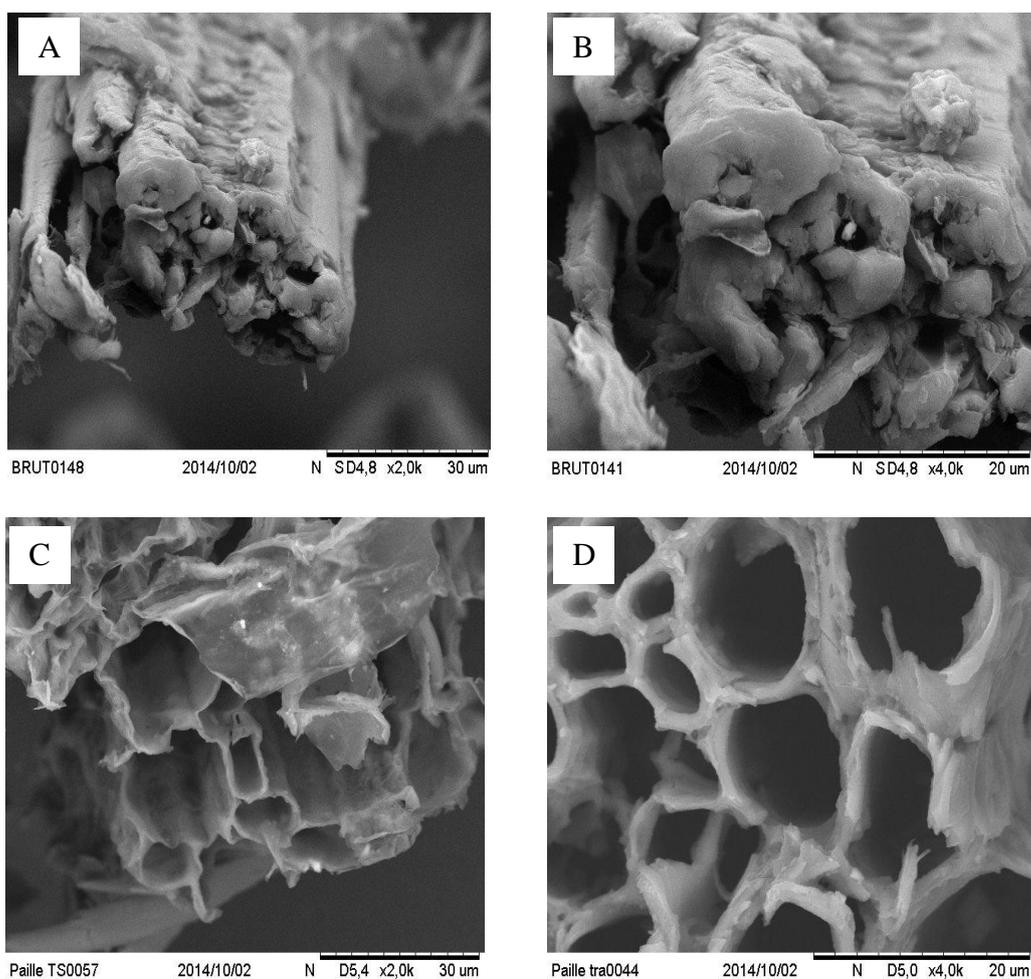


Figure IV. 21. Observation au microscope électronique à balayage de la paille de blé avant (A et B) et après (C et D) l'hydrolyse enzymatique

Les clichés C et D de la même figure montrent la structure de la paille de blé après hydrolyse. (Le cliché C est au même grossissement que le cliché A et le cliché D et au même grossissement que le B).

Les clichés montrent que pour les échantillons avant hydrolyse, la structure de la paille est compacte (A et B), tandis que pour ceux soumis à l'hydrolyse, il y a apparition d'une structure poreuse.

L'hydrolyse a donc modifié la morphologie des fibres lignocellulosique en créant des cavités. Ces modifications sont attribuées notamment à la cellulose cristalline transformée pendant l'hydrolyse laissant les squelettes formés par la lignine vides.

Si on compare ces clichés avec la Figure I. 1 représentant la structure de la biomasse lignocellulosique, on constate bien que ce sont les polysaccharides qui manquent dans les clichés C et D comparé au cliché A et B.

On peut donc dire que pendant l'hydrolyse de la paille, les polysaccharides insolubles (cellulose et hémicelluloses) se sont transformés en sucres simples et dissouts formant ainsi des cavités.

IV.1.4 Cinétique enzymatique

Dans cette partie, le calcul des constantes cinétiques des réactions enzymatiques à partir des essais calorimétriques est abordé.

Dans un premier temps, l'étude cinétique de la β -glucosidase de *A. niger* sur le cellobiose est réalisée afin de valider le calcul des constantes cinétiques enzymatiques par calorimétrie en les comparants avec des méthodes conventionnelles.

La réaction d'hydrolyse du cellobiose en glucose par la β -glucosidase à été choisie car c'est une réaction enzymatique classique qui contrairement aux autres enzymes (endoglucanases et cellobiohydrolase) s'effectue en milieu homogène et qui est décrite par le modèle Michaelis-Menten [140].

Dans un second temps, l'étude cinétique du cocktail enzymatique sur la paille de blé sera traitée.

IV.1.4.1 Constantes cinétiques pour le cellobiose

Dans cette partie, les constantes cinétiques d'hydrolyse enzymatique du cellobiose sont calculées à partir de données obtenues par calorimétrie isotherme. Ces constantes sont

aussi déterminées pour ce substrat par la méthode des temps fixes. Les résultats ainsi obtenus par les deux méthodes sont comparés.

IV.1.4.1.1 Constantes cinétiques pour le cellobiose par calorimétrie

La Figure IV. 22 représentent les vitesses de réactions v en fonction de la concentration en substrat $[S]$ (représentation de l'équation de Michaelis-Menten) obtenues à partir des mesures calorimétriques pour deux concentrations en enzyme différentes, à savoir, 40 mg/L et 80 mg/L, pour une concentration de cellobiose de 100 mM à 45°C.

Ces courbes ($v=f(S)$) sont obtenues en utilisant les deux équations suivantes :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dQ}{dt} \quad (17)$$

$$[S] = S_0 - \frac{\int_0^t \Omega dt}{V_0 \cdot \Delta H_{app}} \quad (18)$$

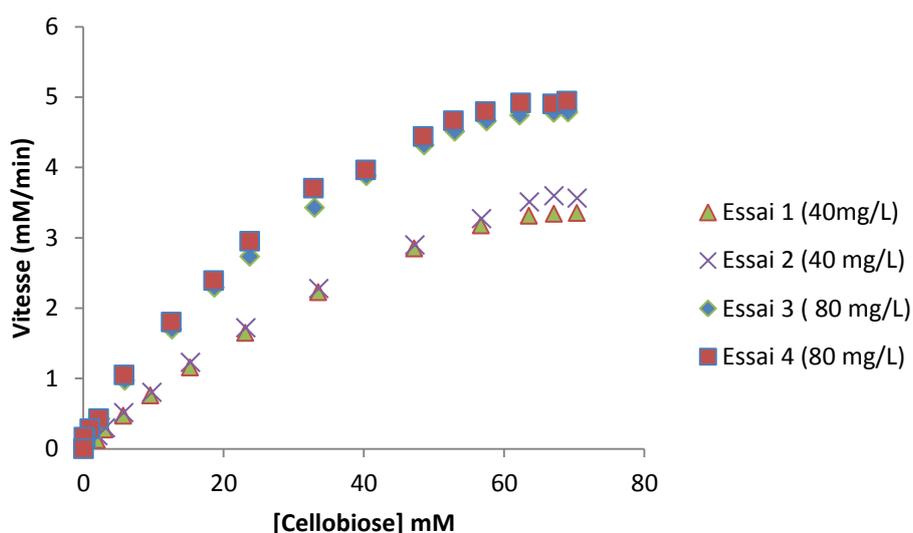


Figure IV. 22. Représentation de la courbe de Michaelis-Menten montrant la vitesse de réaction V en fonction de la concentration en substrat $[S]$ obtenue à partir des mesures calorimétriques pour deux concentrations en enzyme

Les résultats illustrés en Figure IV. 22 montrent que la vitesse d'hydrolyse du cellobiose en glucose est proportionnelle à la concentration en enzyme dans la gamme testée.

Les constantes cinétiques, K_m et V_{max} sont déterminées selon la méthode de linéarisation de Lineweaver et Burk.

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \quad (20)$$

La Figure IV. 234 montre la linéarisation de Lineweaver et Burk obtenue lors des essais avec 80 mg/L de cellulase

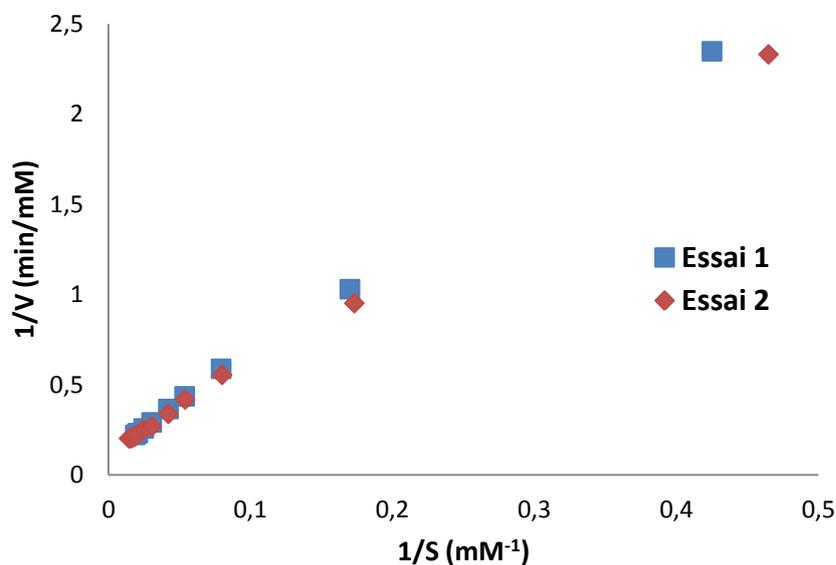


Figure IV. 23. Linéarisations de Lineweaver et Burk de la courbe de Michaelis-Menten obtenue pour 80 mg/L de cellulase

La linéarisation de Lineweaver et Burk, utilisée pour le calcul des constantes cinétiques de l'enzyme, K_m et V_{max} , montre que la variation de concentrations en enzyme n'impacte pas la constante de Michaelis-Menten qui est égale à $35,15 \pm 0,95$ mM mais que celle-ci impacte directement la vitesse maximale atteinte avec respectivement $4,84 \pm 0,43$ mM/min lors de l'utilisation de 40 mg/L d'enzyme et $7,36 \pm 0,62$ mM/min lors de l'utilisation de 80 mg/L.

IV.1.4.1.2 Constantes cinétiques du cellobiose par dosage par point fixe

Ces essais sont réalisés dans le but de calculer les constantes cinétiques de la β -glucosidase afin de les comparer à celles obtenues par mesure calorimétrique.

Cette étude cinétique a été réalisée en duplicata pour une concentration en enzyme de 80 mg/L, une concentration en substrat de 0 à 100 mM à 45°C selon la méthode décrite en paragraphe III.1.2.1 .

Les vitesses étant mesurées par rapport au glucose (dosage RTU) sont divisées par 2 à cause de la stœchiométrie de la réaction d'hydrolyse du cellobiose en glucose et ainsi remonter aux vitesses de consommation du cellobiose.



Les résultats obtenus sont repris dans la Figure IV. 245.

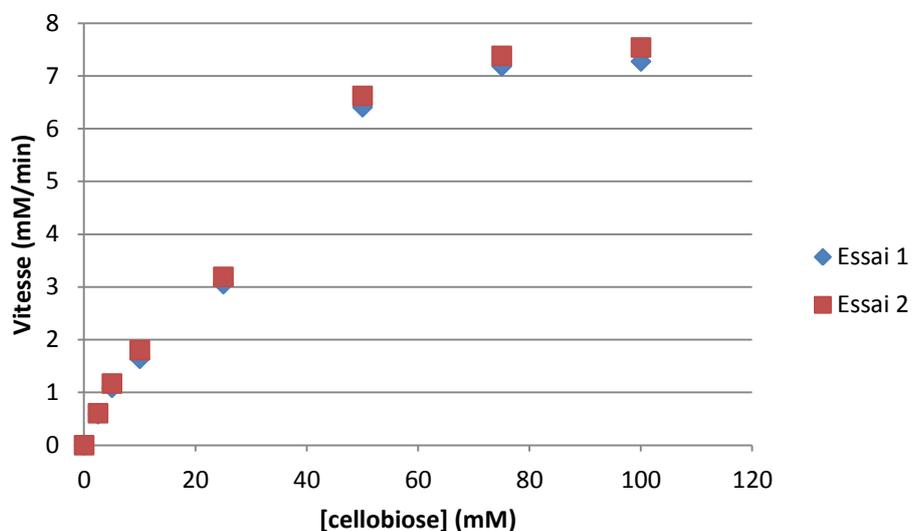


Figure IV. 24. Représentation de la courbe de Michaelis-Menten montrant la vitesse de réaction V en fonction de la concentration en substrat $[S]$ obtenue par spectrophotométrie

Les constantes cinétiques K_M et V_{\max} calculées après linéarisation de Lineweaver et Burk (Figure IV. 256) sont respectivement de $34,01 \pm 0,55 \text{ mM}$ et $8,42 \pm 0,38 \text{ mM/min}$.

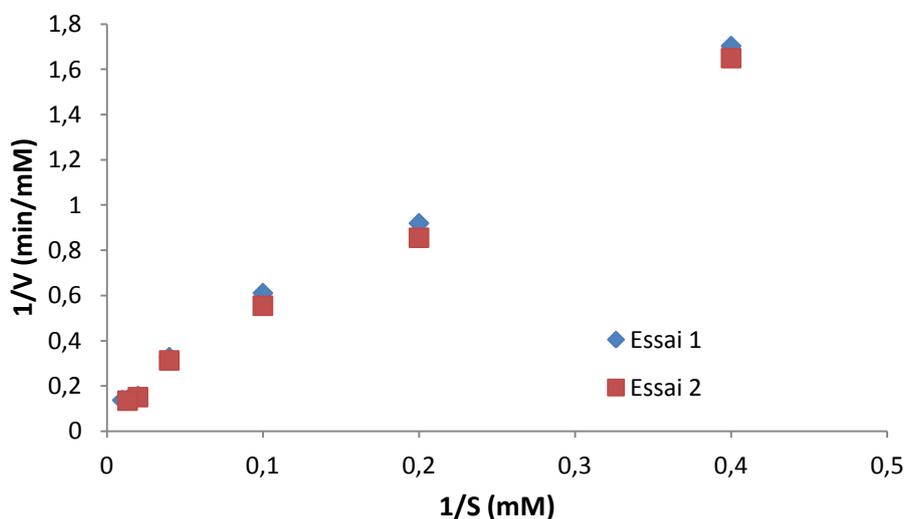


Figure IV. 25. Lineweaver et Burk de la courbe de Michaelis-Menten obtenue par spectrophotométrie

IV.1.4.1.3 Comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes

Les résultats des constantes cinétiques de l'enzyme β -glucosidase sur le cellobiose obtenus par calorimétrie et par la méthode du point fixe montrent une bonne concordance.

En effet, pour la même concentration en enzyme, les constantes de Michaelis-Menten K_m obtenus respectivement par calorimétrie et point fixe sont de $35,15 \pm 0,95$ et $34,01 \pm 0,38$ mM soit un écart de 3,24 %.

De même pour les résultats de V_{max} . En effet, les valeurs obtenues sont respectivement de $7,36 \pm 0,62$ et $8,42 \pm 0,38$ mM/min soit un écart de 12,59 %.

Par conséquent, le calorimètre isotherme C80 est un outil fiable pour déterminer les constantes cinétiques en milieu homogène.

En ce qui concerne la réalisation des essais, il apparaît que la mesure des constantes cinétiques par calorimétrie semble plus facile car celle-ci est réalisée en une seule étape (limite les erreurs de manipulation) et ne requiert aucun ajout de réactif contrairement à la méthode spectrophotométrique à laquelle une solution DNS est nécessaire.

Cependant, un effort sur la conception des cellules de mélange à membrane du calorimètre C80 est nécessaire pour pouvoir annuler les chaleurs dues à l'agitation dans les deux cellules, sinon il faut réaliser un blanc, ce qui double le temps de manipulation.

IV.1.4.2 Cinétique enzymatique pour la paille

Contrairement aux thermogrammes obtenus lors de l'hydrolyse du cellobiose, les thermogrammes d'hydrolyse de la paille ne retournent pas aux lignes de bases initiales (Figure IV. 4 et Figure IV. 8). Cela signifie que non seulement la réaction n'est pas achevée mais qu'en plus le calcul des constantes cinétiques n'est pas possible selon la méthode utilisée pour le cellobiose.

En effet, si on applique directement la même méthode calcul pour la paille que pour le cellobiose, on obtient les courbes de représentés en Figure IV. 26. La linéarisation Lineweaver et Burk correspondant à ces courbes quant à elles sont représentés en Figure IV. 27.

Ces courbes sont obtenues en assimilant tout les polysaccharides contenus dans la paille de blé au cellobiose.

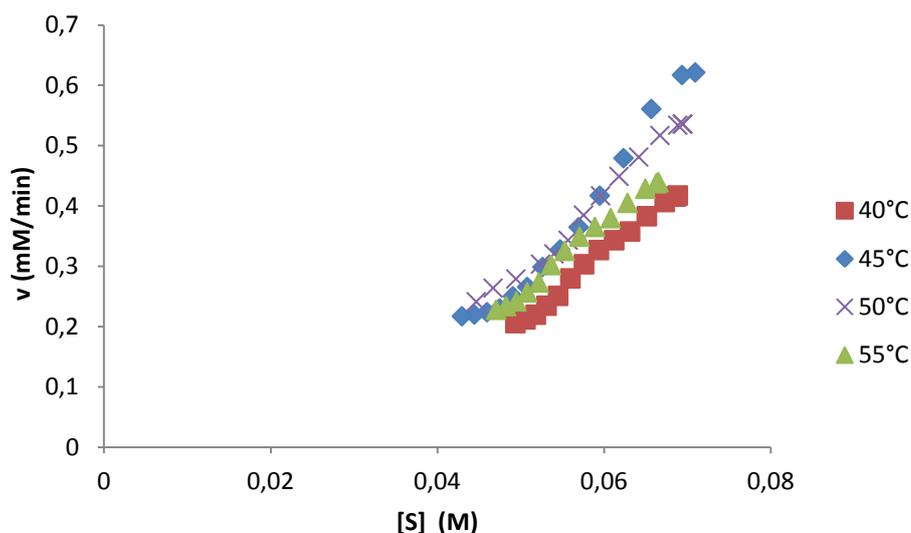


Figure IV. 26. Vitesse de réaction V en fonction de la concentration du substrat S pour la paille de blé à différentes température

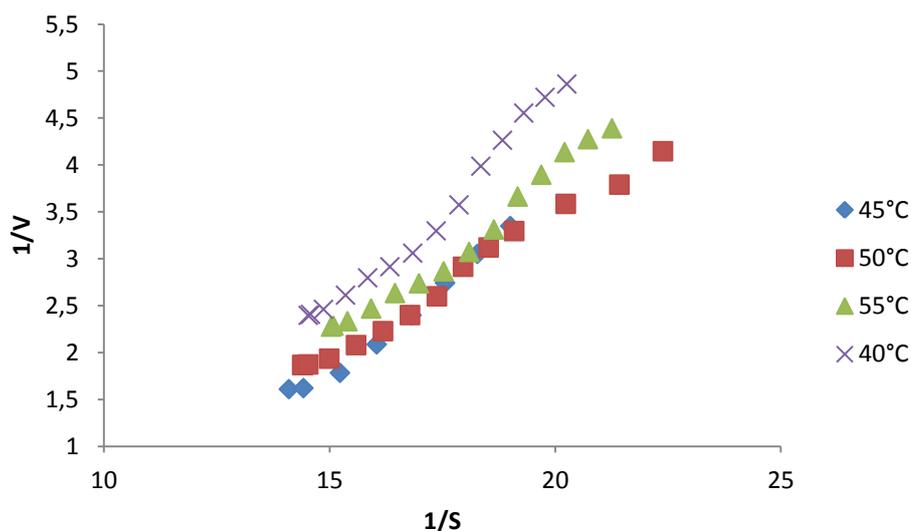


Figure IV. 27. Linéarisation de Lineweaver et Burk pour la paille de blé à différentes température

La Figure IV. 26 montre que les courbes de vitesses en fonction de la concentration sont différentes des courbes typiques des cinétiques Michaeliennes, de plus les linéarisations illustrées en Figure IV. 27 donne des constantes cinétiques négatives, ce qui est complètement aberrant.

C'est pourquoi on se propose de calculer ces constantes cinétiques en se basant sur les lignes de bases finales. En effet, après l'enregistrement de pics, les flux de chaleur se stabilisent et forment des plateaux comme représenté sur la Figure IV. 288.

Comme montré en paragraphe IV.1.2.3 la chaleur dégagée est proportionnelle à la quantité de sucre produite ; il est donc possible de quantifier les quantités de sucres produits en prenant en compte uniquement la ligne de base finale (au-dessus de la ligne de base).

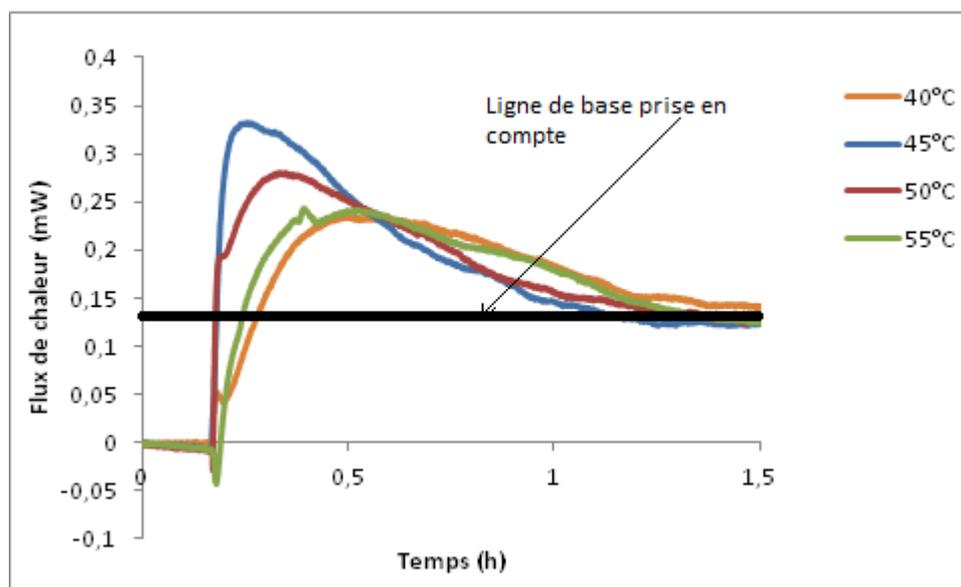


Figure IV. 28. Ligne de base prise en compte pour l calcul des constantes cinétiques

D'autre part, pour ces calculs, le substrat (paille) est assimilé au cellobiose car le sucre référent lors du dosage des sucres réducteurs était du glucose.

A partir de ces hypothèses les calculs des cinétiques sont réalisés de la même manière que pour le cellobiose.

Les représentations de Michaelis–Menten montrant les vitesses initiales de réaction v selon la concentration du substrat $[S]$ à différentes températures sont reprises dans la Figure IV. 299.

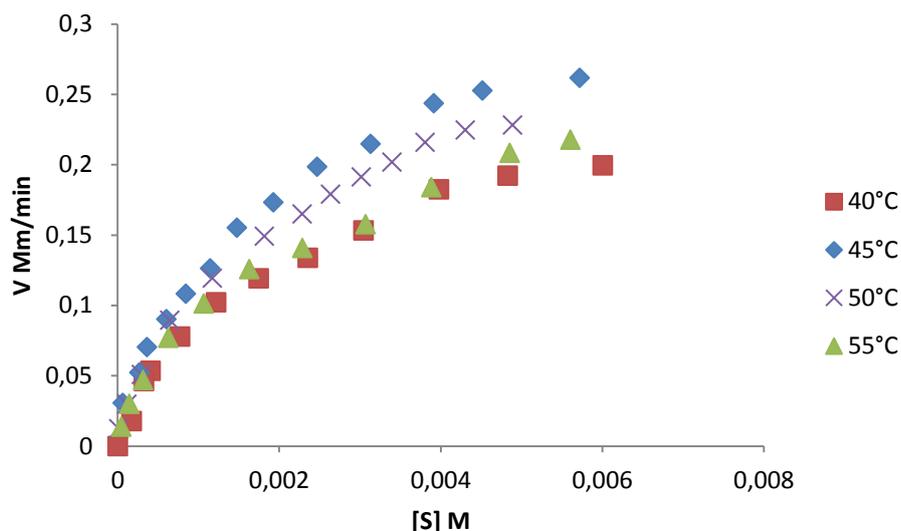


Figure IV. 29. Représentations des courbes de Michaelis-Menten montrant la vitesse de réaction V en fonction de la concentration en substrat [S] obtenues à partir des mesures calorimétriques pour différentes température pour 125 mg de paille

Les courbes à différentes températures obtenues à partir des mesures calorimétriques montrent des branches hyperboliques, caractéristiques de l'équation de Michaëlis-Menten.

La Figure IV. 30 montre la linéarisation Lineweaver et Burk de l'équation de Michaëlis-Menten obtenue par calorimétrie à différentes températures pour la paille de blé micronisée.

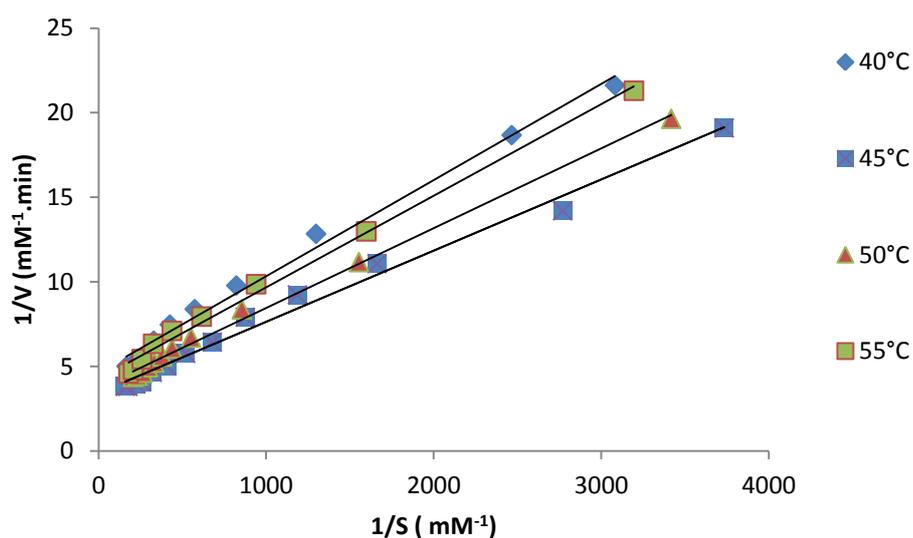


Figure IV. 30. Linéarisation de Lineweaver et Burk pour la paille de blé à différentes température

Les paramètres cinétiques apparents obtenus pour la paille pour différentes températures en utilisant la linéarisation de Lineweaver et Burk sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11. Constantes cinétiques Vmax et Km pour la paille obtenues par linéarisation Lineweaver et Burk

	Equations	V (mM/min)	K _m mM
40°C	$\frac{1}{V} = 0.0063 * S + 4.37$	0,216	1,231
45°C	$\frac{1}{V} = 0.0052 * S + 3.57$	0,291	1,22
50°C	$\frac{1}{V} = 0.0047 * S + 3.72$	0.268	1.26
55°C	$\frac{1}{V} = 0.0054 * S + 4.26$	0.23	1.26
Ecart type	/	±0.03	±0.02

Les résultats obtenus montrent que la température a un réel impact sur la vitesse de réaction. En effet, selon la température utilisée, la vitesse d'hydrolyse maximale atteinte est différente.

D'autre part, les résultats illustrés dans le Tableau 11 montrent que la vitesse est plus importante lorsque l'essai est réalisé à 45°C suivi dans l'ordre décroissant par les essais réalisés à 50°C, 55°C et enfin 40°C.

Cela confirme que le cocktail enzymatique est plus performant à 45°C comparé aux autres températures testées.

Pour les températures inférieures (à 45°C), cela s'explique par le fait qu'un apport de chaleur au milieu en augmentant la température facilite la réaction enzymatique (activation par la chaleur) [152].

En ce qui concerne la constante de Michaélis-Menten Km : l'impact de la température sur celle-ci est moins évident. Néanmoins la valeur de Km calculée pour l'essai à 45°C est plus faible que celle calculée lors des autres essais ce qui pourrait traduire une plus grande affinité du cocktail enzymatique pour la paille à cette température [149].

IV.1.5 Conclusion

Les expériences réalisées à l'aide de la calorimétrie isotherme ont produit un ensemble de données cohérent.

Hydrolyse enzymatique par le C80

En effet, cette méthode, a permis de mesurer non seulement l'enthalpie d'hydrolyse mais aussi les constantes cinétiques de l'enzyme β -Glucosidase sur le substrat du cellobiose et ce en une seule étape.

D'autre part, les mesures calorimétriques ont permis de déterminer l'enthalpie de production d'un gramme de sucres réducteurs à partir de la paille de blé. La valeur obtenue par le C80 est de $32,18 \pm 3,18$ J/g.

Par ailleurs, les essais à différentes températures et à différents chargement en substrat (paille) montrent une proportionnalité entre la chaleur dégagée et la quantité de sucres réducteurs produits.

De plus ces essais ont permis de déterminer un meilleur cocktail enzymatique constitué de Cellulases + CDH qui permet la production d'une quantité d'acide gluconique qui pourrait améliorer l'attractivité de ces biocarburants de 2ème génération.

Enfin, ces essais ont montré que le cocktail enzymatique utilisé est plus performant à 45°C par rapport aux autres températures testées et mis en évidence que le rapport quantité de substrat sur enzyme est un paramètre important du rendement d'hydrolyse.

Le calorimètre C80 a aussi permis de déterminer les constantes cinétiques enzymatiques calculées du cellobiose et celles-ci sont en adéquation avec celles obtenues par la méthode spectrophotométrique.

En ce qui concerne les cinétiques enzymatiques de l'hydrolyse de la paille, les résultats calorimétriques montrent que les vitesses maximales atteintes sont impactées par la température et que la cinétique la plus rapide est enregistrée pour la température de 45 °C avec une vitesse de 0.291 mM/min.

Les biotransformations de produits lignocellulosiques destinés à l'industrie du biocarburant doivent être réalisées à grande échelle. La conception et le contrôle des ces procédés industriels passent nécessairement par la conception et le contrôle du procédé à l'échelle laboratoire.

Le procédé à l'échelle laboratoire est étudié dans un réacteur de 1 litre et suivi par calorimétrie.

Les résultats précédemment obtenus pour l'hydrolyse enzymatique dans le microcalorimètre C80 sont exploités pour être utilisés dans ce bioréacteur de 1 litre. En effet

Hydrolyse enzymatique par le C80

les optimisations réalisées à faible échelle pour l'hydrolyse seront transposées dans le but d'avoir une production maximale.

D'autre part, cela permettra de tester la possibilité de suivre tout le procédé de production du bioéthanol par calorimétrie. En effet, en plus du suivi de l'étape d'hydrolyse enzymatique, la fermentation aussi sera suivie et ce par procédés SSF et SHF.

**V CALORIMETRE DE GRANDE CONTENANCE PAR
SONDE DE MESURE INTERNE**

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Préalablement au suivi du procédé de production du biocarburant lignocellulosique, le calorimètre OptiMax TM 1001 est utilisé pour mesurer la chaleur de dissolution de l'acide acétique et du bromure de sodium et ce dans le but de les comparer avec les valeurs de la littérature. Puis pour l'hydrolyse et fermentation du cellobiose et ce dans le but de comparer les résultats aux valeurs trouvées dans la littérature et vérifier ainsi la fiabilité de ce calorimètre dans cette gamme de chaleur.

L'acide acétique et le bromure de sodium ont été choisis car ce sont les composés qui génèrent le moins d'énergie lors de leur dissolution. De plus, c'est ce qui se rapproche le mieux des réactions biologiques étudiées en terme de chaleur produite.

V.1 Chaleur de dissolution de l'acide acétique et du bromure de sodium

La mesure de la chaleur de dissolution de l'acide acétique (d'une teneur de plus de 99,7%) dans l'eau distillée a été réalisée dans le calorimètre OptiMax TM 1001 en triplicata.

Après avoir réalisé le premier étalonnage et stabilisé la température de l'enveloppe à la température de consigne, des volumes précis d'acide acétique sont injectés dans le réacteur à l'aide d'une pipette.

La température du volume injecté est mesurée avec précision grâce à une sonde et ce dans le but de soustraire la chaleur sensible, liée à la différence de température entre le réacteur et le volume dosé juste avant l'ajout.

Environ 30 min après le retour à la ligne de base initiale, le deuxième étalonnage nécessaire aux calculs est effectué.

Une capture d'écran d'un des triplicatas réalisés pour la dissolution de l'acide acétique dans l'eau distillée est illustrée dans la Figure V. 1. Le calcul de la chaleur engendrée est réalisé uniquement sur le pic.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

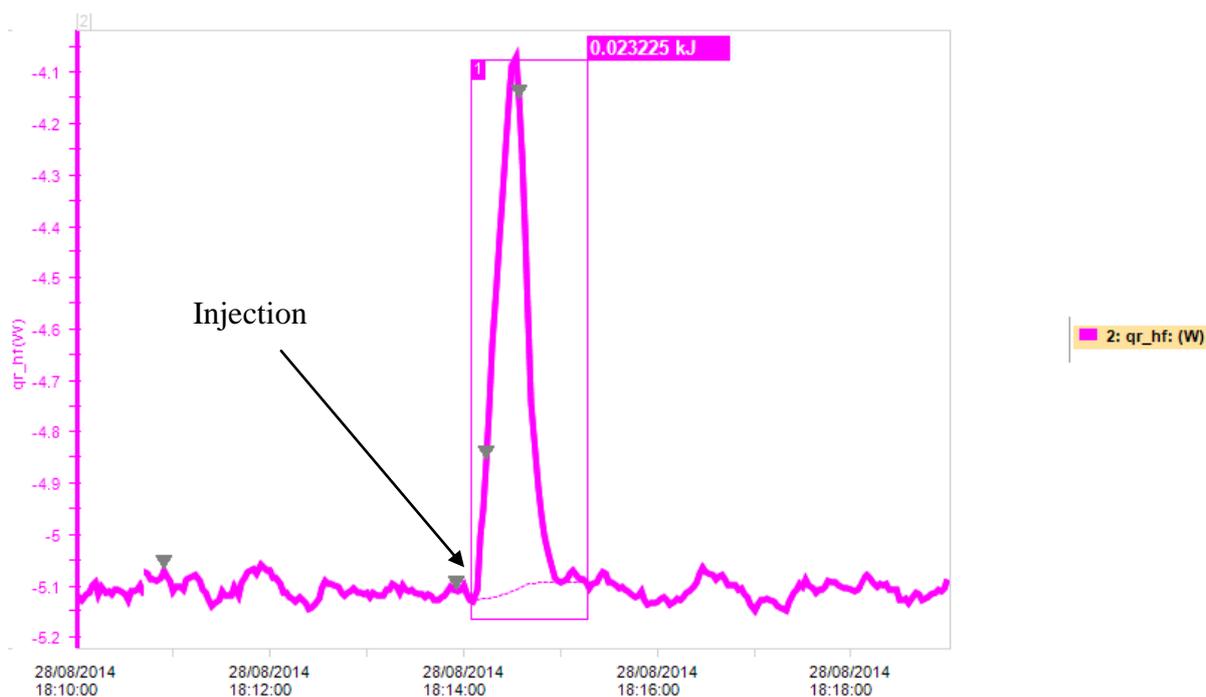


Figure V. 1. Thermogramme obtenu pour l'injection de 1 ml d'acide acétique dans 700 ml d'eau distillée à 25°C

Les thermogrammes obtenus montrent des pics exothermiques localisés aux temps d'injection. Le temps de réponse du calorimètre est donc très court

Les intégrales de ces pics qui représentent la chaleur de dissolution de l'acide acétique dans l'eau donnent une moyenne de 22,05 J/g d'acide (ce qui représente $1,32 \pm 0,14$ kJ/mol). Cette valeur est dans l'ordre de grandeur de la valeur trouvée dans la littérature de 1,51 kJ/mol [153] et représente une erreur de 12.58% .

Les essais réalisés avec le bromure de sodium ont été réalisés en ajoutant 10 g de celui-ci dans 700 ml d'eau et le résultat obtenu est de 0,51 kJ/mol (0.023 kJ). Cette valeur est proche de la valeur observée dans la littérature de 0,6 kJ/mol [153] et représente un écart d'une valeur de 15% .

Les résultats obtenus pour les chaleurs de dissolution de l'acide acétique et du bromure de sodium dans l'eau montrent des erreurs relatives respectivement de 12,58 et 15% par rapport à la littérature. Même si ces erreurs sont relativement importantes, les résultats sont tout de même acceptables vue la taille du calorimètre. Par conséquent le calorimètre OptiMax TM 1001 est considéré comme acceptable à 15% pour des valeurs de chaleur dégagée faibles. Il est donc envisagé d'utiliser ce calorimètre pour le suivi des procédés de production de biocarburant de 2^{ème} génération.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

V.2 Essais avec le cellobiose

Préalablement aux suivis des procédés de fabrication du bioéthanol à partir de la paille de blé, des essais d'hydrolyse et fermentation séparées et hydrolyse et fermentation simultanées en utilisant du cellobiose sont effectués.

V.2.1 Hydrolyse et fermentation séparées du cellobiose

V.2.1.1 Hydrolyse du cellobiose

L'hydrolyse de 12 g de cellobiose a été réalisée dans 700 ml d'eau distillée à 45°C sous agitation constante de 200 tr/min en utilisant 1g (750 U) de β -glucosidase lyophilisée diluée dans 5 ml d'eau.

Après avoir réalisé le premier étalonnage nécessaire aux calculs des différents paramètres (C_p et Cal) et que le système constitué de l'eau distillée, du cellobiose, du réacteur et des accessoires de mesure et d'agitation a atteint la stabilité thermique, 1g de β -glucosidase est ajouté au mélange réactionnel.

Des prélèvements réguliers de solution sont effectués à l'aide d'une pipette pour doser le sucre produit (dosage RTU).

Après 1h de réaction et s'être assuré du retour à la ligne de base, le deuxième étalonnage est effectué.

La Figure V. 2 montre une partie du signal thermique obtenu pour cet essai

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

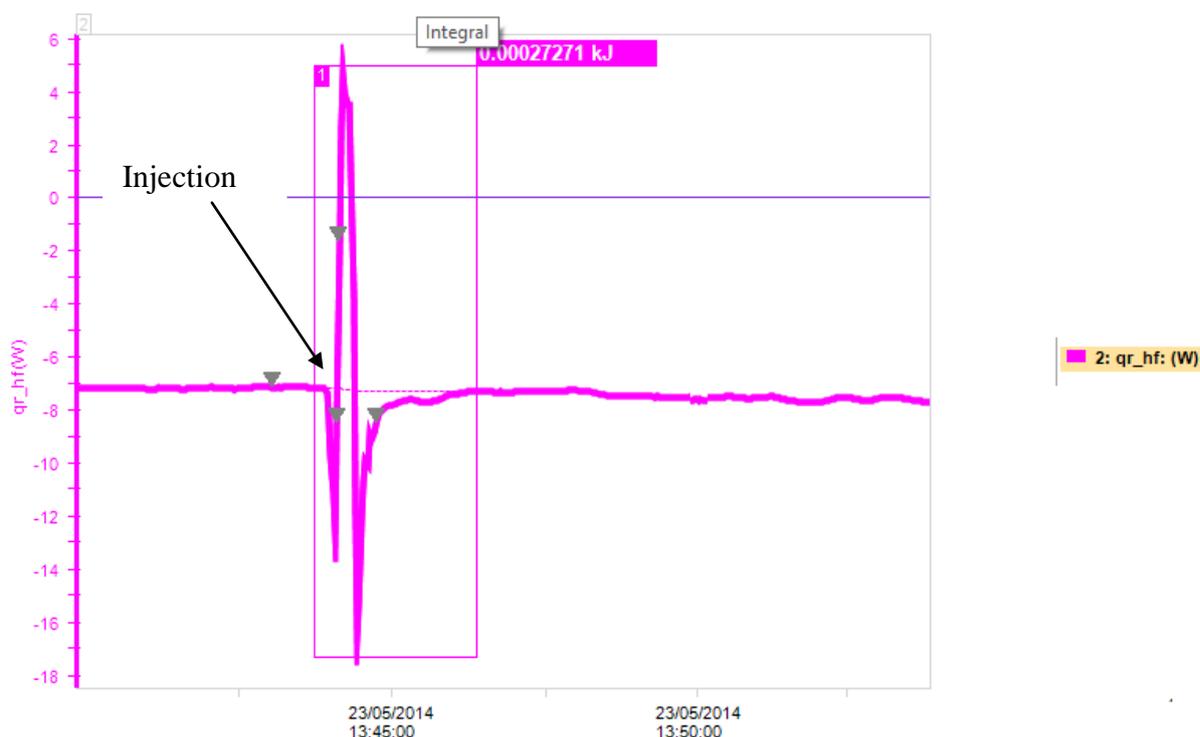


Figure V. 2. Thermogramme obtenu pour la saccharification de 12 g de cellobiose

Le thermogramme obtenu pour l'hydrolyse du cellobiose par la β -glucosidase montre qu'immédiatement après l'ajout de cette dernière une perturbation locale est enregistrée. Celle-ci est certainement due à la dilution de la β -glucosidase dans l'eau distillée et au mélange thermique.

Après cette perturbation un petit pic exothermique est enregistré, suivi par un 2^{ème} pic endothermique. Ce dernier est lui aussi attribué à la dilution de l'enzyme. En effet, lors de la dilution de l'enzyme lyophilisé dans le tampon, des agrégats se sont formés et on suppose que ce sont ces derniers qui se sont dissociés d'où l'apparition du second pic endothermique.

D'autre part, même si ce pic exothermique ne peut être attribué qu'à la chaleur engendrée lors de l'hydrolyse du cellobiose, l'aire sous la courbe représentant la chaleur d'hydrolyse reste faible par rapport à celle attendue pour l'hydrolyse de 12 g de cellobiose.

Le dosage RTU donne une conversion du cellobiose en glucose de 60,56 % après 10 min de mise en réaction et 98,71 % après 30 min soit 12,46 g de glucose produit. Or on remarque que le signal calorimétrique lui ne dure qu'environ 4 min avant le retour à la ligne de base.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

En effet, la production de 12.46 g de glucose devrait être accompagnée par une production de chaleur de près de 81 J, or l'intégrale de l'aire du pic qui correspond à la chaleur enregistrée fait état de 0.2 J.

Le rapport de la chaleur qu'on devrait avoir (81J) sur le temps de réaction (30 min) donne un flux de chaleur moyen par rapport à la ligne de base initiale d'environ 0.045W. Cette valeur est très faible et est proche des limites de détection de l'appareil.

On peut donc dire que contrairement aux essais avec l'acide acétique qui ont donné de bons résultats, les essais sur l'hydrolyse enzymatique du cellobiose ne sont pas concluants. Cela s'explique par le fait que la dissolution de l'acide acétique est un phénomène physique rapide alors que l'hydrolyse du cellobiose est plus lente et génère donc un faible flux de chaleur pendant plus longtemps. D'autre part, la solubilisation de l'acide acétique est un phénomène unique, alors que lors de l'hydrolyse enzymatique, en plus de la chaleur engendrée par la réaction proprement dite, le calorimètre prend vraisemblablement aussi en compte la chaleur de dilution de l'enzyme.

V.2.1.2 Fermentation

Le suivi par calorimétrie de la fermentation du cellobiose est réalisé avec l'échantillon de cellobiose précédemment hydrolysé. En effet, la solution de glucose obtenue par hydrolyse de 12 g de cellobiose à été utilisée à cet effet. En raison des différents prélèvements, uniquement 690 ml de cette solution ont été introduits dans l'OptiMax, ce qui fait environ 12,45 g de glucose.

Après avoir chauffé cette dernière à 85°C pour éliminer un maximum de microorganismes, baisser et stabiliser la température à 34°C, le premier étalonnage est réalisé.

Vingt-deux grammes de levure lyophilisée sont alors ajoutés à cette solution de glucose. Quinze heures après la mise en réaction, le second étalonnage est réalisé. Des prélèvements ponctuels de 200 µl sont effectués au cours du temps dans le but de doser l'éthanol.

Une capture d'écran du résultat du suivi par calorimétrie est illustrée en Figure V. 3.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

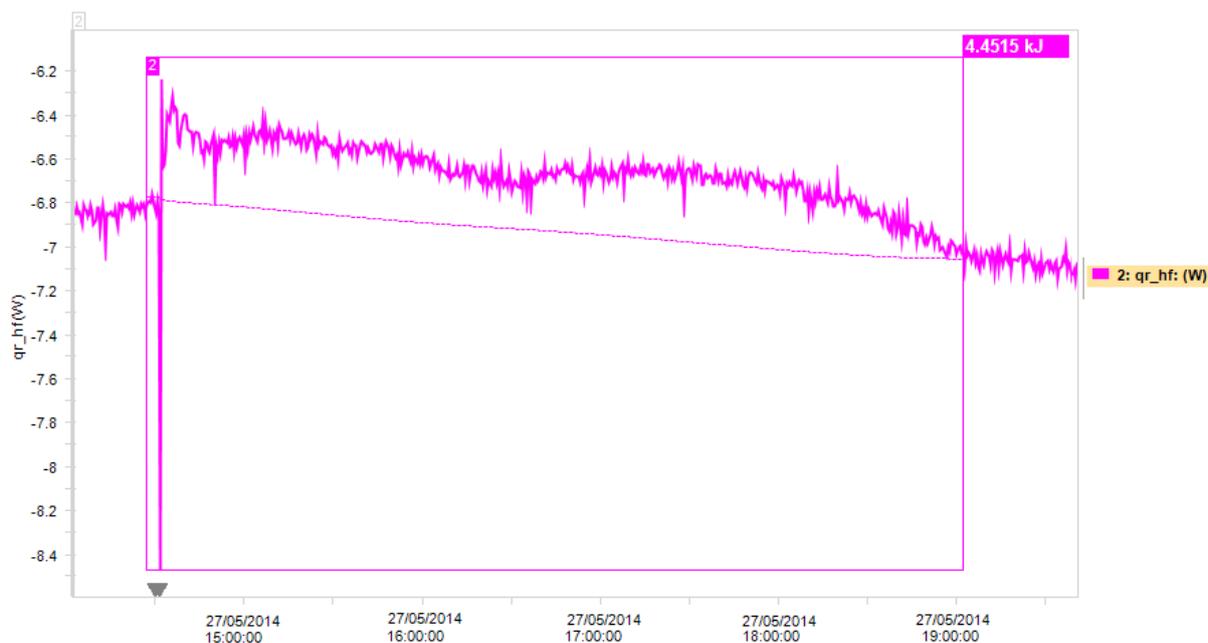


Figure V. 3. Thermogramme de la fermentation d'un échantillon de 690 ml de solution de glucose, vitesse d'agitation

La Figure V. 3 montre qu'immédiatement après l'ajout des levures, une diminution rapide du signal calorimétrique est enregistrée suivie par une période exothermique de 4h30.

Le premier pic est certainement dû à la dilution des levures dans le tampon. Le second pic quant à lui est attribué à la fermentation et montre que cette dernière est exothermique.

Par ailleurs, il est important de noter que la chaleur produite par la fermentation est bien plus grande que la chaleur due à l'hydrolyse enzymatique. En effet, la chaleur enregistrée lors de cette fermentation est de 4,45 kJ soit 357 kJ/kg de glucose.

La ligne de base prise en compte pour le calcul de cette chaleur est la moyenne entre la ligne de base avant ajout des levures et la ligne de base après re-stabilisation.

La production d'éthanol lors de la fermentation est vérifiée en analysant les différents prélèvements effectués durant le déroulement du procédé par CPG. La Figure V. 4 montre les résultats d'analyse obtenus.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

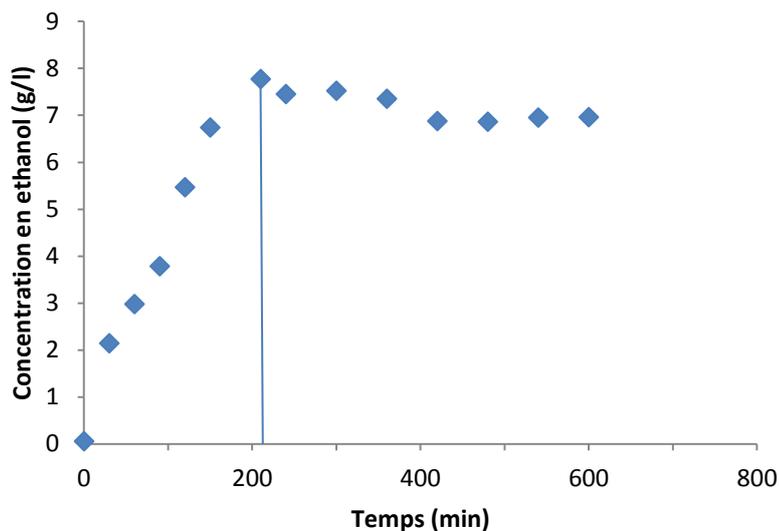


Figure V. 4. Evolution en fonction du temps de la concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors du procédé SHF pour le

Les résultats de l'analyse par CPG des différents prélèvements (Figure V. 4) montrent que la concentration en éthanol augmente rapidement dans un premier temps pour atteindre un maximum de 7,57 g/l (soit 5,22g dilué dans 690 ml) après 210 min de l'ajout des levures. Après cela, la concentration diminue légèrement à 7,52 g/l (5,18 g) après 270 min (temps nécessaire au retour à la ligne de base en (Figure V. 3) pour se stabiliser à 6,95 g/l soit (4,79 g) en fin de cet essai.

Le rendement maximal en éthanol atteint dans le réacteur d'après la réaction de fermentation du glucose s'élève à 82% (rendement de Gay Lussac).

La production de 2 moles d'éthanol par la fermentation du glucose s'accompagne d'un dégagement de chaleur d'environ 25,4 kcal (12,7 kcal/mol) [154],[155]. Ce qui fait une chaleur rapportée au gramme d'éthanol d'environ 0,276 kcal/g_{d'éthanol}.

Or la quantité de chaleur mesurée par le calorimètre lors de la production des 5,18 g (7,52 g/l) d'éthanol est de 4,45 kJ (1,06 kcal) soit une chaleur rapportée au gramme d'éthanol de 0,2 kcal/g_{d'éthanol}. Soit un écart de 26,08 % par rapport à la valeur théorique de la fermentation éthanolique.

V.2.2 Hydrolyse et fermentation simultanée du cellobiose

Lors de ces essais en plus d'une certaine quantité de cellobiose (12 ou 5 g) respectivement dans 700 ml et 500 ml de tampon, 22 g de levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été ajoutés au mélange.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Après avoir stabilisé le système à 37°C, un premier étalonnage est effectué. Puis lorsque la température du système atteint la température de consigne (37°C), 1g de β -glucosidase est ajouté.

Préalablement à l'ajout de la β -glucosidase, un premier prélèvement de la solution est effectué et ce dans le but de doser l'éthanol produit.

D'autres prélèvements sont effectués chaque 15 min jusqu'à ce que le signal thermique reprenne sa ligne de base et enfin le deuxième étalonnage est effectué.

Les flux thermiques engendrés par les réactions d'hydrolyse et de fermentation pour les masses de cellobiose de 12 g et 5 g sont repris respectivement dans la Figure V. 5 et la Figure V. 6 .

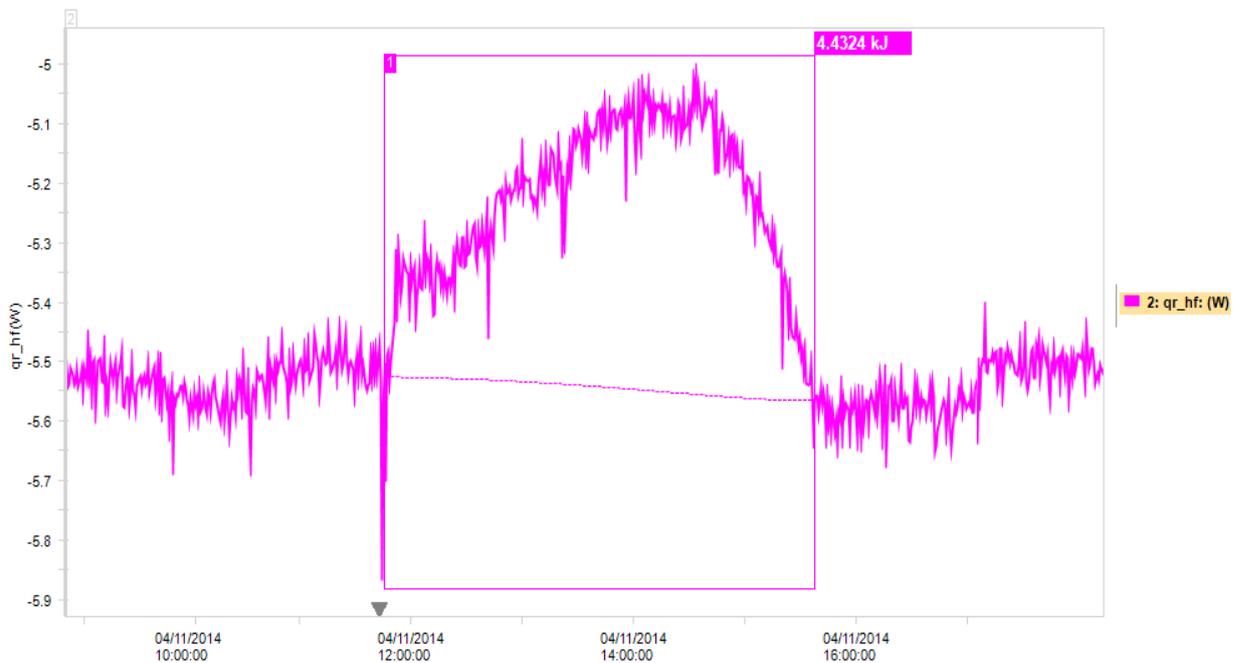


Figure V. 5. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 12g de cellobiose à 37°C

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

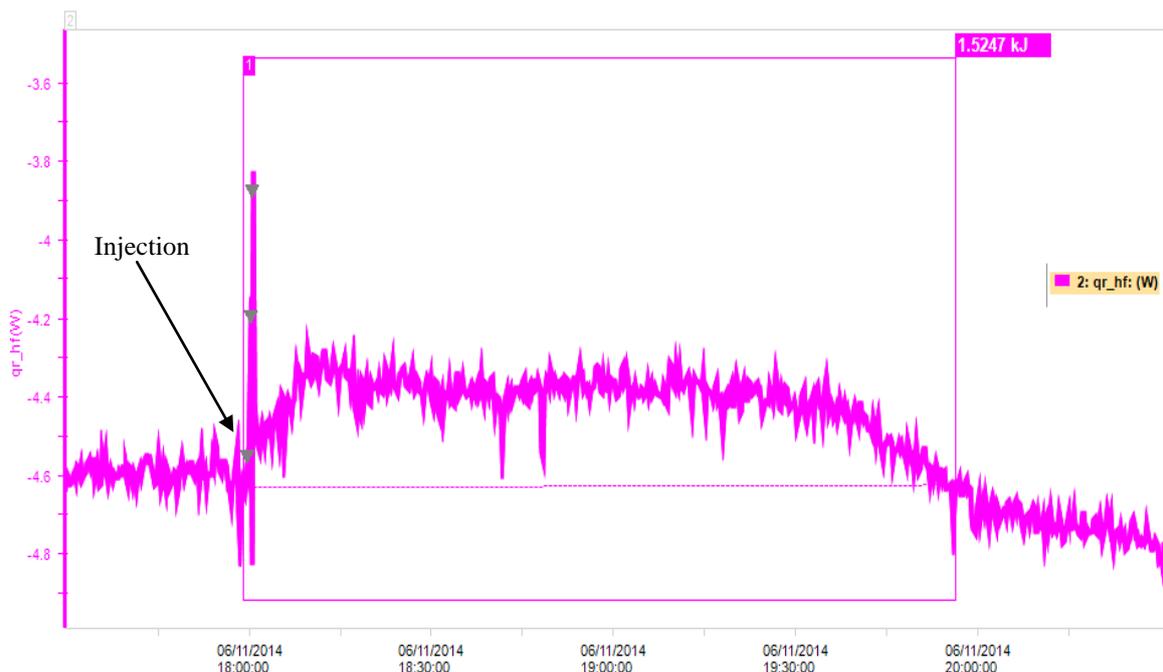


Figure V. 6. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 5 g de cellobiose à 34 °C

Les Figure V. 5 et Figure V. 6 montrent que les hydrolyses et les fermentations mises en réaction simultanément pour 12 g et 5 g de cellobiose produisent respectivement 4.43 kJ et 1.52 kJ. Ces chaleurs sont calculées en prenant en compte une ligne de base moyenne entre le moment de l'injection des enzymes et le retour à la stabilisation.

Sachant que les hydrolyses de 12g et 5g de cellobiose à 37°C produiraient respectivement environs 82 J et 34 J [146], le reste de chaleur enregistré par l'Optimax de 4,35 kJ et 1,48 kJ respectivement pour des masses en substrats de 12 g et 5 g, ne peut être attribué qu'à la fermentation du glucose produit par l'hydrolyse du cellobiose en éthanol grâce à la souche *Saccharomyces cerevisiae*.

Afin de vérifier la production d'éthanol lors de l'hydrolyse et fermentation simultanée des 12 g de cellobiose, les différents prélèvements effectués durant le déroulement du procédé ont été analysés par CPG.

La Figure V. 7 montre les résultats d'analyse obtenus.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

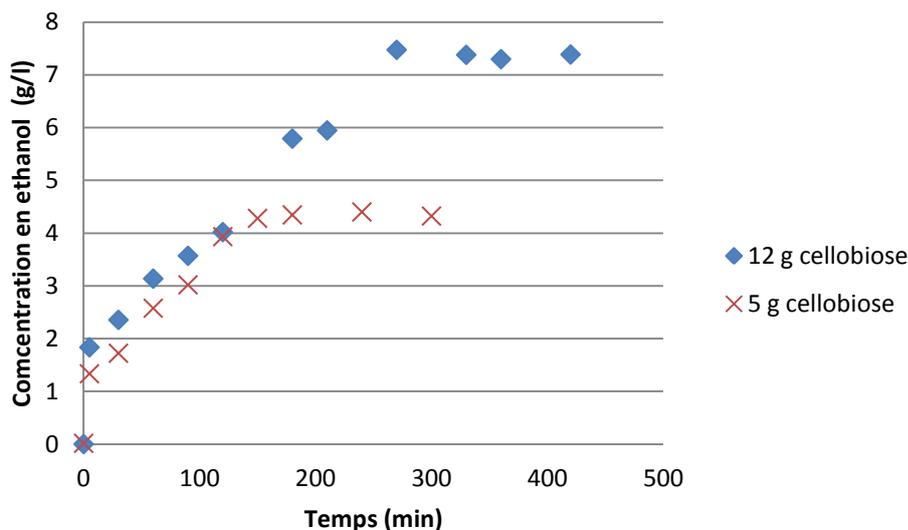


Figure V. 7. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors su procédé SSF pour 12 g et 5g de cellobiose

Le dosage de l'éthanol dans les échantillons prélevés à différents moments d'avancement de réaction montre qu'entre l'ajout de la β -glucosidase et les 5 min une augmentation rapide de la concentration en éthanol dans le milieu et ce pour les deux essais (5g et 12 g de cellobiose).

Entre 5 et 270 min, les résultats d'analyse de l'éthanol pour l'essai avec 12 g de cellobiose montre augmentation linéaire est observée et au-delà de 270 min, une concentration constante en éthanol est observée.

En ce qui concerne l'essai avec 5g de cellobiose, on remarque aussi que la concentration en éthanol augmente rapidement dans le milieu réactionnel pour atteindre un maximum à la 120^{ème} minute puis celle-ci se stabilise.

Par ailleurs, on remarque que les retours aux lignes de bases réactives (Figure V. 5, Figure V. 5) qui se font respectivement pour les essais avec 12 g et 5 g de cellobiose alentours de la 270^{ème} et la 120^{ème} minute sont concomitantes avec les débuts des paliers observés lors du dosage de l'éthanol (Figure V. 7). Cela prouve bien que ce sont bien les réactions d'hydrolyse et de fermentation qui sont suivies par calorimétrie.

Théoriquement, 12 g et 5 g de cellobiose initialement introduits dans le réacteur produiraient après hydrolyse 12,63 g et 5,26 g de glucose respectivement et la fermentation de ces quantités produiraient à leurs tours 6,45 g et 2.68 g d'éthanol. Or les concentrations

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

maximales en éthanol atteinte dans le réacteur sont respectivement de 7,47 g/l et 4.4 g/l ce qui représente des masses de 5,23 g et 2.2 g d'éthanol.

Les rendements de la fermentation éthanoïque pour les essais avec 12 g et 5 g de cellobiose sont donc respectivement de 81,08 % et 82.09 % par rapport au rendement de Gay-Lussac.

Ces différence qui représentent des écarts de 1,22 g et 0.48 g d'éthanol peuvent être expliquées par les erreurs expérimentales ou la non conversion complète du cellobiose, ou encore la catabolisation d'une partie d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae*.

En effet, d'après Pasteur, dans de bonnes conditions, un maximum de 95% de sucre sont convertis en éthanol [156]. Les 5% restant sont transformés en sous produits divers tels que le glycérol et l'acide acétique.

Par ailleurs, la production de 5,23 g d'éthanol (essai 12 g cellobiose) est accompagnée d'un dégagement de chaleur (calculé par intégration de l'aire sous la courbe et en supposant que toute la chaleur mesurée est due uniquement à la fermentation) d'une valeur de 1,06 kcal (4.43 kJ) soit une chaleur rapportée au gramme d'éthanol de 0.2 kcal/g. Cette valeur représente un écart de presque 24.94 % par rapport à la valeur théorique.

Si la chaleur d'hydrolyse est prise en compte, l'erreur s'élève à 25.78%. En effet, en plus des 1,41 kcal que devraient théoriquement être engendrés par la production de 5.23 g d'éthanol, 0,02 kcal sont théoriquement dégagés lors de l'hydrolyse des 12 g de cellobiose utilisés.

En ce qui concerne l'essai avec 5 g de cellobiose, la chaleur enregistrée rapporté au gramme d'éthanol produit est de 0.16 kcal/g. L'écart par rapport à la théorie s'élève donc à plus de

Même si l'erreur enregistrée est importante, le signal obtenu reste acceptable compte tenu de la lenteur des réactions d'hydrolyse et fermentation (plus de 3 heures), et des faibles puissances qui les accompagnent, la taille du réacteur, et enfin à la méthode de mesure.

V.3 Tests sur la paille

Préalablement à la réalisation de ces tests, les mélanges paille et tampon sont chauffés à 85°C pendant 10 min dans l'OptiMax dans le but d'éliminer les bactéries et levures

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

susceptibles de consommer le glucose produit lors de l'hydrolyse de la paille d'une part et de favoriser la fermentation du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* d'autre part.

V.3.1 Hydrolyse et fermentation simultanée de la paille broyée

V.3.1.1 Hydrolyse

Pour réaliser les essais d'hydrolyse et fermentation séparée, 8 puis 12 g de paille finement broyée ont été utilisés dans 700 ml de tampon.

Après avoir chauffé le mélange à 85°C, la température du mélange réactionnel est ramenée et stabilisée à 45°C (température optimale du cocktail enzymatique déterminée avec le C80) puis le premier étalonnage est réalisé.

Un cocktail enzymatique constitué de 1 g de β -glucosidase, 300 μ l de CDH et 3 ml de GC220 le tout dilué avec du tampon Phosphate citrate à pH 4,8 pour constituer un volume total de 10 ml est préparé. La température de ce cocktail est prise juste avant d'être ajouté au mélange de paille et de tampon et ce dans le but de soustraire la chaleur liée à l'ajout de ce cocktail.

Quinze heures après avoir ajouté le cocktail enzymatique, le deuxième étalonnage est effectué, puis la température du mélange est portée à 85°C afin d'une part de dénaturer les enzymes et arrêter ainsi l'hydrolyse, et d'autre part pour éliminer les bactéries et les levures qui auraient pu s'y développer.

La Figure V. 8 présente le thermogramme obtenu lors de l'ajout des enzymes.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

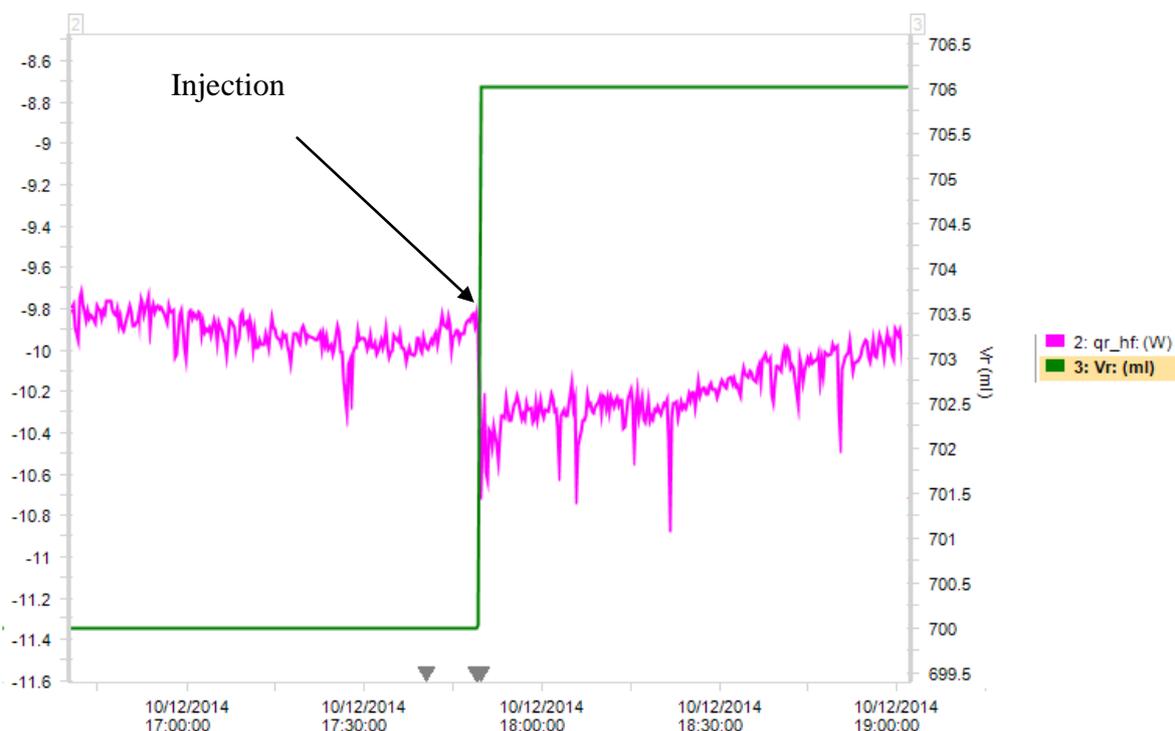


Figure V. 8. Thermogramme de l'hydrolyse de 12g de paille dans 700 ml de tampon

Le thermogramme présenté en Figure V. 8 ne montre aucun pic exothermique alors que le test DNS effectué sur les différents prélèvements effectués pendant la durée de l'essai met en évidence la production $4,55 \pm 0,08$ g de sucres réducteurs dont $2,38 \pm 0,03$ g durant la 1ère heure.

Le dosage RTU sur les mêmes échantillons révèle quant à lui la présence de 2,21 g de glucose pour le prélèvement après 15h de réaction et 1,19 g pour le prélèvement après 1 heure.

La production de 4,55 g de sucres réducteurs est normalement accompagnée par le dégagement d'environ 149 J (calculé à partir du résultat obtenu paragraphe IV.1.2.3), Les tests avec l'acide acétique ont montré que l'OptiMax est capable de détecter la chaleur de dissolution 1 ml de cet acide qui est bien moins importante que celle attendue pour la production de cette quantité de sucres et qui est de 25,1 J.

Cette absence de pic est certainement due au fait que contrairement à la dissolution de l'acide acétique qui est un phénomène très rapide, l'hydrolyse de la paille est un phénomène lent. Cela signifie que même si la réaction d'hydrolyse engendre un flux de chaleur, celui-ci est bien trop faible pour être détecté et se confond avec le bruit de fond engendré par la machine.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Aussi, aucun pic n'a été observé lors de l'essai avec 8 g de paille (Annexe 4) et c'est très probablement pour les mêmes raisons que citées précédemment.

Par ailleurs, des maximums de $2,71 \pm 0,06$ g de sucres réducteurs (dont 1,31 g de glucose) sont produits après 1 heure de réaction et $4,07 \pm 0,08$ g de sucres réducteurs (dont 2,01 g de glucose) ont été produits à la fin de l'essai avec les 8 g de paille.

La Figure V. 9 permet de visualiser le rendement par rapport à la quantité de substrat utilisée à 1 et 15 heures pour les deux masses testées. Pour cela les quantités de sucres réducteurs mesurées sont rapportées au gramme de paille utilisé.

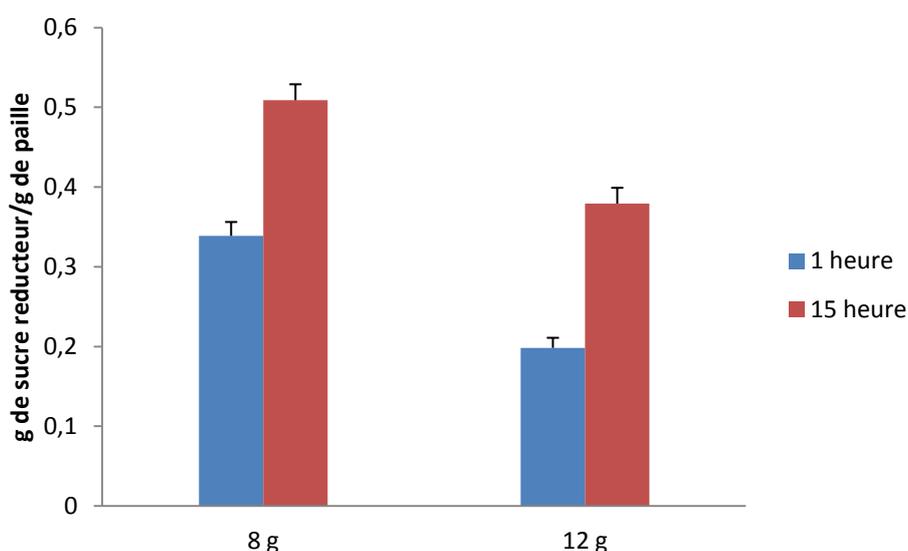


Figure V. 9. Sucres réducteurs produits rapportés au gramme de paille à différents intervalle de temps

Comme le montre la Figure V. 9, le rendement par rapport au gramme de paille est plus important lors de l'utilisation de la plus petite masse.

Cela confirme le résultat obtenu au paragraphe IV.1.2.2 , à savoir que pour la même quantité d'enzyme, moins le réacteur est chargé en substrat, meilleur est le rendement rapporté au gramme de paille.

V.3.1.2 Fermentation

Les essais de fermentation sont réalisés sur les hydrolysats de paille précédemment obtenus. Les levures étant moins tolérantes à la température, les essais de fermentation sont réalisés à la température optimale observée dans la littérature, à savoir 34°C. L'agitation quant à elle a été fixée à 400 tr/min et ce dans le but de solubiliser rapidement la levure qui sera introduite.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Après avoir stabilisé le mélange réactionnel à la température de consigne (34°C), le premier étalonnage est réalisé. Le premier étalonnage ainsi effectué et la stabilité thermique atteinte, 22 g de *Saccharomyces cerevisiae* lyophilisée sont ajoutés au mélange réactionnel.

Après 7 heures de réaction durant lesquelles des prélèvements ont été effectués, le deuxième étalonnage est réalisé.

La Figure V. 10 montre le flux de chaleur enregistré après l'ajout des 22 g de *Saccharomyces cerevisiae*. La Figure V. 11 présente l'évolution de la concentration de l'éthanol par CPG pour les différents prélèvements en fonction du temps.

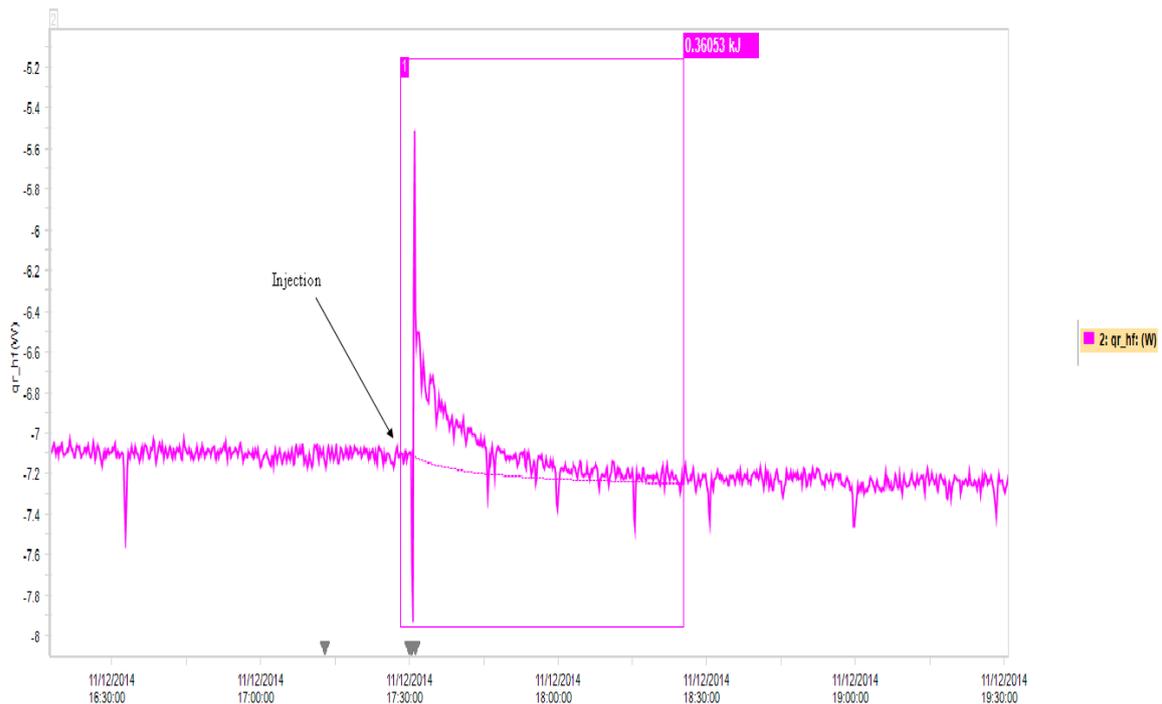


Figure V. 10. Thermogramme de la fermentation de 12 g de paille hydrolysée dans 690 ml de tampon

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

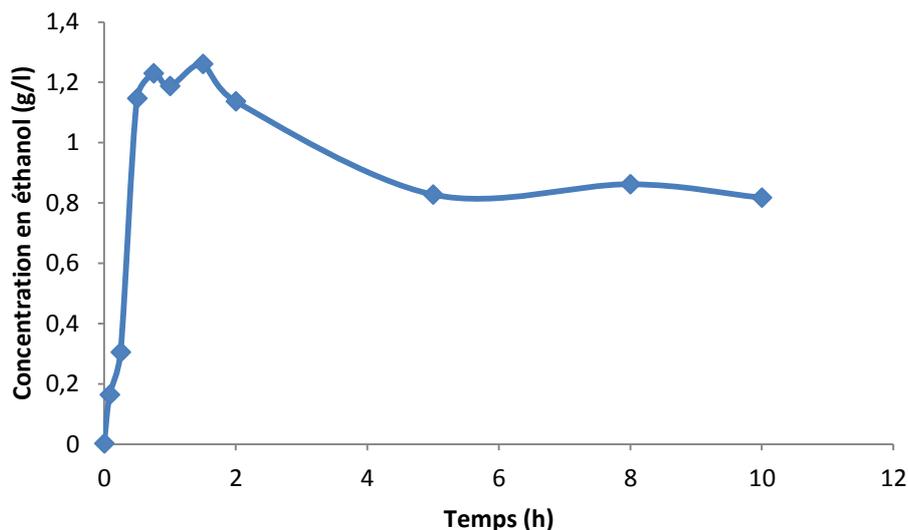


Figure V. 11. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors de l'utilisation de 12g de paille

Les résultats du dosage d'éthanol présentés en Figure V. 11 montrent que la production d'éthanol évolue rapidement dans un premier temps pour atteindre un maximum de 1,26 g/l après 90 min de l'ajout des levures au mélange réactionnel. Dans un deuxième temps, la concentration de l'éthanol dans le réacteur diminue progressivement pour atteindre un palier d'environ 0,81 g/l.

La diminution de l'éthanol dans le réacteur indique que celui-ci a été consommé à son tour par les levures. En effet, au fur et à mesure que la réaction de fermentation avance, le milieu réactionnel s'appauvrit en glucose. La *Saccharomyces cerevisiae* réoriente alors son métabolisme vers la consommation, en présence du dioxygène, en utilisant l'éthanol comme substrat [157]. Ce processus de respiration des produits de la fermentation est appelé 'diauxie'.

Le rendement maximal en éthanol atteint est de 75,38% (g de glucose transformé/g de glucose présent). Ce rendement est calculé par rapport à la conversion du glucose uniquement vu que la *Saccharomyces cerevisiae* est incapable de fermenter les pentoses [75].

Le thermogramme présenté en Figure V. 10 obtenu pour l'essai à 12 g montre un petit pic endothermique juste après l'ajout des levures suivi par un pic exothermique plus important.

Le premier pic du thermogramme représente certainement la chaleur de dilution des levures.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Le pic exothermique quant à lui, atteint son maximum d'environ 0,6 W rapidement (quelques minutes) et retournent à sa ligne de bases après moins d'une heure de l'ajout de la *Saccharomyces cerevisiae* au mélange réactionnel.

Le retour aux lignes de base pour la fermentation de 12 g de paille est concomitant avec la production maximale d'éthanol. En effet, la concentration maximale en éthanol est atteinte après environ 1 heure de l'ajout des levures, de même que le retour à ligne de base.

L'aire sous la courbe du flux de chaleur qui représente la chaleur émise par la réaction de fermentation lors des essais avec 12 g de paille est de 0,36 soit 30 J/g de paille initialement introduit.

Par ailleurs, la production de 0,882 g d'éthanol devrait être accompagnée d'un dégagement de chaleur d'environ 1,08 kJ. Or, la mesure par calorimétrie isotherme donne une valeur de 0,36 kJ soit uniquement 33,33% de la chaleur attendue. Cette différence est non seulement due à la cinétique lente de la réaction comme dit précédemment, mais aussi à l'existence de phénomènes endothermiques tels que la solubilisation des levures.

Par conséquent, même si la chaleur de fermentation ne peut être mesurée précisément, l'Optimax peut néanmoins générer des thermogrammes qui donnent des indications sur l'avancement des réactions.

V.3.2 Hydrolyse et fermentation simultanée de la paille broyée

Pour cet essai, 12 g de paille broyée dans 700 ml de tampon ont été utilisés.

Après avoir chauffé le mélange à 85°C pendant 10 min pour éliminer un maximum de microorganismes, la température du mélange est abaissée à 30°C puis 22 g de levure sont ajoutés et l'agitation fixée à 400 tr/min puis le premier étalonnage est réalisé. Le cocktail enzymatique constitué de 1 g de β -glucosidase, 300 μ l de CDH et 3 ml de GC220 est alors ajouté au mélange réactionnel.

Après 48 h de réaction durant lesquelles des échantillons sont prélevés à différents intervalles de temps, le 2^{ème} étalonnage est réalisé.

Le thermogramme obtenu au moment de l'ajout du cocktail enzymatique est présenté en Figure V. 12.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

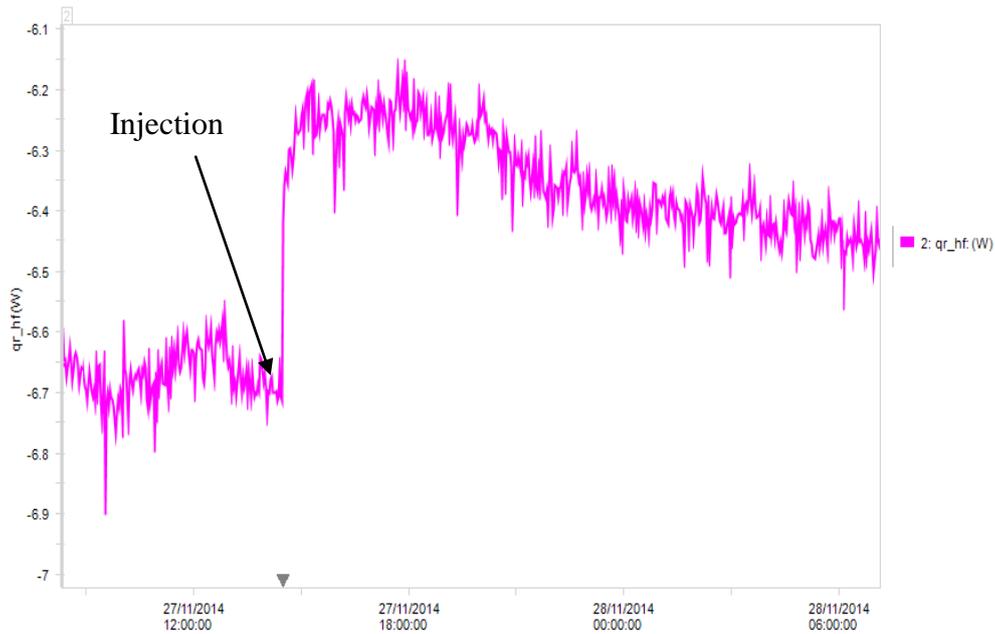


Figure V. 12. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 12g de paille broyée dans 700 ml de tampon

Les échantillons prélevés sont analysés par CPG pour doser l'éthanol. Les résultats obtenus sont repris dans la Figure V. 13.

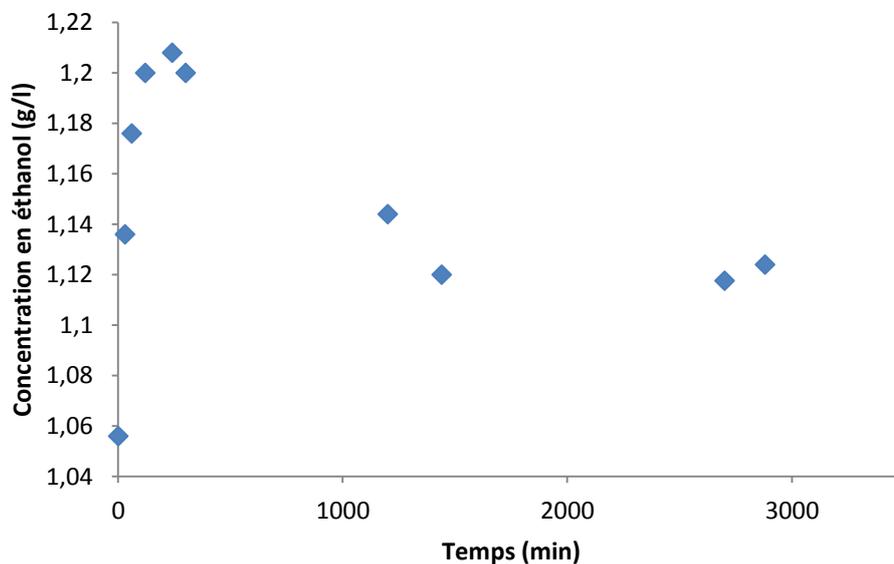


Figure V. 13. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors de l'utilisation de 12g paille

A partir des résultats d'analyse par CPG présentés en Figure V. 13 il est noté que la concentration en éthanol avant même l'ajout des enzymes était déjà de 1,05 g/l. Il est probable que cela s'explique par la conversion, par les levures présentes dans le réacteur dès le départ de l'essai, du glucose relargué naturellement par la paille.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Par ailleurs, la même figure montre que comme dans le cas de l'essai SHF, la concentration d'éthanol lors de cet essai augmente dans un premier temps pour atteindre un maximum de production de 1,2 g/l après 4 h de l'ajout du cocktail enzymatique. Dans un deuxième temps la concentration en éthanol diminue progressivement jusqu'à atteindre un palier d'environ 1,12 g/l après 24 h de l'ajout des enzymes.

Si on compare les résultats d'analyses des deux procédés, on remarque que les maximums de production sont quasiment équivalents avec 1,26 g/l pour le procédé SHF et 1,2 g/l pour le procédé SSF. Par contre le maximum de production est atteint plus rapidement lors de l'essai SHF (90 min) que lors de l'essai SSF (240 min). Cela tend à prouver que l'étape d'hydrolyse est limitante lors de ce dernier procédé.

Le thermogramme obtenu lors de l'essai SSF (Figure V. 12) montre que le flux de chaleur généré par les réactions augmente brusquement après l'ajout du cocktail enzymatique puis le flux de chaleur se stabilise pendant plus de 5 h avant de diminuer lentement.

Comme indiqué précédemment, il est probable que l'hydrolyse soit l'étape limitante lors de ce procédé, par conséquent, l'augmentation rapide du flux de chaleur après l'ajout du cocktail enzymatique peut s'expliquer par la présence dans le réacteur de sucres facilement hydrolysables consommés après leurs productions par les levures pour produire de l'éthanol.

La stabilisation du flux de chaleur pendant 5 h ne peut être expliquée que par l'atteinte des vitesses maximales des réactions.

La diminution progressive est quant à elle expliquée par le fait que les polysaccharides diminuent au fur et à mesure de l'avancement des réactions d'hydrolyses (épuisement du substrat).

Par ailleurs, le signal calorimétrique ne retourne pas à la ligne de base initiale mais se stabilise à environ 0,2 W au dessus de celle-ci. Cela peut s'expliquer par le fait que les substrats sont disponibles et les réactions continuent donc à produire de la chaleur.

La chaleur produite lors de ce procédé s'élève à plus de 6,31 kJ, or l'hydrolyse de la totalité du polysaccharide additionnée à la fermentation de la totalité du glucose ne peut produire plus de 6 kJ. Ce surplus de chaleur ne peut être expliqué que par la présence d'autres réactions dans le réacteur telle que la respiration du glucose et ou de l'éthanol, réaction bien plus exothermique que la fermentation du glucose. En effet, la respiration d'une mole de glucose produit environ 1677 kJ/mol.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

L'oxydation du glucose est possible des lors que la concentration en glucose dans le milieu est inférieure à 1 g/l. En effet, même si la *Saccharomyces cerevisiae* par effet Crabtree consomme préférentiellement le glucose par voie fermentaire car le glucose induit à une inhibition de la synthèse des enzymes nécessaires à la respiration [158] ; lorsque il y a peu de glucose cette inhibition est annulée et la respiration du glucose prend place.

Afin de visualiser les éventuels changements dans la structure de la paille de blé broyée, une partie du culot récupéré en fin d'essai est lavée et observée au microscope électronique. La Figure V. 14 montre deux échantillons de paille avant (A) et après traitement (B) avec un grossissement de 1000.

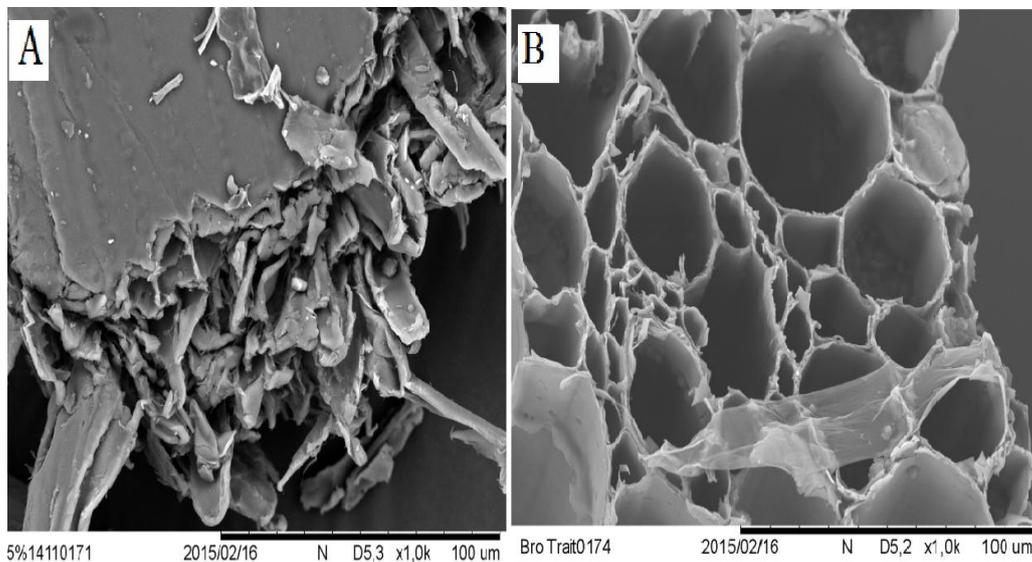


Figure V. 14. Observation au microscope électronique à balayage de la paille de blé broyée avant (A) et après hydrolyse et fermentation (B)

Si on compare les deux clichés (A) et (B) de la Figure V.14, on observe que la structure de la paille ayant subi l'hydrolyse et la fermentation est bien plus poreuse que celle de la paille broyée n'ayant subi aucun traitement. Cela s'explique par le fait que les polysaccharides constituant la paille ont été solubilisés et transformés tout comme la figure IV.20.

Par conséquent on peut dire que l'hydrolyse et la fermentation de la paille broyée apportent des modifications profondes de la structure de celle-ci.

V.3.3 Hydrolyse et fermentation simultanée de la paille explosée

Ces essais sont réalisés dans le but de produire d'avantage d'éthanol et par conséquent enregistrer plus de chaleur. Cela est envisageable, car contrairement à la paille broyée, la

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

paille explosée flotte moins et permet donc de traiter une plus grande masse de ce substrat en une seule fois et produire ainsi une plus grande quantité d'éthanol.

La réalisation de ces essais est la même que celle décrite en V.3.1 mais en utilisant respectivement 97,24 g de paille explosée lors du premier essai et 130 g lors du second. Le cocktail enzymatique est constitué quant à lui de 3 g de β -glucosidase et 15 ml de GC220 dilué dans 23 ml de tampon.

Le résultat du suivi par calorimétrie obtenu pour l'essai avec 97,24 g est illustré dans la Figure V. 15.

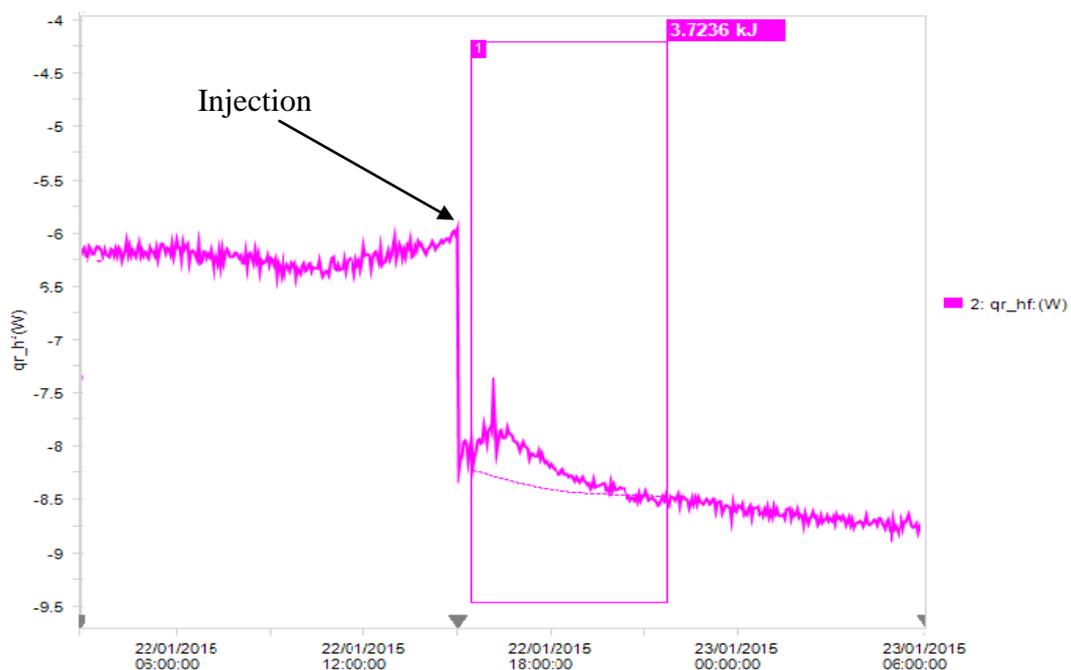


Figure V. 15. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 97,24 g de paille explosée

Comme le montre la Figure V. 15, l'ajout du cocktail enzymatique (constitué β -glucosidase et de GC220) engendre une importante diminution du signal thermique avec une différence d'environ 2,5 W par rapport à la ligne de base initialement enregistrée alors qu'un pic exothermique été attendu. Cela est peut être dû à la présence de réactions endothermiques non observées dans le cas des essais sur la paille broyée ou à un changement (diminution) de la viscosité du milieu qui serait dû à l'ajout des enzymes diluées dans le tampon qui diluent le contenu du réacteur et donc abaisse la chaleur engendrée par l'agitation.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Afin de vérifier cette dernière hypothèse ; lors de l'essai avec 130 g de paille explosée, préalablement à l'ajout du cocktail enzymatique, 40 ml de tampon ont été ajoutés au mélange réactionnel.

Une capture d'écran du résultat du suivi calorimétrique obtenu est illustrée en Figure V. 16

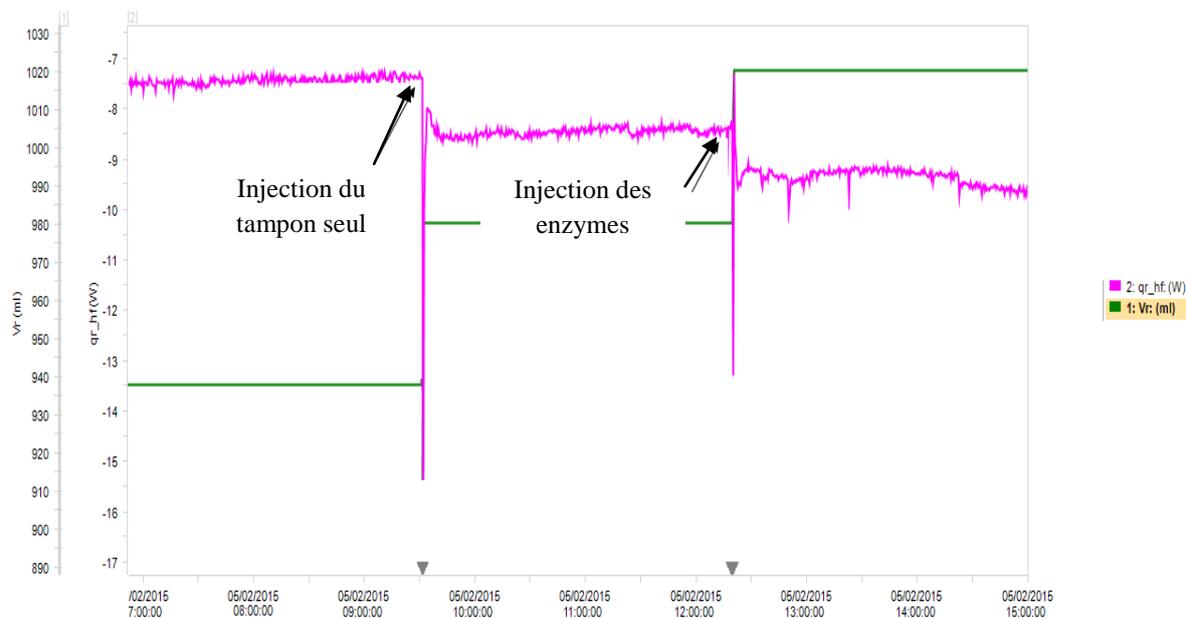


Figure V. 16. Thermogramme de l'hydrolyse et fermentation simultanée de 130 g de paille explosée

La Figure V. 16 conforte l'hypothèse d'un changement des propriétés rhéologiques du milieu. En effet, l'ajout de 40 ml de tampon a fait baisser le signal calorimétrique de 1 W et cela ne peut être attribué qu'à une dilution du milieu et par conséquent une diminution de la chaleur engendrée par l'agitation.

L'ajout des enzymes dilués à eu le même impact, à savoir, une nouvelle baisse du signal thermique d'environ 1 W par rapport à la ligne de base enregistrée après le premier ajout.

Il est donc nécessaire de prendre en compte la chaleur d'agitation à chaque instant pour pouvoir remonter à la chaleur réactionnelle mais cela n'est pas possible avec l'équipement actuel dans le cadre de ce travail.

Par ailleurs, ce changement dans les propriétés rhéologiques n'a été observé que dans le cas de forte charge. En effet, celui-ci n'a pas été observé lors des essais avec le cellobiose ni avec les faibles charges en paille.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

Cela signifie qu'à partir d'une certaine concentration, la charge modifie les propriétés rhéologiques du milieu fortement.

Les quantités d'éthanol mesurées par CPG dans les différents échantillons prélevés lors du dernier essai sont reprises dans la Figure V. 17.

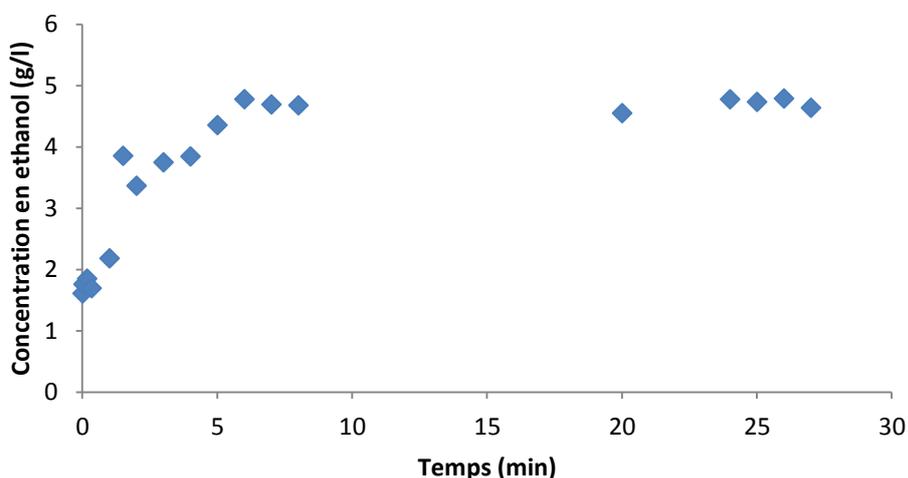


Figure V. 17. Evolution en fonction du temps de concentration d'éthanol dans le bioréacteur lors de l'utilisation de 130 g paille explosée

Les résultats du dosage de l'éthanol dans les différents échantillons, illustrés dans la Figure V. 17, montrent que la concentration en éthanol augmente linéairement dans les 6 premières heures de l'ajout du cocktail enzymatique pour atteindre une concentration maximale d'environ 4,7 g/l (3.29 g dans 700 ml) soit un rendement faible de 12,83% de Gay Lussac . Puis la concentration dans les différents prélèvements reste stable.

La production de 3.29 g d'éthanol devrait être accompagnée d'une production de chaleur d'environ 0.91 kcal soit 3.79 kJ. Cette chaleur devait être produites en 6 h, soit un flux de chaleur moyen d'environ 0,175 W. le flux de chaleur est donc très faible et est dans la limite de détection de la machine.

Ce faible rendement est dû soit à l'inhibition des levures par le glucose issu de l'hydrolyse du cellulose ou à la formation d'inhibiteurs de fermentation formés lors du prétraitement (explosion à la vapeur) ou encore à la consommation de l'éthanol par les levures.

Dans le but de visualiser d'éventuels changements dans la structure de la paille explosée avant (cliché (A)) et après avoir subi l'hydrolyse et fermentation simultanée (cliché

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

(B)), des observations microscopiques au grossissement de 1000 ont été effectuées. Les résultats obtenus sont dans la Figure V. 18.

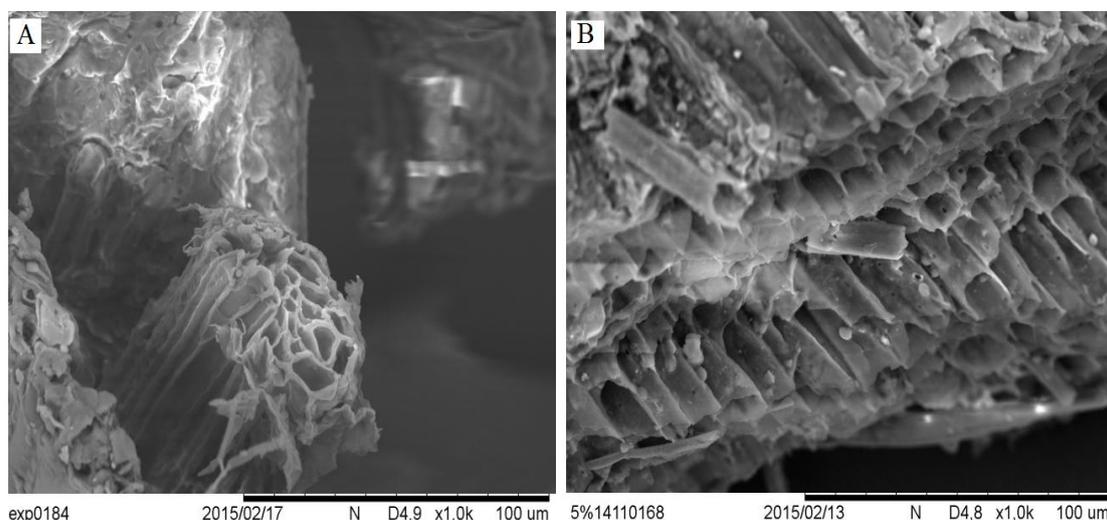


Figure V. 18. Observation au microscope électronique à balayage de la paille de blé exposée avant A et après hydrolyse et fermentation simultanées B

L'observation au microscope électronique à balayage montre ici encore que l'hydrolyse et la fermentation simultanée modifie la structure de la paille de blé et laisse entrevoir le squelette.

En effet, le cliché (B) montre une structure moins dense que celle observée sur le cliché (A). Comme déjà vu en Figure V. 15 et Figure IV. 21 Cela est certainement dû à la solubilisation des polysaccharides pendant l'hydrolyse enzymatique.

V.4 Conclusion

L'étude par le calorimètre OptiMax a montré que celui-ci est un bon outil pour le suivi des réactions rapides mais qu'il est moins efficace pour l'étude des réactions biologiques lentes et qui génèrent peu de chaleur.

En effet, même si le suivi par ce calorimètre de la fermentation éthanolique donne une indication sur l'avancement de la réaction à condition d'avoir une rhéologie plus au moins constante (retour à une certaine stabilisation concordant avec la production maximale d'éthanol), la chaleur mesurée est bien inférieure à la chaleur attendue.

Par ailleurs les essais à fortes charges montrent que le moindre ajout de liquide (ici les enzymes) fait changer la rhéologie du milieu et donc la chaleur de mélange et fausse ainsi les mesures.

Calorimètre de grande contenance par sonde de mesure interne

En ce qui concerne l'hydrolyse enzymatique, celle-ci n'est pas du tout détectée par ce calorimètre et ce car le signal thermique engendré par la réaction est dans la limite de détection de l'appareil.

Dans le but d'améliorer les mesures calorimétriques, il sera donc intéressant de mesurer la rhéologie du milieu dans le temps pour déterminer la chaleur due à l'agitation à chaque instant d'une part, et d'améliorer la stabilité de l'OptiMax.

CONCLUSIONS GENERALES

Conclusions générales

La production des biocarburants de 2^{ème} génération issus de la transformation biochimique de la biomasse lignocellulosique, est l'une des solutions les plus envisagées pour répondre à la demande mondiale croissante en carburant et limiter les émissions de gaz à effet de serre responsables du réchauffement global de notre planète.

Malgré les nombreux efforts de recherche axés sur l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose, cette étape reste à l'heure actuelle l'un des verrous majeurs et la viabilité économique de ce biocarburant en dépend.

Les travaux menés au cours de cette thèse de doctorat s'inscrivent dans le cadre de l'amélioration de l'étape d'hydrolyse enzymatique en proposant une méthode originale et simple de suivi des réactions biochimiques qui est la calorimétrie isotherme.

Pour cela, une étude bibliographique portant sur les étapes et les procédés de fabrications du bioéthanol de 2^{ème} génération ainsi que les modèles cinétiques régissant l'hydrolyse enzymatique et la calorimétrie isotherme des réactions biochimique a été menée. Cette revue bibliographique a montré une grande hétérogénéité non seulement en termes de prétraitement mais aussi en termes des procédés de fabrication. Néanmoins c'est les procédés SHF et SSF qui sont les plus utilisés.

En ce qui concerne les modèles cinétiques de l'hydrolyse enzymatique, l'étude a montré que même si plusieurs modèles ont été développés, aucun ne fait à la fois une bonne description de la réactivité des enzymes et du substrat, et que le modèle de Michaelis-Menten reste largement utilisé pour décrire l'action des cellulases en phase hétérogène.

Une étude expérimentale a donc été réalisée pour tester la faisabilité du suivi des réactions par calorimétrie isotherme.

La calorimétrie apparaît ainsi comme un outil envisageable pour le suivi des réactions d'hydrolyse enzymatiques. En effet grâce à ces mesures les réactions, en continu, ont pu être détectées et la proportionnalité des signaux confirme les mesures finales de dosage.

Par ailleurs, cette méthode a permis, de déterminer la température optimale des enzymes utilisées pour l'hydrolyse à 45°C et de mettre en évidence que le rapport quantité de substrat et enzyme est un paramètre important du rendement d'hydrolyse. De plus cela a permis de déterminer un meilleur cocktail enzymatique constitué de Cellulases + CDH qui permet la production d'une quantité d'acide gluconique qui pourrait améliorer l'attractivité de ces biocarburants de 2^{ème} génération. Ces mêmes essais ont aussi permis de déterminer la chaleur d'hydrolyse de la paille de blé qui s'élève à 32 J/g (gramme de sucres réducteur produit).

Conclusions générales

D'autres parts, les constantes cinétiques de l'enzyme β -glucosidase sur le substrat du cellobiose calculées à partir des mesures calorimétriques montrent une très bonne concordance avec les résultats obtenus par la méthode du point fixe utilisée traditionnellement.

Aussi, les mesures obtenues par calorimétrie isotherme ont été utilisées pour le calcul des constantes cinétiques des cellulases+CDH sur la paille de blé et les résultats montrent que ce cocktail enzymatique est plus rapide à 45°C dans la gamme de températures testées (entre 40 et 55°C).

Par ailleurs, la détermination des constantes cinétique s'est révélée plus simple à mettre œuvre par la méthode de la calorimétrie isotherme par rapport à la méthode du point fixe (spectrophotométrie). Cependant, un effort d'usinage des cellules de mesure à mélanges notamment sur le mobile d'agitation et son support est nécessaire pour avoir des chaleurs dues à l'agitation dans la cellule de mesure et cellule de référence les plus proche et les plus faibles possible et réaliser ainsi les deux essais au même temps.

De plus, les constantes cinétiques enzymatiques calculées pour l'hydrolyse du cellobiose à partir des résultats des mesures calorimétriques sont en adéquation avec celles obtenues par la méthode spectrophotométrique avec des constantes de Michaelis-Menten K_m obtenus respectivement par calorimétrie et point fixe sont de $35,15 \pm 0,95$ et $34,01 \pm 0,38$ mM et des vitesses V_{max} respectivement de $7,36 \pm 0,62$ et $8,42 \pm 0,38$ mM/min.

Enfin, une meilleur cinétique pour l'hydrolyse de la paille de blé calculé à partir les analyses calorimétrique (C80) est obtenue pour la température de 45°C avec une vitesse maximale de 0,291 mM/min et une constante de Michaelis-Menten K_m de 1,22 mM.

Les essais calorimétriques réalisés avec le réacteur échelle laboratoire d'un litre (l'OptiMax) montrent que celui-ci est peu adapté au suivi des réactions d'hydrolyse enzymatique car celles-ci génèrent un flux de chaleur trop faible pour être détectées par ce calorimètre mais que celui-ci peut être utilisé pour le suivi des essais de fermentation éthanolique qui génère bien plus de chaleur que l'hydrolyse enzymatique. En effet, même si l'OptiMax ne mesure pas avec précision la chaleur de fermentation, celui-ci génère des indications précieuses sur l'évolution de la réaction de fermentation des sucres en éthanol.

Le suivi par OptiMax du procédé d'hydrolyse et fermentation simultanée (SSF) de la paille de blé à faible charge montre que ce calorimètre est adapté pour le suivi direct des réactions. En effet, celui-ci a généré des thermogrammes qui montrent les différentes étapes

Conclusions générales

d'avancement des réactions et le dosage d'éthanol des différents prélèvements effectués confirme ce résultat.

Cependant le suivi des procédés SSF à forte charge en paille est moins concluant et confirme l'inconvénient majeur et la limite de la méthode calorimétrique à savoir la mesure et le suivi d'un signal thermique global et non d'un signal spécifique. En effet, la moindre perturbation thermique (chaleur générée par l'agitation dans ce cas) modifie la ligne de base et par conséquent complique l'analyse des résultats.

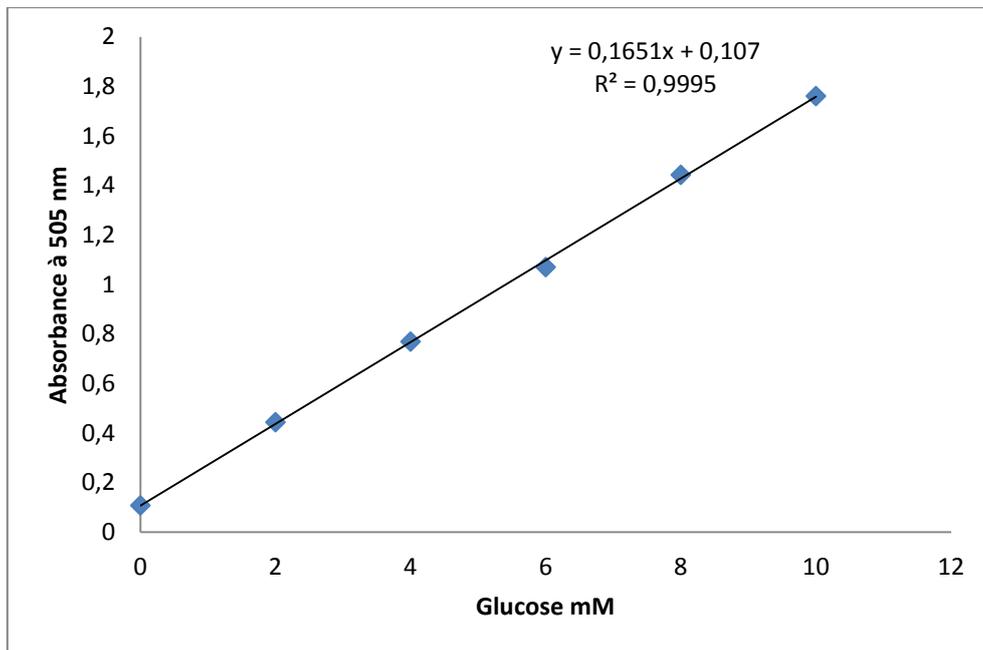
Pour conclure, nous pouvons dire que le calorimètre est un outil qui donne des informations précieuses sur l'avancement et le déroulement des réactions biologiques à condition de connaître et d'anticiper voire éliminer toute perturbation thermique qui ne serait pas en lien avec les réactions étudiées.

Dans le but d'améliorer cette technique, il serait intéressant de coupler un rhéomètre au dispositif calorimétrique pour déterminer l'évolution des propriétés rhéologiques du milieu réactionnel afin de maîtriser l'évolution des quantités de chaleur enregistrées et en déduire plus précisément les chaleurs réelles de réactions.

ANNEXES

Annexe 1:

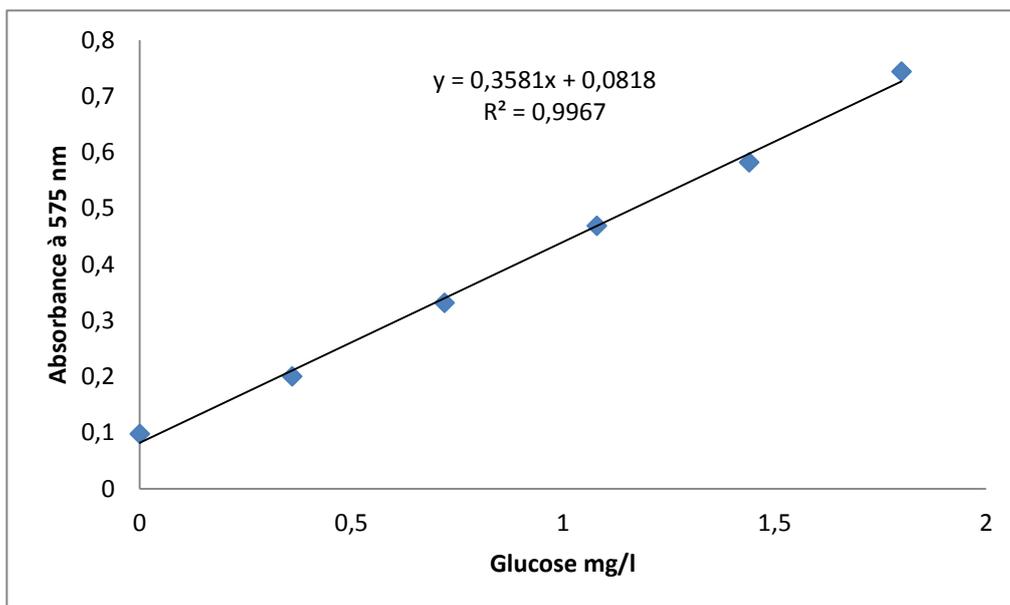
Exemple de courbe d'étalonnage du glucose (dosage RTU)



Exemple de courbe d'étalonnage du glucose

Annexe 2:

Exemple de droite d'étalonnage des sucres réducteurs (dosage DNS)



Exemple de courbe d'étalonnage des sucre réducteurs

Annexe 3: Méthode de l'étalon interne

La méthode d'étalon interne a été utilisée pour quantifier l'éthanol.

Le principe de cette méthode consiste à comparer les surfaces des pics du mélange avec un étalon pris comme référence. On réalise 2 chromatogrammes : le 1er pour déterminer les coefficients de proportionnalité et le 2^{ème} pour le dosage. On réalise le 1^{er} mélange avec des concentrations connues en élément à doser auquel on rajoute l'étalon. Dans cette étude, c'est l'isopropanol qui a été choisi comme étalon interne

Etape 1 : Détermination des coefficients de proportionnalité On a :

$$m_e = K_e * A_e$$

m_e : Masse d'éthanol

A_e : Surface du pic d'éthanol

K_e : Constante de proportionnalité de l'éthanol

$$m_i = K_i * A_i$$

m_i : Masse de l'isopropanol

A_i : Surface du pic de l'isopropanol

K_i : Constante de proportionnalité de l'isopropanol

$$m_e/m_i = K_e/K_i * A_i/A_e$$

Tout étant connu, le coefficient de proportionnalité relatif est déterminé

$$K_{e/i} = K_e/K_i$$

Etape 2 : le dosage

Le dosage se fait en ajoutant une quantité précise du composé étalon aux échantillons à analyser. L'aire des surfaces des chromatogrammes correspondant à l'éthanol permet d'en déduire la fraction massique de ce dernier grâce à la relation suivante :

$$m'_e/m'_i = K_{e/i} * A'_e/A'_i$$

m'_e : Masse de l'éthanol dans l'échantillon

m'_i : Masse de l'isopropanol introduit

A'_e : Surface du pic engendrée par l'éthanol

A'_i : Surface du pic engendrée par l'isopropanol

m'_i Étant connu, la concentration de l'éthanol de l'échantillon est déduite.

Annexe 4:

Thermogramme obtenu pour l'hydrolyse de 8 g de paille broyée dans l'OptiMax.



Thermogramme de l'hydrolyse de 8 g de paille dans 700 ml de tampon

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] V. Rondreux, « Concentration de CO₂: plus de 400 ppm pour le printemps | Dr Pétrole & Mr Carbone », 06-oct-2015.
- [2] J.-C. Duplessy, « État des connaissances et incertitudes sur le changement climatique induit par les activités humaines », *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. IIA - Earth Planet. Sci.*, vol. 333, n° 12, p. 765-773, déc. 2001.
- [3] « 5ème rapport du GIEC | Conférence sur le climat - Paris 2015 », 13-oct-2015. .
- [4] F. W. Bai, W. A. Anderson, et M. Moo-Young, « Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks », *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, n° 1, p. 89-105, janv. 2008.
- [5] CEA, « CEA - Jeunes - Médiathèque - Animations Flash - Energies - Les biocarburants de 2ème génération », [www.cea.fr](http://www.cea.fr/jeunes/mediatheque/animations-flash/energies/les-biocarburants-de-2eme-generation), 29-avr-2013. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.cea.fr/jeunes/mediatheque/animations-flash/energies/les-biocarburants-de-2eme-generation>.
- [6] S.-K. Moon, S. W. Kim, et G.-W. Choi, « Simultaneous saccharification and continuous fermentation of sludge-containing mash for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321 », *J. Biotechnol.*, vol. 157, n° 4, p. 584-589, février 2012.
- [7] M. J. Todd et J. Gomez, « Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? », *Anal. Biochem.*, vol. 296, n° 2, p. 179-187, sept. 2001.
- [8] A. de l'Environnement et de la M. de l'Energie ADEME, « 2005 ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www2.ademe.fr/servlet/getDoc?cid=96&m=3&id=24073&ref=12527&p1=B>. [Consulté le: 02-sept-2014].
- [9] P. Girard et A. Fallot, « Review of existing and emerging technologies for the production of biofuels in developing countries », *Energy Sustain. Dev.*, vol. 10, n° 2, p. 92-108, juin 2006.
- [10] L. V. Eeckhout, « L'Europe limite timidement l'usage des agrocarburants nocifs pour la planète », *Le Monde.fr*, 28-avr-2015.
- [11] F. Lamire, « Biocarburants 1ère, 2ème et 3ème génération », 11-déc-2012. [En ligne]. Disponible sur: http://www.themavision.fr/jcms/rw_340935/biocarburants-1ere-2eme-et-3eme-generation. [Consulté le: 16-oct-2014].
- [12] « micro algues, biocarburant de demain ? », *calameo.com*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.calameo.com/read/003086015af9d8f230a9e>. [Consulté le: 28-sept-2015].
- [13] M. Balat, « Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review », *Energy Convers. Manag.*, vol. 52, n° 2, p. 858-875, févr. 2011.
- [14] M. Balat et H. Balat, « Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel », *Appl. Energy*, vol. 86, n° 11, p. 2273-2282, 2009.
- [15] J. C. Ogier, J. P. Leygue, D. Ballerini, J. Pourquie, et L. Rigal, « Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique », *Oil Gas Sci. Technol.*, vol. 54, n° 1, p. 67-94, janv. 1999.
- [16] M. Galbe et G. Zacchi, « Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials », *Biomass Bioenergy*, vol. 46, p. 70-78, nov. 2012.
- [17] V. Menon et M. Rao, « Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept », *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 38, n° 4, p. 522-550, août 2012.
- [18] A. Brandt, J. Gräsvik, J. P. Hallett, et T. Welton, « Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids », *Green Chem.*, vol. 15, n° 3, p. 550, 2013.
- [19] J. Lee, « Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol », *J. Biotechnol.*, vol. 56, n° 1, p. 1-24, juillet 1997.

Références bibliographiques

- [20] C.-F. Liu et R.-C. Sun, « Chapter 5 - Cellulose », in *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, R.-C. Sun, Éd. Amsterdam: Elsevier, 2010, p. 131-167.
- [21] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, et A. Bohn, « Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 44, n° 22, p. 3358-3393, mai 2005.
- [22] A. Xu, J. Wang, et H. Wang, « Effects of anionic structure and lithium salts addition on the dissolution of cellulose in 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid solvent systems », *Green Chem.*, vol. 12, n° 2, p. 268-275, févr. 2010.
- [23] N. Lavoine, I. Desloges, A. Dufresne, et J. Bras, « Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review », *Carbohydr. Polym.*, vol. 90, n° 2, p. 735-764, oct. 2012.
- [24] Y. Nishiyama, P. Langan, et H. Chanzy, « Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, n° 31, p. 9074-9082, août 2002.
- [25] A. M. Bocek, « Effect of Hydrogen Bonding on Cellulose Solubility in Aqueous and Nonaqueous Solvents », *Russ. J. Appl. Chem.*, vol. 76, n° 11, p. 1711-1719, nov. 2003.
- [26] C. Satgé, R. Granet, B. Verneuil, P. Branland, et P. Krausz, « Synthesis and properties of biodegradable plastic films obtained by microwave-assisted cellulose acylation in homogeneous phase », *Comptes Rendus Chim.*, vol. 7, n° 2, p. 135-142, févr. 2004.
- [27] J.-L. Ren et R.-C. Sun, « Chapter 4 - Hemicelluloses », in *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, R.-C. Sun, Éd. Amsterdam: Elsevier, 2010, p. 73-130.
- [28] Y. Zhang, G. Yu, B. Li, X. Mu, H. Peng, et H. Wang, « Hemicellulose isolation, characterization, and the production of xylo-oligosaccharides from the wastewater of a viscose fiber mill », *Carbohydr. Polym.*, vol. 141, p. 238-243, mai 2016.
- [29] R. Sun, J. Mark Lawther, et W. B. Banks, « Isolation and characterization of hemicellulose B and cellulose from pressure refined wheat straw », *Ind. Crops Prod.*, vol. 7, n° 2-3, p. 121-128, janv. 1998.
- [30] A. U. Buranov et G. Mazza, « Lignin in straw of herbaceous crops », *Ind. Crops Prod.*, vol. 28, n° 3, p. 237-259, nov. 2008.
- [31] Z. Strassberger, S. Tanase, et G. Rothenberg, « The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery », *RSC Adv.*, vol. 4, n° 48, p. 25310, 2014.
- [32] F. Lu et J. Ralph, « Chapter 6 - Lignin », in *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, R.-C. Sun, Éd. Amsterdam: Elsevier, 2010, p. 169-207.
- [33] « Caractéristiques de combustion de la biomasse ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/11-034.htm#5>. [Consulté le: 13-oct-2014].
- [34] A. Limayem et S. C. Ricke, « Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects », *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 38, n° 4, p. 449-467, août 2012.
- [35] P. Sassner, M. Galbe, et G. Zacchi, « Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials », *Biomass Bioenergy*, vol. 32, n° 5, p. 422-430, mai 2008.
- [36] F. Talebnia, D. Karakashev, et I. Angelidaki, « Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n° 13, p. 4744-4753, juill. 2010.
- [37] D. Chiaramonti, M. Prussi, S. Ferrero, L. Oriani, P. Ottonello, P. Torre, et F. Cherchi, « Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and

Références bibliographiques

- development of an innovative method », *Biomass Bioenergy*, vol. 46, p. 25-35, nov. 2012.
- [38] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, et M. J. Negro, « Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n° 13, p. 4851-4861, juill. 2010.
- [39] M. Fatih Demirbas, M. Balat, et H. Balat, « Biowastes-to-biofuels », *Energy Convers. Manag.*, vol. 52, n° 4, p. 1815-1828, avr. 2011.
- [40] C. N. Hamelinck, G. van Hooijdonk, et A. P. Faaij, « Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term », *Biomass Bioenergy*, vol. 28, n° 4, p. 384-410, avr. 2005.
- [41] J. Y. Zhu et X. J. Pan, « Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n° 13, p. 4992-5002, juill. 2010.
- [42] H. A.-H. Ibrahim, « Pretreatment of straw for bioethanol production », *Energy Procedia*, vol. 14, p. 542-551, 2012.
- [43] A. T. W. M. Hendriks et G. Zeeman, « Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass », *Bioresour. Technol.*, vol. 100, n° 1, p. 10-18, janv. 2009.
- [44] L. J. Jönsson, B. Alriksson, et N.-O. Nilvebrant, « Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification », *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, n° 1, p. 16, janv. 2013.
- [45] S. Prasad, A. Singh, et H. C. Joshi, « Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues », *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 50, n° 1, p. 1-39, mars 2007.
- [46] Y. Zhang et H. Chen, « Multiscale modeling of biomass pretreatment for optimization of steam explosion conditions », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 75, p. 177-182, 2012.
- [47] Y. Sun et J. J. Cheng, « Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production », *Bioresour. Technol.*, vol. 96, n° 14, p. 1599-1606, sept. 2005.
- [48] H. Chen, Y. Han, et J. Xu, « Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide », *Process Biochem.*, vol. 43, n° 12, p. 1462-1466, déc. 2008.
- [49] Ó. J. Sánchez et C. A. Cardona, « Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks », *Bioresour. Technol.*, vol. 99, n° 13, p. 5270-5295, sept. 2008.
- [50] N. Sarkar, S. K. Ghosh, S. Bannerjee, et K. Aikat, « Bioethanol production from agricultural wastes: An overview », *Renew. Energy*, vol. 37, n° 1, p. 19-27, janv. 2012.
- [51] J. A. Pérez, I. Ballesteros, M. Ballesteros, F. Sáez, M. J. Negro, et P. Manzanares, « Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production », *Fuel*, vol. 87, n° 17-18, p. 3640-3647, déc. 2008.
- [52] R. A. Silverstein, Y. Chen, R. R. Sharma-Shivappa, M. D. Boyette, et J. Osborne, « A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks », *Bioresour. Technol.*, vol. 98, n° 16, p. 3000-3011, nov. 2007.
- [53] D. Ballerini, *Biocarburants (Les)*. Editions OPHRYS.
- [54] N. Mosier, R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak, et M. R. Ladisch, « Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover », *Bioresour. Technol.*, vol. 96, n° 18, p. 1986-1993, déc. 2005.
- [55] K. Ziemiński, I. Romanowska, et M. Kowalska, « Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production », *Waste Manag.*, vol. 32, n° 6, p. 1131-1137, juin 2012.
- [56] S. Haghighi Mood, A. Hossein Golfeshan, M. Tabatabaei, G. Salehi Jouzani, G. H. Najafi, M. Gholami, et M. Ardjmand, « Lignocellulosic biomass to bioethanol, a

Références bibliographiques

- comprehensive review with a focus on pretreatment », *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 27, p. 77-93, nov. 2013.
- [57] C. Wan et Y. Li, « Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production », *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n° 16, p. 6398-6403, août 2010.
- [58] V. K. Gupta et M. G. Tuohy, *Biofuel Technologies: Recent Developments*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [59] D. Ballerini, *Biocarburants (Les)*. Editions OPHRYS.
- [60] M. M. Nazhad, L. P. Ramos, L. Paszner, et J. N. Saddler, « Structural constraints affecting the initial enzymatic hydrolysis of recycled paper », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 17, n° 1, p. 68-74, janv. 1995.
- [61] J.-C. Guibet et A. Chauvel, *Utilisation de produits organiques oxygénés comme carburants et combustibles dans les moteurs*. Editions TECHNIP, 1981.
- [62] F. BROUST, P. GIRARD, et L. VAN DE STEENE, « Biocarburants de seconde génération et bioraffinerie », *Tech. Ing. Innov. En Nouv. Énerg.*, vol. base documentaire : TIB503DUO., n° ref. article : re110, 2015.
- [63] M. E. Himmel, S.-Y. Ding, D. K. Johnson, W. S. Adney, M. R. Nimlos, J. W. Brady, et T. D. Foust, « Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production », *Science*, vol. 315, n° 5813, p. 804-807, févr. 2007.
- [64] J. Andreaus, H. Azevedo, et A. Cavaco-Paulo, « Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes », *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 7, n° 1-4, p. 233-239, sept. 1999.
- [65] A. G. Pardo et F. Forchiassin, « Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis* », *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 31, n° 1, p. 31-35, mars 1999.
- [66] M. J. Taherzadeh et K. Karimi, « ENZYMATIC-BASED HYDROLYSIS PROCESSES FOR ETHANOL », *BioResources*, vol. 2, n° 4, p. 707-738, nov. 2007.
- [67] Y. Sun et J. Cheng, « Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review », *Bioresour. Technol.*, vol. 83, n° 1, p. 1-11, mai 2002.
- [68] D. Kumar et G. S. Murthy, « Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production », *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, n° 1, p. 63, mai 2013.
- [69] S. P. S. Chundawat, G. T. Beckham, M. E. Himmel, et B. E. Dale, « Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals », *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 2, n° 1, p. 121-145, 2011.
- [70] Y.-H. Percival Zhang, M. E. Himmel, et J. R. Mielenz, « Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies », *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, n° 5, p. 452-481, oct. 2006.
- [71] T. Hasunuma et A. Kondo, « Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering », *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, n° 6, p. 1207-1218, nov. 2012.
- [72] C. Tengborg, M. Galbe, et G. Zacchi, « Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood », *Biotechnol. Prog.*, vol. 17, n° 1, p. 110-117, févr. 2001.
- [73] F. Peng, P. Peng, F. Xu, et R.-C. Sun, « Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses », *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, n° 4, p. 879-903, juill. 2012.
- [74] T. Collins, C. Gerday, et G. Feller, « Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases », *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, n° 1, p. 3-23, janv. 2005.
- [75] D. L. Gonçalves, A. Matsushika, B. B. de Sales, T. Goshima, E. P. S. Bon, et B. U. Stambuk, « Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces*

Références bibliographiques

- cerevisiae strains expressing individual hexose transporters », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 63, p. 13-20, sept. 2014.
- [76] R. D. Schmid, *Atlas de poche de biotechnologie et de génie génétique*. Flammarion médecine-sciences, 2005.
- [77] G. Dragone, D. P. Silva, et J. B. de Almeida e Silva, « Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing », *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 37, n° 7, p. 797-802, nov. 2004.
- [78] A. S. Aldigui, S. Alfenore, X. Cameleyre, G. Goma, J. L. Uribelarrea, S. E. Guillouet, et C. Molina-Jouve, « Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production », *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 26, n° 4, p. 217-222, juill. 2004.
- [79] Z. Buzás, K. Dallmann, et B. Szajáni, « Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 34, n° 6, p. 882-884, 1989.
- [80] M. F. Rosa et I. Sís-Correia, « Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 135, n° 2-3, p. 271-274, 1996.
- [81] S. Hari Krishna, T. Janardhan Reddy, et G. V. Chowdary, « Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast », *Bioresour. Technol.*, vol. 77, n° 2, p. 193-196, avr. 2001.
- [82] M. Linde, M. Galbe, et G. Zacchi, « Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, n° 5, p. 1100-1107, avr. 2007.
- [83] M. Ask, K. Olofsson, T. Di Felice, L. Ruohonen, M. Penttilä, G. Lidén, et L. Olsson, « Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF », *Process Biochem.*, vol. 47, n° 10, p. 1452-1459, oct. 2012.
- [84] L. Paulová, P. Patáková, B. Branská, M. Rychtera, et K. Melzoch, « Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency », *Biotechnol. Adv.*
- [85] C. Roca et L. Olsson, « Increasing ethanol productivity during xylose fermentation by cell recycling of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 60, n° 5, p. 560-563, janv. 2003.
- [86] E. Triwahyuni, Muryanto, Y. Sudiyani, et H. Abimanyu, « The Effect of Substrate Loading On Simultaneous Saccharification And Fermentation Process For Bioethanol Production from Oil Palm Empty Fruit Bunches », *Energy Procedia*, vol. 68, p. 138-146, avr. 2015.
- [87] S. R. Kim, K.-S. Lee, J.-H. Choi, S.-J. Ha, D.-H. Kweon, J.-H. Seo, et Y.-S. Jin, « Repeated-batch fermentations of xylose and glucose-xylose mixtures using a respiration-deficient *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism », *J. Biotechnol.*, vol. 150, n° 3, p. 404-407, nov. 2010.
- [88] T. Niklitschek, O. Salazar, R. Carmona, A. Garcia, et M. E. Lienqueo, « Comparison of shf and ssf processes from forest residues pretreated with ionic liquid to obtain bioethanol », *J. Biotechnol.*, vol. 150, p. 181-181, nov. 2010.
- [89] V. Rana, A. D. Eckard, et B. K. Ahring, « Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus* », *SpringerPlus*, vol. 3, n° 1, p. 516, sept. 2014.
- [90] M. Cantarella, L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera, et F. Alfani, « Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF », *Process Biochem.*, vol. 39, n° 11, p. 1533-1542, juill. 2004.

Références bibliographiques

- [91] P. Manzanares, M. J. Negro, J. M. Oliva, F. Saéz, I. Ballesteros, M. Ballesteros, C. Cara, E. Castro, et E. Ruiz, « Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass », *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 86, n° 6, p. 881-887, juin 2011.
- [92] « 99/00539 Nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation for direct conversion of lignocellulosic biomass to ethanol », *Fuel Energy Abstr.*, vol. 40, n° 1, p. 53, janv. 1999.
- [93] L. Mesa, E. González, I. Romero, E. Ruiz, C. Cara, et E. Castro, « Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse », *Chem. Eng. J.*, vol. 175, p. 185-191, nov. 2011.
- [94] K. Öhgren, O. Bengtsson, M. F. Gorwa-Grauslund, M. Galbe, B. Hahn-Hägerdal, et G. Zacchi, « Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 », *J. Biotechnol.*, vol. 126, n° 4, p. 488-498, déc. 2006.
- [95] A. Zerva, A. L. Savvides, E. A. Katsifas, A. D. Karagouni, et D. G. Hatzinikolaou, « Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing », *Bioresour. Technol.*, vol. 162, p. 294-299, juin 2014.
- [96] V. Agbor, C. Carere, N. Cicek, R. Sparling, et D. Levin, « 8 - Biomass pretreatment for consolidated bioprocessing (CBP) A2 - Waldron, Keith », in *Advances in Biorefineries*, Woodhead Publishing, 2014, p. 234-258.
- [97] F. Alfani, A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera, et M. Cantarella, « Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw », *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, n° 4, p. 184-192, 2000.
- [98] D. Cannella et H. Jørgensen, « Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, n° 1, p. 59-68, janv. 2014.
- [99] H. A. Ruiz, D. P. Silva, D. S. Ruzene, L. F. Lima, A. A. Vicente, et J. A. Teixeira, « Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions », *Fuel*, vol. 95, p. 528-536, mai 2012.
- [100] E. Tomás-Pejó, J. M. Oliva, M. Ballesteros, et L. Olsson, « Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 100, n° 6, p. 1122-1131, août 2008.
- [101] N. Khrantsov, L. McDade, A. Amerik, E. Yu, K. Divatia, A. Tikhonov, M. Minto, G. Kabongo-Mubalamate, Z. Markovic, M. Ruiz-Martinez, et S. Henck, « Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass », *Bioresour. Technol.*, vol. 102, n° 17, p. 8310-8313, sept. 2011.
- [102] *Biocarburants de Seconde Generation*. Ed. Techniques Ingénieur.
- [103] *Biocatalyse ou Catalyse Enzymatique*. Ed. Techniques Ingénieur.
- [104] A. Sørensen, P. S. Lübeck, M. Lübeck, P. J. Teller, et B. K. Ahring, « β -glucosidases from a new *Aspergillus* species can substitute commercial β -glucosidases for saccharification of lignocellulosic biomass », *Can. J. Microbiol.*, vol. 57, n° 8, p. 638-650, août 2011.
- [105] L. P. Calsavara, F. F. De Moraes, et G. M. Zanin, « Modeling cellobiose hydrolysis with integrated kinetic models », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 77-79, p. 789-806, 1999.
- [106] M. L. Carvalho, R. Sousa Jr., U. F. Rodríguez-Zúñiga, C. a. G. Suarez, D. S. Rodrigues, R. C. Giordano, et R. L. C. Giordano, « Kinetic study of the enzymatic

Références bibliographiques

- hydrolysis of sugarcane bagasse », *Braz. J. Chem. Eng.*, vol. 30, n° 3, p. 437-447, sept. 2013.
- [107] R. M. F. Bezerra et A. A. Dias, « Discrimination among eight modified michaelis-menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios: inhibition by cellobiose », *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 112, n° 3, p. 173-184, mars 2004.
- [108] Y.-H. Lee, L. T. Fan, et L.-S. Fan, « Kinetics of hydrolysis of insoluble cellulose by cellulase », in *Advances in Biochemical Engineering, Volume 17*, Springer Berlin Heidelberg, 1980, p. 131-168.
- [109] B. Nidetzky, W. Steiner, M. Hayn, et M. Claeysens, « Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. », *Biochem. J.*, vol. 298, n° Pt 3, p. 705-710, mars 1994.
- [110] P. Bansal, M. Hall, M. J. Realff, J. H. Lee, et A. S. Bommarius, « Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates », *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, n° 6, p. 833-848, déc. 2009.
- [111] L.-S. Wang, Y.-Z. Zhang, H. Yang, et P.-J. Gao, « Quantitative estimate of the effect of cellulase components during degradation of cotton fibers », *Carbohydr. Res.*, vol. 339, n° 4, p. 819-824, mars 2004.
- [112] K. L. Kadam, E. C. Rydholm, et J. D. McMillan, « Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass », *Biotechnol. Prog.*, vol. 20, n° 3, p. 698-705, juin 2004.
- [113] Q. Gan, S. J. Allen, et G. Taylor, « Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling », *Process Biochem.*, vol. 38, n° 7, p. 1003-1018, févr. 2003.
- [114] N. N. Salim et A. L. Feig, « Isothermal Titration Calorimetry of RNA », *Methods San Diego Calif.*, vol. 47, n° 3, p. 198-205, mars 2009.
- [115] M. W. Freyer et E. A. Lewis, « Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions », *Methods Cell Biol.*, vol. 84, p. 79-113, 2008.
- [116] M. L. Bianconi, « Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions », *Biophys. Chem.*, vol. 126, n° 1-3, p. 59-64, mars 2007.
- [117] J. E. Ladbury et M. L. Doyle, *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, Édition : 2Rev Ed. Chichester ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2004.
- [118] R. O'Brien et I. Haq, « Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics », in *Biocalorimetry 2*, J. E. Ladbury et M. L. Doyle, Éd. John Wiley & Sons, Ltd, 2004, p. 1-34.
- [119] O. Braissant, D. Wirz, B. Göpfert, et A. U. Daniels, « Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities », *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 303, n° 1, p. 1-8, févr. 2010.
- [120] L. Wadsö et F. Gómez Galindo, « Isothermal calorimetry for biological applications in food science and technology », *Food Control*, vol. 20, n° 10, p. 956-961, oct. 2009.
- [121] G. Lewis et A. U. (Dan) Daniels, « Use of isothermal heat-conduction microcalorimetry (IHCMC) for the evaluation of synthetic biomaterials », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 66B, n° 2, p. 487-501, août 2003.
- [122] O. Braissant, D. Wirz, B. Gopfert, et A. U. Daniels, « Biomedical Use of Isothermal Microcalorimeters », *Sensors*, vol. 10, n° 10, p. 9369-9383, oct. 2010.
- [123] M. I. Recht, F. E. Torres, D. De Bruyker, A. G. Bell, M. Klumpp, et R. H. Bruce, « Measurement of enzyme kinetics and inhibitor constants using enthalpy arrays », *Anal. Biochem.*, vol. 388, n° 2, p. 204-212, mai 2009.

Références bibliographiques

- [124] M. A. O'Neill, A. Beezer, J. Mitchell, J. Orchard, et J. Connor, « Determination of Michaelis–Menten parameters obtained from isothermal flow calorimetric data », *Thermochim. Acta*, vol. 417, n° 2, p. 187-192, jail. 2004.
- [125] T. Jeoh, J. O. Baker, M. K. Ali, M. E. Himmel, et W. S. Adney, « β -d-Glucosidase reaction kinetics from isothermal titration microcalorimetry », *Anal. Biochem.*, vol. 347, n° 2, p. 244-253, déc. 2005.
- [126] W. Zhiyong, W. Cunxin, et Q. Songsheng, « Microcalorimetric studies on catalase reaction and inhibition of catalase by cyanide ion », *Thermochim. Acta*, vol. 360, n° 2, p. 141-146, sept. 2000.
- [127] L. Mazzei, S. Ciurli, et B. Zambelli, « Hot Biological Catalysis: Isothermal Titration Calorimetry to Characterize Enzymatic Reactions », *J. Vis. Exp.*, n° 86, avr. 2014.
- [128] M. Andújar-Sánchez, F. J. Heras-Vázquez, J. M. Clemente-Jiménez, S. Martínez-Rodríguez, A. Camara-Artigas, F. Rodríguez-Vico, et V. Jara-Pérez, « Enzymatic activity assay of d-hydantoinase by isothermal titration calorimetry. Determination of the thermodynamic activation parameters for the hydrolysis of several substrates », *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 67, n° 1, p. 57-66, avr. 2006.
- [129] M. J. Todd et J. Gomez, « Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? », *Anal. Biochem.*, vol. 296, n° 2, p. 179-187, sept. 2001.
- [130] B. Krajewska, R. van Eldik, et M. Brindell, « Temperature- and pressure-dependent stopped-flow kinetic studies of jack bean urease. Implications for the catalytic mechanism », *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 17, n° 7, p. 1123-1134, oct. 2012.
- [131] B. P. Callahan, Y. Yuan, et R. Wolfenden, « The Burden Borne by Urease », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n° 31, p. 10828-10829, août 2005.
- [132] P. E. Morin et E. Freire, « Direct calorimetric analysis of the enzymic activity of yeast cytochrome c oxidase », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 30, n° 34, p. 8494-8500, août 1991.
- [133] I.-M. Krokeide, V. G. H. Eijsink, et M. Sørli, « Enzyme assay for chitinase catalyzed hydrolysis of tetra-N-acetylchitotetraose by isothermal titration calorimetry », *Thermochim. Acta*, vol. 454, n° 2, p. 144-146, mars 2007.
- [134] « GEN | Magazine Articles: Using Isothermal Titration Calorimetry », *GEN*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.genengnews.com/gen-articles/using-isothermal-titration-calorimetry/1622/>. [Consulté le: 06-oct-2014].
- [135] S. N. Olsen, « Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions », *Thermochim. Acta*, vol. 448, n° 1, p. 12-18, sept. 2006.
- [136] A. Kaji, K. A. Trayser, et S. P. Colowick, « Multiple Forms of Yeast Hexokinase », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 94, n° 3, p. 798-811, nov. 1961.
- [137] H. J. Fromm et V. Zewe, « Kinetic Studies of Yeast Hexokinase », *J. Biol. Chem.*, vol. 237, n° 10, p. 3027-3032, oct. 1962.
- [138] F. J. Castillo-Yáñez, R. Pacheco-Aguilar, F. L. García-Carreño, et M. de L. A. Navarrete-Del Toro, « Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea* », *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 140, n° 1, p. 91-98, janv. 2005.
- [139] L. Murphy, M. J. Baumann, K. Borch, M. Sweeney, et P. Westh, « An enzymatic signal amplification system for calorimetric studies of cellobiohydrolases », *Anal. Biochem.*, vol. 404, n° 2, p. 140-148, sept. 2010.
- [140] M. Chauve, « Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulosiques. Influence de la structure et morphologie du substrat », phdthesis, Université de Grenoble, 2011.
- [141] G. L. Miller, « Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar », *Anal. Chem.*, vol. 31, n° 3, p. 426-428, mars 1959.

Références bibliographiques

- [142] « Zymaflore 011 Bio ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.laffort.com/produits/levures-zymaflore/495>. [Consulté le: 14-nov-2014].
- [143] M. Bey, J.-G. Berrin, L. Poidevin, et J.-C. Sigoillot, « Heterologous expression of *Pycnoporus cinnabarinus* cellobiose dehydrogenase in *Pichia pastoris* and involvement in saccharification processes », *Microb. Cell Factories*, vol. 10, n° 1, p. 113, déc. 2011.
- [144] P. Trinder, « Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen », *J. Clin. Pathol.*, vol. 22, n° 2, p. 158-161, mars 1969.
- [145] J.-H. FERRASSE, « DEVELOPPEMENT D'OUTILS EXPERIMENTAUX POUR LE DIMENSIONNEMENT DE PROCEDES DE SECHAGE CONDUCTIF AVEC AGITATION (APPLICATION A DES BOUES DE STATIONS D'EPURATION URBAINES) », 2000. .
- [146] Y. B. Tewari et R. N. Goldberg, « Thermodynamics of hydrolysis of disaccharides. Cellobiose, gentiobiose, isomaltose, and maltose », *J. Biol. Chem.*, vol. 264, n° 7, p. 3966-3971, mars 1989.
- [147] L. Murphy, K. Borch, K. C. McFarland, C. Bohlin, et P. Westh, « A calorimetric assay for enzymatic saccharification of biomass », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 46, n° 2, p. 141-146, févr. 2010.
- [148] R. H. Garrett et C. M. Grisham, *Biochimie*. De Boeck Supérieur, 2000.
- [149] J. C. Jungers, L. Sajus, I. F. de Aguirre, et D. Decroocq, *L'Analyse cinétique de transformation chimique: Tome 2*. Editions TECHNIP, 1968.
- [150] J. K. Ko, E. Ximenes, Y. Kim, et M. R. Ladisch, « Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, n° 3, p. 447-456, mars 2015.
- [151] F. Guo, W. Shi, W. Sun, X. Li, F. Wang, J. Zhao, et Y. Qu, « Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism », *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, p. 38, 2014.
- [152] D. Robert et B. Vian, *Éléments de biologie cellulaire*. Wolters Kluwer France, 2004.
- [153] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition*. CRC Press, 2003.
- [154] N. Colette, *L'œnologie (7e ed.)*. Lavoisier, 2010.
- [155] L. Fährasmane et B. Ganou-Parfait, *De la canne au rhum*. Editions Quae, 1997.
- [156] J. A. Barnett, « A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880 », *Yeast*, vol. 16, n° 8, p. 755-771, juin 2000.
- [157] V. Haurie, *Contribution de la voie Snf1p aux changements d'expression du génome associés à la transition diauxique chez Saccharomyces cerevisiae*. Santé : Bordeaux 2 : 2002, 2002.
- [158] J. A. Barnett et K.-D. Entian, « A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism », *Yeast Chichester Engl.*, vol. 22, n° 11, p. 835-894, août 2005.