



HAL
open science

Optimisation d'une hydrolyse enzymatique dans le processus de transformation de matériel ligno-cellulosique en bioéthanol

Thibaud Sauvageon

► **To cite this version:**

Thibaud Sauvageon. Optimisation d'une hydrolyse enzymatique dans le processus de transformation de matériel ligno-cellulosique en bioéthanol. Sciences de l'ingénieur [physics]. 2012. hal-01873217

HAL Id: hal-01873217

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01873217>

Submitted on 13 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Projet de Fin d'Etudes

(ENSTIB3)

- PROMOTION 2012 -

**Optimisation d'une hydrolyse enzymatique dans
le processus de transformation de matériel
ligno-cellulosique en bioéthanol.**



Thibaud SAUVAGEON

2011 / 2012

Enseignant responsable à l'Université du Chili : René CARMONA CERDA

Enseignant responsable à l'ENSTIB : Emmanuel FREDON

*« Lo que puede el sentimiento, no lo ha podido el saber, ni el
mas claro proceder, ni el mas ancho pensamiento. »*

Violeta Parra

A Marianita.

AVANT PROPOS

Je souhaite plus que tout remercier très chaleureusement tous les acteurs de la Faculté des Sciences Forestières et de la Conservation de la Nature de l'Université du Chili. Elèves, professeurs et personnels m'ont offert un accueil très chaud et humain.

Merci particulièrement à René CARMONA pour m'avoir guidé tout au long de ce projet et pour la relation amicale qu'il a su instaurer. Merci également à Consuelo FRITZ pour le temps qu'elle m'a consacré dans le cadre de ce projet.

Merci à Tomas KARSULOVIC et Rose Marie GARAY pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans de lourdes démarches administratives imprévues.

Merci à Ricardo SILVA pour sa constante sympathie et bonne humeur.

Un grand merci à Adrian ROQUETTE pour avoir été un compagnon de voyage d'exception. Merci également à tous les amis et compagnons avec qui j'ai eu la chance de partager ce semestre qui restera un moment fort dans ma vie étudiante.

Merci aux résidents du Nativo Homestay, Pancho et Panchon, pour cette immersion totale dans la culture chilienne.

Enfin, merci à la colocation des « 3 P'tits Cochons » (Max, Toto et Ugo) pour leur accueil à mon retour sur Epinal.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	4
- PARTIE 1 - REVISION BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. LES BIOCOMBUSTIBLES	5
2. LA BIOMASSE	6
2.1. <i>Types de biomasse</i>	6
2.2. <i>Avantages de l'utilisation de biomasse</i>	7
3. LA BIOMASSE LIGNO-CELLULOSIQUE.....	7
3.1. <i>Les polysaccharides</i>	8
3.2. <i>La lignine</i>	9
3.3. <i>Les extractibles</i>	11
3.4. <i>Les cendres</i>	11
4. ENERGIE PROVENANT DE LA BIOMASSE	11
5. L'ETHANOL	12
6. PRETRAITEMENTS DE LA BIOMASSE LIGNO-CELLULOSIQUE.....	14
7. CHAMPIGNONS DE POURRITURE BLANCHE.....	16
8. L'HYDROLYSE.....	17
8.1. <i>L'hydrolyse acide</i>	18
8.2. <i>L'hydrolyse enzymatique</i>	19
- PARTIE 2 - MATERIEL ET METHODE.	21
1. INTRODUCTION : OBJECTIFS DE L'ETUDE.	21
1.1. <i>Objectif général</i>	21
1.2. <i>Objectifs spécifiques</i>	21
2. MATERIEL	22
2.1. <i>Substrats</i>	22
2.2. <i>Prétraitement</i>	22
2.3. <i>Enzymes</i>	23
2.4. <i>Réactifs</i>	23
2.5. <i>Equipement et matériel de laboratoire</i>	24
3. METHODE.....	24
3.1. <i>L'hydrolyse enzymatique</i>	24
3.1.1. <i>Principe de l'hydrolyse</i>	24
3.1.2. <i>Définition des variables</i>	25
3.2. <i>Détermination de la quantité de sucres réducteurs</i>	27
3.3. <i>Détermination de la quantité de glucoses</i>	29

INTRODUCTION

- PARTIE 3 - PRESENTATION ET ANALYSE DES RESULTATS.....	30
1. SUCRES REDUCTEURS.....	30
1.1. <i>Groupe A</i>	30
1.2. <i>Groupe B</i>	32
1.3. <i>Groupe C</i>	33
1.4. <i>Groupe D</i>	34
1.5. <i>Groupe E</i>	35
1.6. <i>Groupe F</i>	36
2. GLUCOSE.....	37
2.1. <i>Groupe A</i>	37
2.2. <i>Groupe B</i>	38
2.3. <i>Groupe C</i>	38
2.4. <i>Groupe D</i>	39
2.5. <i>Groupe E</i>	40
2.6. <i>Groupe F</i>	41
3. CONCLUSIONS.....	42
CONCLUSION PERSONNELLE.....	43
BIBLIOGRAPHIE.....	44
ANNEXES.....	46
RESUMÉ.....	52
ABSTRACT.....	53

INTRODUCTION

Le Chili a une dépendance énergétique très importante. 75% de son énergie est produite par des combustibles liquides dont les 98% sont constitués de pétrole importé (ODEPA, 2007). Ajoutés à cela l'épuisement prochain des gisements de pétrole et une dimension écologique grandissante, il est primordial pour ce pays de multiplier ses sources énergétiques.

Mon projet s'inscrit donc dans le cadre du projet BIOCOMSA (<http://www.consorcibiocomsa.cl/esp>), un projet subventionné par le gouvernement chilien impliquant le pôle recherche de l'Université du Chili et ayant pour but d'étudier en profondeur la faisabilité de la production de biocombustibles à partir de biomasse ligno-cellulosique à l'échelle nationale.

Ainsi, de très nombreux chercheurs spécialisés dans des domaines variés (économie, foresterie, chimie, biologie...) travaillent actuellement sur ce sujet. Mon projet traite d'une très infime partie de ce vaste projet.

Des échantillons prétraités suivant des résultats obtenus par un chercheur de l'Université du Chili m'ont été confiés dans le but d'optimiser l'hydrolyse enzymatique menant leur transformation en sucres. Ces sucres seront par la suite fermentés pour obtenir du bioéthanol.

- PARTIE 1 - REVISION BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES BIOCOMBUSTIBLES

On entend par biocombustible tout combustible dérivé de la biomasse végétale ou animale, ayant pour caractéristique commune avec les combustibles fossiles de s'utiliser dans des moteurs sans nécessiter de modifications importantes sur ceux-là. Ils possèdent l'avantage de ne pas contenir de soufre, une des causes principales des pluies acides, et ils ne contribuent pas à l'augmentation des émissions de CO₂ dans l'atmosphère. (Oliva, 2003).

La production de biocombustibles liquides semble être une bonne solution de remplacement des combustibles fossiles dont les prix ne cessent d'augmenter en raison de la crise énergétique globale, et dont l'épuisement des réserves est imminent (Oliva, 2003).

Diminuer notre dépendance envers les produits dérivés du pétrole et assurer un approvisionnement énergétique constant sont les principaux prérequis pour entrer dans une démarche de développement durable dans les secteurs des transports et de l'industrie. Les biocombustibles liquides s'annoncent donc être une alternative intéressante pour combler ces exigences et diversifier la matrice énergétique (Mateos, 2001).

D'autre part, au Chili, la production de biocombustibles est vue comme une nouvelle alternative pour les terres agricoles abandonnées. Celles-ci peuvent ainsi être reconverties en cultures agricoles ou en plantations forestières, créant dans ce même temps des emplois dans les secteurs de l'agriculture, de l'industrie et des services, principalement en zones rurales (Oliva, 2003).

Actuellement, les biocombustibles liquides sont obtenus majoritairement à partir de produits agricoles qui sont produits par le secteur alimentaire, sur des terres sujettes à des forces socio-économiques différentes de celles régissant le secteur de l'énergie (Oliva, 2003).

On peut différencier deux types de biocombustibles liquides dans le secteur des transports (Ballesteros, 2001) :

Le biodiesel : Les huiles végétales peuvent être obtenues tant à partir de micro algues que de plantes oléagineuses telles que le soja, le colza ou le tournesol. Elles peuvent être

utilisées à l'état brut sans être raffinées, ou modifiées (au moyen de processus chimiques) en esters méthyliques ou éthyliques (biodiesel). On les utilise dans les moteurs diesel à la place du carburant, ou mélangé à celui-là (Ballesteros, 2001).

Le bioéthanol : L'alcool éthylique, ou bioéthanol, obtenu par fermentation de matières premières riches en sucres, peut être utilisé en remplacement de l'essence dans les moteurs, ou mélangé à l'essence pour cette même utilisation (Ballesteros, 2001).

2. LA BIOMASSE

D'un point de vue énergétique, la biomasse est définie comme étant l'ensemble des matières organiques renouvelables, provenant directement d'un processus biologique. Les sources de biomasse utilisée dans la production d'énergie sont très variées : résidus de l'industrie forestière et de l'agriculture, plantations dendro-énergétiques, déchets produits par l'homme... (Royo, 2003).

2.1. Types de biomasse

Les différents types de biomasse peuvent être classifiés en fonction de leur origine :

- La biomasse naturelle : Produite par les écosystèmes naturels, elle est la principale source d'énergie des pays en voie de développement. Cependant, ce n'est pas la plus adéquate pour l'exploitation massive de l'énergie, et son utilisation peut provoquer une dégradation accélérée des écosystèmes.
- Les cultures énergétiques : Il s'agit de cultures dédiées uniquement à la production d'énergie, et non à des fins alimentaires. Dans cette catégorie, on peut en différencier deux types. Les cultures à croissance rapide, comme l'eucalyptus ou le peuplier, ou les cultures d'espèces végétales annuelles, comme le cardon cynara (Ballesteros, 2001).
- La biomasse résiduelle : Elle est générée par les résidus des processus de production agricole, forestière et industrielle. Ce type de biomasse est détaillé dans la Figure 1.

Sources de biomasse	Types de résidus
Résidus forestiers	Résidus liés au sciage : écorce, sciure, nœuds... Résidus de l'ébenisterie : sciure, copeaux... Résidus de plantations : feuilles, aiguilles, branches, écorce, racines...
Résidus agricoles	Coquilles, noyaux et pulpes de fruits et végétaux. Coquille et poudre de grains secs (riz, café...) Arbres fruitiers et vignes qui ne produisent plus. Fumier. Résidus de récoltes : tiges, feuilles, coquilles...
Résidus industriels	Résidus de traitement de pulpe de fruits. Résidus de production de viande. Eaux de rinçage et de cuisson de viandes et végétaux. Graisses et huiles végétales.
Résidus urbains	Eaux usées. Ordures domestiques organiques. Déchets organiques (bois, déchets alimentaires).

Figure 1 : Classification de la biomasse résiduelle. Source : élaboration personnelle et FOCER (2002)

2.2. Avantages de l'utilisation de biomasse

Les principaux avantages que présente l'utilisation de biomasse pour la production d'énergie sont d'ordre environnemental. En effet, elle permet de réduire les émissions de CO₂ et SO₂ dans l'atmosphère en revalorisant les déchets. De plus, d'un point de vue socioéconomique, l'utilisation de biomasse peut générer des emplois en zones rurales et éviter l'abandon de terres agricoles.

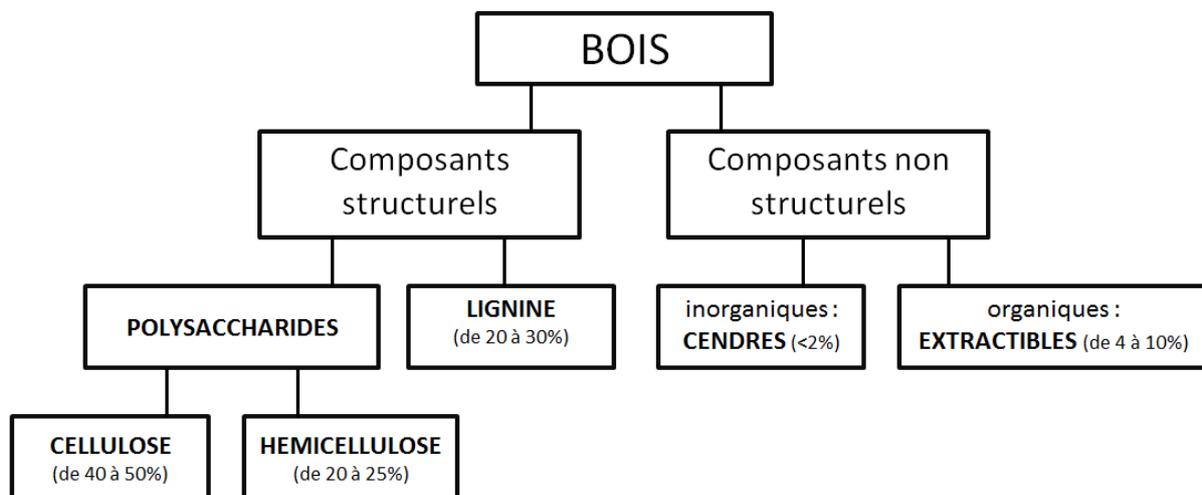
3. LA BIOMASSE LIGNO-CELLULOSIQUE

Le terme de « biomasse » regroupe tous les types de matière organique provenant d'un processus biologique. Dans ce sens, la formation de biomasse végétale est due au processus de photosynthèse qui forme des structures de haut contenu énergétique.

Les forêts représentent approximativement 27% de la superficie terrestre, faisant du bois le principal produit extrait, avec une consommation mondiale d'environ 3.500

millions de mètres cubes par an (augmentation de 65% depuis 1960). Plus de la moitié de cette consommation de bois est utilisée comme combustible, le reste étant utilisé dans la production de cellulose et de papier, comme matériau de construction, ou autres (Martinez, et al., 2005).

Un des problèmes inhérents à l'utilisation de biomasse ligno-cellulosique est sa structure complexe. Le matériel ligno-cellulosique est composé essentiellement de trois composants : les polysaccharides, la lignine, et les extractibles.



Les pourcentages sont exprimés ici en fonction de la masse totale de bois sec et ne sont présentés qu'à titre indicatif.

Figure 2 : Composition chimique du bois. Source : Cours de Chimie du Bois, René CARMONA (CFCN, Universidad de Chile)

3.1. Les polysaccharides

Les polysaccharides comportent des structures de haut poids moléculaire et représentent environ de 60 à 80% du matériel ligno-cellulosique. Les polysaccharides sont composés de la cellulose et de l'hémicellulose (Negro, 1991).

La cellulose est la substance naturelle la plus importante produite par des organismes vivants. Ce polymère composé exclusivement d'unités de glucose anhydre, elle est le principal composant du bois (entre 40 et 50% de la masse sèche des plantes ligneuses)

(Sjöström, 1993). On la rencontre généralement dans la paroi cellulaire des fibres de bois, principalement dans la paroi secondaire, où elle remplit sa fonction de composant structurel (Kirk, T & Cullen, D, 1998).

Tous les modèles de structure fibrillaire de la cellulose proposés coïncident en mentionnant l'existence de régions cristallines, avec un haut degré d'ordre, et de régions amorphes, beaucoup moins ordonnées (Macarron, 1992).

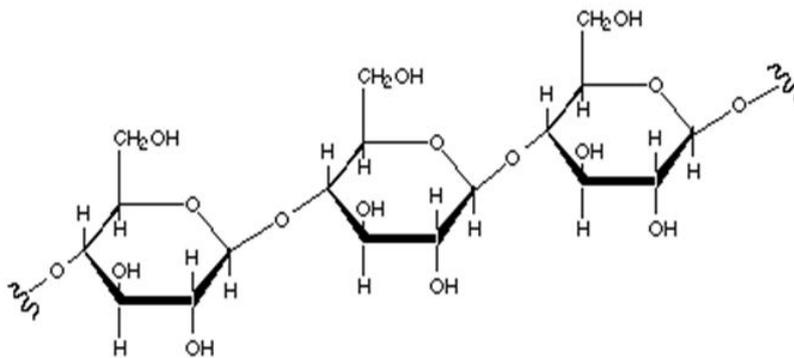


Figure 3 : Structure de la cellulose. Source : Cours de Chimie du Bois, René CARMONA (CFCN, Universidad de Chile)

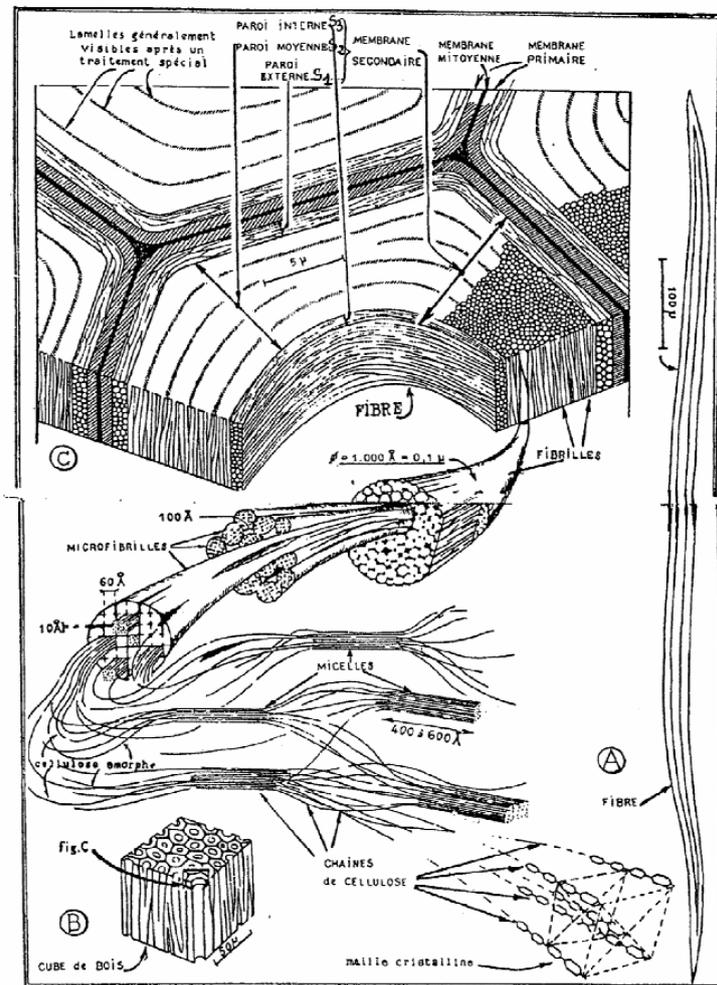
Les hémicelluloses sont composées de petites chaînes de polysaccharides dont la fonction principale est d'assurer l'union entre la lignine et la cellulose. A l'état naturel, les hémicelluloses se rencontrent sous forme amorphe. La composition des hémicelluloses varie en fonction de son origine. En plus du glucose, les monomères de l'hémicellulose peuvent être du xylose, du mannose, du galactose, du rhamnose, ou de l'arabinose (Negro, 1991).

3.2. La lignine

La lignine est un des principaux composants de la matière végétale. Elle représente de 20 à 30% de la masse sèche du bois. La majorité de la lignine se trouve dans la lamelle moyenne, mélangée avec les hémicelluloses et formant une matrice assurant la liaison des microfibrilles de cellulose (voir figure 4). Elle offre protection et résistance aux plantes, en évitant à la cellulose et aux hémicelluloses une exposition à l'hydrolyse enzymatique

- PARTIE 1 - REVISION BIBLIOGRAPHIQUE

microbienne (Fengel, D & Wegener, G, 1984). En raison de ses caractéristiques structurales, la lignine présente une bonne résistance à la biodégradation. Ses types de liaisons covalentes et son hétérogénéité font que la lignine ne peut pas être dégradée par des mécanismes classiques d'hydrolyse. En effet, quelle que soit l'enzyme ou le groupe d'enzyme souhaitant s'attaquer à la lignine, elle doit être extracellulaire, non hydrolytique et suffisamment non spécifique (Davila, G & Vasquez-Duhalt, R, 2001).



A, fibre entière ; B, cube de bois montrant les relations des fibres entre elles ; C, portion de la figure B, montrant à un fort grossissement le détail des parois avec, dans le schéma perspectif, la structure des fibrilles, microfibrilles, micelles, mailles micellaires, et chaînes cellulosiques.

Figure 4 : Structure fine de la paroi d'une fibre. Source : (TROUY-TRIBOULOT, 2012)

3.3. Les extractibles

Les extractibles ne font pas partie de la structure de la paroi végétale et sont en général solubles dans des solvants neutres. Ils représentent entre 4 et 10% du poids sec du bois et contiennent une très grande variété de composés organiques : cires, graisses, alcaloïdes, protéines, phénols simples et complexes, sucres simples, pectines, résines, gommes, terpènes, etc. Ils agissent comme intermédiaires métaboliques, réserves d'énergie, ou entrent en jeu dans les mécanismes de défense contre les attaques biologiques. Les extractibles sont également connus pour donner au bois son odeur, sa couleur, et une partie de sa résistance (Oliva, 2003).

3.4. Les cendres

Les cendres sont les résidus inorganiques qui subsistent après la combustion de la biomasse à haute température (Calcium, Potassium, Sodium, Magnésium, Fer...). Elles représentent moins de 2% de la masse sèche du bois (Oliva, 2003). Elles ne font pas partie du matériel ligno-cellulosique.

4. ENERGIE PROVENANT DE LA BIOMASSE

Depuis l'antiquité, l'Homme utilise la biomasse comme source d'énergie renouvelable. Depuis la découverte de l'utilisation du feu, la forme la plus commune d'utiliser l'énergie de la biomasse a été la combustion directe, dans le but d'utiliser cette énergie pour le chauffage, la cuisine, ou encore la production de vapeur et d'électricité. Cependant, les avancées technologiques ont permis le développement de procédés de transformation de biomasse en énergie plus efficaces et durables, comme par exemple l'obtention par des moyens biochimiques de combustibles liquides ou gazeux, beaucoup plus pratiques et efficaces (FOCER, 2002).

Les procédés biochimiques utilisent les caractéristiques biochimiques de la biomasse et l'action métabolique de microorganismes pour la production de combustibles liquides et gazeux. Les procédés biochimiques sont plus appropriés à la conversion de biomasse humide que d'autres procédés, comme les procédés thermochimiques par exemple. Parmi

les produits obtenus par des procédés biochimiques, on peut citer le biogaz, le biodiesel, ou encore les combustibles alcooliques (FOCER, 2002) :

- La digestion anaérobie de la biomasse humide par les bactéries produit un type de gaz combustible connu comme biogaz. Dans ce procédé, la biomasse est déposée dans un digesteur, lequel a pour fonction de faire fermenter la biomasse. On obtient après quelques jours un mélange de méthane et de dioxyde de carbone. Les digesteurs sont utilisés dans certains pays orientaux en usage domestique (FOCER, 2002).
- Le biodiesel se compose d'acides gras et d'esters alcalins, obtenus à partir d'huiles végétales, de graisses animales et de graisses recyclées. On l'obtient grâce à un processus appelé transestérification, où les huiles sont combinées avec de l'alcool (éthanol ou méthanol) et s'altèrent chimiquement pour former des acides gras. Le biodiesel peut être mélangé avec du diesel (en général on en met 20%) ou utilisé directement comme combustible dans un moteur classique (FOCER, 2002).
- Les combustibles alcooliques pouvant être obtenus à partir de la biomasse sont le méthanol, l'éthanol et le butanol. Le méthanol est produit par la fermentation des sucres. Cette technologie a de nombreux siècles d'utilisation derrière elle. Maintenant, l'obtention de combustibles alcooliques est perçue comme une alternative potentielle à l'utilisation des combustibles fossiles (FOCER, 2002).

5. L'ETHANOL

De la biomasse, on peut obtenir différents types de produits pour la génération d'énergie. Un des plus importants est l'éthanol. Il est utilisé comme combustible liquide principalement dans des pays comme le Brésil, les Etats-Unis d'Amérique ou encore la Suède (Ballesteros, 2001).

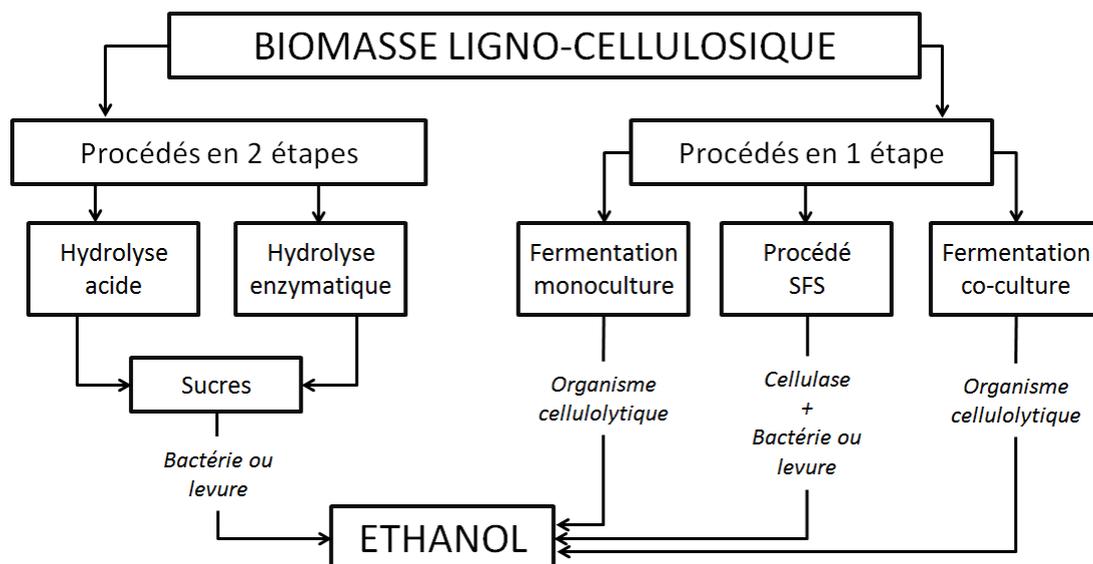
Le bioéthanol s'obtient par fermentation de matières premières sucrées avec un degré d'alcool initial de 10 à 15% pouvant être concentrées plus tard par distillation, jusqu'à obtention d'alcool hydraté. Ensuite, par un procédé spécial de déshydratation on obtient de l'alcool pur. Les matières premières que l'on utilise pour produire du bioéthanol doivent être des produits hydrocarbonés de faible coût, susceptibles de fermenter

- PARTIE 1 - REVISION BIBLIOGRAPHIQUE

directement ou par un procédé d'hydrolyse (Mateos, 2001). Le bioéthanol utilisé de nos jours est principalement produit à partir de canne à sucre et d'amidon de maïs. Cependant, l'extraction biomasse ligno-cellulosique à partir d'autres types de plante est à l'essai, par exemple en Suède, au Canada et en Espagne. Le processus d'obtention de l'éthanol à partir de biomasse ligno-cellulosique est plus complexe que son obtention à partir de sucre et d'amidon, bien que cette matière première ait un coût plus faible. Un meilleur rendement, une plus faible demande d'énergie et l'utilisation d'enzymes plus efficaces provoquent directement une baisse de ce coût. La recherche scientifique œuvre actuellement en ce sens (Öhgren, K, Vehmaanpera, J, Siika-Aho, M, Galbe, M, Viikari, L, & Zacchi, G, 2006).

Plusieurs voies sont possibles pour passer du matériel ligno-cellulosique au bioéthanol. Ces différents procédés, mis en œuvres après un prétraitement de la matière première, peuvent être classés en deux groupes :

- Les procédés en deux étapes : On réalise d'abord une hydrolyse chimique ou enzymatique des sucres fermentables, à la suite de quoi on transforme ces sucres en éthanol grâce à des microorganismes, comme les levures.
- Les procédés en une étape : L'hydrolyse et la fermentation se réalisent en une seule étape (Mateos, 2001).



(Procédé SFS : Saccharification et Fermentation Simultanées)

Figure 5 : Types de procédés de transformation de la biomasse ligno-cellulosique en éthanol.

Source : Mateos, 2001

Parmi les technologies qui existent pour transformer de la biomasse en bioéthanol, celles basées sur une hydrolyse enzymatique sont les plus prometteuses, en raison des bons rendements potentiels. Bien que les procédés d'hydrolyse enzymatique soient relativement récents, la dernière décennie a vu naître de bons résultats dans ce domaine. Cependant, il existe toujours la possibilité d'apporter des innovations permettant d'optimiser le rendement, la productivité et de diminuer les coûts énergétiques (Oliva, 2003).

Malheureusement, la structure complexe de la biomasse ligno-cellulosique rend l'hydrolyse compliquée, en comparaison avec l'hydrolyse de l'amidon ou du sucre. Pour cela, un prétraitement est indispensable. Pour obtenir un bon rendement en éthanol, les prétraitements doivent rendre la cellulose plus accessible aux enzymes, sans dégrader les sucres. Il est donc important de privilégier des prétraitements qui augmentent le rendement de sucres fermentables et qui limitent les produits de dégradation (Sun & Cheng, J, 2002).

6. PRETRAITEMENTS DE LA BIOMASSE LIGNO-CELLULOSIQUE

Le procédé de production d'éthanol débute par un prétraitement du matériel ligno-cellulosique ayant pour but de diminuer le degré de cristallinité de la cellulose et augmenter le pourcentage de cellulose amorphe, laquelle est plus sensible à l'hydrolyse. Le processus d'hydrolyse se charge ensuite de rompre les polymères de cellulose et les met sous formes de monomères, pour être ensuite transformés en éthanol par fermentation (Sanchez, O & Cardona, C, 2005).

Pour être valables, les prétraitements doivent répondre à une série de conditions. Ils doivent par exemple consommer peu d'énergie, avoir un coût financier assez faible, utiliser des réactifs facilement récupérables, et doivent également d'appliquer aisément à plusieurs substrats différents (Sanchez, O & Cardona, C, 2005).

Les prétraitements sont absolument indispensables pour l'obtention d'éthanol à partir de matériel ligno-cellulosique, car ils augmentent de manière considérable les rendements de l'hydrolyse de la cellulose. Certaines études indiquent que ces rendements

- PARTIE 1 - REVISION BIBLIOGRAPHIQUE

peuvent augmenter de 20%, jusqu'à des valeurs théoriques supérieures à 90% (Sun & Cheng, J, 2002).

La Figure 6 détaille les types de prétraitement les plus utilisés.

Types de prétraitements			
Physiques	Physico-chimiques	Chimiques	Biologiques
Trituration mécanique	Explosion à vapeur	Traitement à l'eau chaude	Traitement avec des mycètes
Radiation de haute énergie	Explosion à vapeur avec de l'ammoniac	Oxydation humide	
	Explosion au CO ₂	Traitement à l'ozone	
		Hydrolyse à l'alcali	
		Traitement avec des solvants organiques	
		Traitement à l'acide dilué	

Figure 6 : Types de prétraitements. Source : Élaboration personnelle, et (Sanchez, O & Cardona, C, 2005)

Dans le cas des prétraitements biologiques, le matériel ligno-cellulosique est soumis à l'action de champignons de pourriture blanche, brune ou molle. Les champignons de pourriture blanche attaquent la lignine et les hémicelluloses, aidant ainsi à supprimer les barrières qui protègent la cellulose, et rendant ainsi plus facile l'accès des enzymes dans le processus d'hydrolyse (Fan, L, Gharpuray, M, & Lee, Y, 1987).

Les avantages que présente le prétraitement biologique sont le bas coût énergétique et le faible impact sur l'environnement. Comme inconvénient, on note que ce prétraitement est lent, ce qui augmente le coût du procédé (Hamelinck, C, Hooijdonk, G, & Faaij, A, 2003).

7. CHAMPIGNONS DE POURRITURE BLANCHE

On appelle champignons de pourriture blanche des organismes s'alimentant de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine en décomposant leurs molécules. Le nom de « pourriture blanche » provient du fait que le bois attaqué par celle-ci prend une couleur blanche (voir Figure 7).



Figure 7 : Agents de pourriture blanche ou fibreuse (Basidiomycètes à action ligninolytique puis cellulolytique). Source : (TROUY-TRIBOULOT, 2012)

Cette couleur blanche provient du fait que ce type de champignon attaque en premier lieu la lignine. La lignine donnant sa couleur au bois, les autres composants apparaissent donc plus pâles. Après une telle attaque, le bois a une teneur en cellulose plus importante, présente un aspect fibreux et a une densité moindre (Akhtar, Blanchette, R, & Kent, T, 1997).

Les champignons de pourriture blanche appartiennent à une catégorie de champignons appelés *Basidiomycètes*. La principale caractéristique de ces champignons est leur capacité à attaquer tous les composants de la paroi cellulaire, réalisant des attaques sur les polysaccharides et la lignine. Cependant, certains champignons ont la particularité de dégrader la lignine en beaucoup plus grandes proportions, ce qui en fait des champignons intéressants pour les procédés industriels où la lignine est vue comme un composé phénolique devant être modifié ou éliminé (Micales, 2001).

Les agents de pourriture blanches s'attaquent autant aux bois de conifères qu'aux bois de feuillus. Les hyphes du champignon s'introduisent dans le lumen de chaque cellule, colonisant en premier lieu les cellules des rayons de parenchyme, pour ensuite s'étendre à travers les ponctuations et perforations de la paroi cellulaire. Le processus de dégradation de la paroi de la cellule débute aussitôt que sont épuisés les nutriments facilement métabolisables (Kuhad, Singh, A, & Eriksson, K, 1997).

8. L'HYDROLYSE

L'hydrolyse est un procédé dans lequel la cellulose est fractionnée dans le but d'obtenir des monomères de sucres élémentaires (principalement des glucoses, et quelques pentoses) (Negro, 1991).

L'ensemble des sucres obtenus par hydrolyse peuvent être utilisés dans différents procédés industriels. Raffinés, ils peuvent être destinés à l'industrie alimentaire en produisant des fructoses grâce à un processus d'isomérisation, ou utilisés comme substrats dans des processus de fermentation pour produire de l'éthanol, de la biomasse microbienne, des bio-polymères, du butanol, ou encore de l'acétone (Macarron, 1992).

Il existe deux grands types d'hydrolyse : l'hydrolyse acide et l'hydrolyse enzymatique. La plus communément utilisée est l'hydrolyse acide, dans laquelle, en théorie, n'importe quel acide pourrait être utilisé (Badger, 2002).

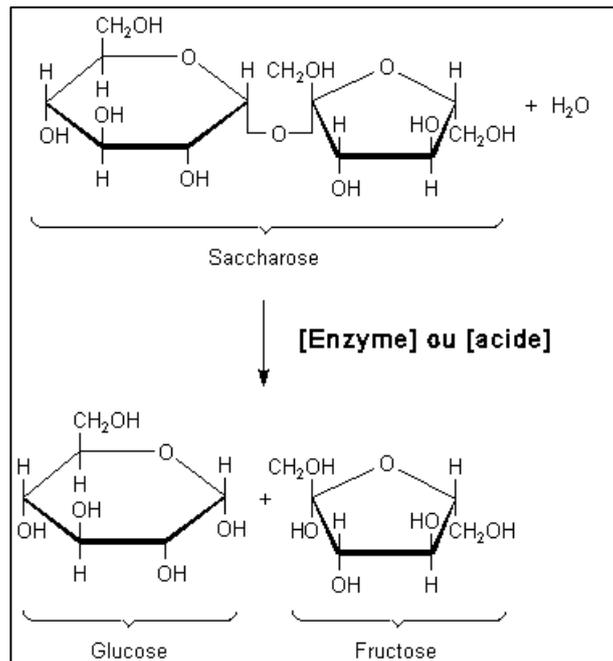


Figure 7 : Réaction d'hydrolyse. Source : Cours de Chimie du Bois, René CARMONA (CFCN, Universidad de Chile)

8.1. L'hydrolyse acide

Selon Oliva (2003), l'hydrolyse acide est le procédé le plus étudié dans le cadre de la production d'éthanol. Déjà connu dans les années 1820, il a connu une explosion durant la Seconde Guerre Mondiale, période durant laquelle la pénurie de pétrole a forcé la production d'éthanol à partir du bois.

L'hydrolyse acide consiste en une réaction chimique utilisant des catalyseurs acides comme l'acide chlorhydrique, sulfurique, phosphorique, nitrique ou formique, les acides chlorhydrique et sulfurique étant les seuls à être utilisés à échelle industrielle. Bien que ces acides soient des agents puissants pour hydrolyser la cellulose, leur toxicité et leur corrosivité les rendent dangereux et obligent à utiliser des réacteurs fortement résistants à la corrosion. De plus, les acides doivent être récupérés à la fin de la réaction pour que le procédé soit plus viable d'un point de vue environnemental et économique (Romano, S, Gonzales, E, & Laborde, M, 2005).

On note que deux types d'hydrolyse acide existent : l'hydrolyse acide diluée et l'hydrolyse acide concentrée (Negro, 1991).

8.2. L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est une réaction catalysée par un ensemble d'enzymes, typiquement appelées cellulases, produites par des champignons ou des bactéries. Ces enzymes dégradent la cellulose, détruisant ses chaînes complexes en monomères simples. Les cellulases de type fongique sont les plus étudiées, en raison de la capacité qu'ont ces organismes à générer des enzymes en grande quantité.

Contrairement à l'hydrolyse acide, l'hydrolyse enzymatique est spécifique. Les enzymes, appelées hydrolases attaquent donc spécifiquement certaines liaisons d'une molécule. Dans l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, trois types d'hydrolases entrent en jeu (Montenecourt, B & Eveleigh, D, 1979) :

- La *β -glucosidase* hydrolyse le cellobiose et les cellodextrines en glucose.
- L'*endo- β -glucanase* rompt la cellulose au niveau des zones amorphes, générant ainsi de nouvelles extrémités de chaînes
- L'*exo- β -glucanase* agit sur les extrémités libres des chaînes de cellulose pour libérer du glucose, du cellobiose et des cellodextrines.

Ces trois hydrolases agissent en synergie lors de l'hydrolyse de la cellulose. Cette synergie se résume de la manière suivante : les endoglucanases attaquent les régions amorphes de la cellulose, créant ainsi des espaces pour que les exoglucanases puissent se diriger vers les zones cristallines. Enfin, les β -glucosidases viennent clôturer l'hydrolyse, formant une accumulation de cellobiose qui finit par inhiber les endoglucanases et exoglucanases (Béguin, 1990).

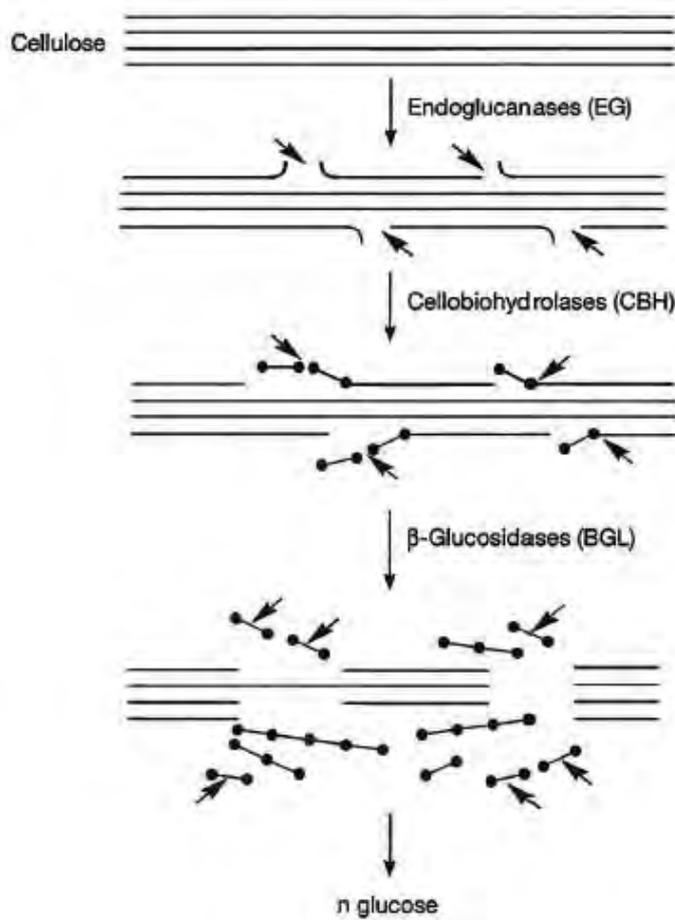


Figure 8 :Mode d'action des cellulases sur les fibrilles de cellulose, source : (Ballerini)

L'hydrolyse enzymatique présente plusieurs avantages par rapport à l'hydrolyse acide : il s'agit d'un procédé respectueux de l'environnement, offrant la possibilité d'atteindre d'assez bons rendements. De plus, son coût est faible, comparé aux procédés acides (Romano, S, Gonzales, E, & Laborde, M, 2005).

- PARTIE 2 - MATERIEL ET METHODE.

1. INTRODUCTION : OBJECTIFS DE L'ETUDE.

1.1. Objectif général

Différents types de substrats ont été prétraités par un chercheur lors d'une étude précédente. Ces substrats sont le Lenga (*Nothofagus pumilio*), le Pin de Monterey (*Pinus radiata*), le maïs et le blé.

Mon objectif est d'optimiser l'hydrolyse enzymatique qui suit le prétraitement dans le but d'obtenir le meilleur rendement possible (voir Figure 8).

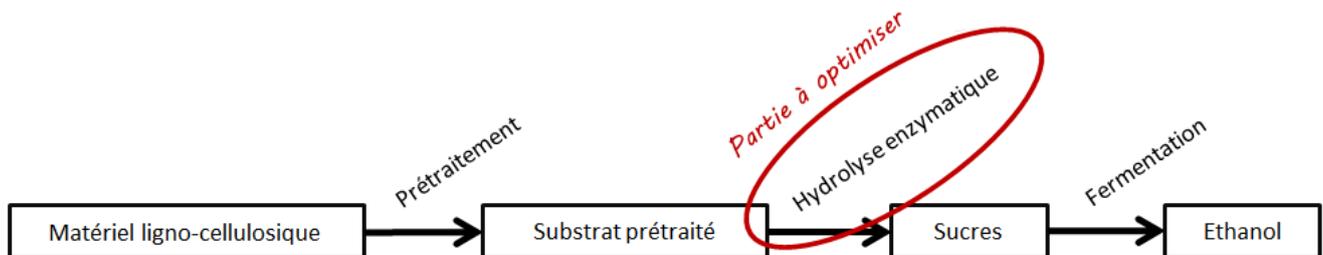


Figure 9 : Processus total de transformation du matériel ligno-cellulosique en éthanol

1.2. Objectifs spécifiques

Définir les variables entrant en jeu dans l'hydrolyse enzymatique pouvant être facilement modifiées.

Les sucres réducteurs produits par l'hydrolyse sont des réactifs pour l'étape de fermentation. Ainsi, meilleur sera le rendement en sucres réducteurs lors de l'hydrolyse, meilleur sera le rendement du processus total. Un objectif est donc de jouer sur les variables choisies pour obtenir le meilleur rendement en sucres réducteurs possible. Il serait également intéressant d'établir une relation générale de cause à effet entre la modification de chaque variable et le rendement de l'hydrolyse.

2. MATERIEL

2.1. Substrats

Quatre types de substrats prétraités ont été mis en ma possession : le Lenga (*Nothofagus pumilio*), aussi appelé « hêtre de la Terre de Feu », le Pin de Monterey (*Pinus radiata*), aussi appelé « Pin insigne », le maïs et le blé.

Ces substrats ont été broyés, et certains ont été prétraités. Tous les substrats ont été broyés avant le prétraitement. Ils ont donc une granulométrie de type « pin-chips » formée par un moulin de la marque Condux Werk®, modèle LHM 20116. Ces particules ont été tamisées, pour finalement n'obtenir que des « pin-chips » correspondant à des particules d'environ 1 mm d'épaisseur, de 1 à 3 mm de largeur et de 5 mm de long (à un pourcentage d'humidité de 11%).

2.2. Prétraitement

Les différents types de substrats qui m'ont été transmis n'ont pas été prétraités de la même manière. On peut ainsi différencier six différents types de substrats :

A : Lenga traité par le *Ganoderma applanatum* sur une durée de 60 jours.

B : Lenga traité par le *Ceriporiopsis subvermispora* sur une durée de 45 jours.

C : Pin de Monterey traité par le *Ceriporiopsis subvermispora* sur une durée de 45 jours.

D : Maïs traité par le *Ganoderma applanatum* sur une durée de 25 jours.

E : Maïs non prétraité

F : Blé non prétraité

2.3. Enzymes

Les enzymes utilisées dans le processus d'hydrolyse enzymatique correspondent à un complexe enzymatique de cellulases agissant en synergie. Voici pour chacun des trois types les enzymes utilisées :

- *β -glucosidase* : (EC 3.2.1.21)
- *Endo- β -glucanase* : β -(1,4)-glucanglucanohydrolase (EC 3.2.1.4.)
- *Exo- β -glucanase* :
 - a) β -(1,4)-glucancelobiohydrolase (EC 3.2.1.91.) Cellobiohydrolase (CBH)
 - b) β -(1,4)-glucanglucanohydrolase (EC 3.2.1.74.) Glucohydrolase (GGH)

Les enzymes ont été achetées au laboratoire SIGMA-ALDRICH® et leurs noms commerciaux sont Celluclast® 1,5L (C2730), cellulase liquide obtenue par fermentation du champignon *Trichoderma reesei*, et Novozyme®188 (C6105), cellulase obtenue par fermentation du microorganisme *Aspergillus niger*.

2.4. Réactifs

La réalisation de l'hydrolyse enzymatique requiert de l'acide acétique et de l'acétate de sodium pour préparer une solution tampon de pH 5.

Pour la mesure des sucres réducteurs, on doit préparer un réactif avec de l'acide dinitrosalicylique (DNS) (voir Annexe 1), en utilisant de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (10,6g), de l'hydroxyde de sodium (19,8g), du sel de Seignette (tartrate double de sodium et de potassium) (306g), du phénol (7,6mL) et du métabisulfite de sodium (8,3g) mélangés à 1416 mL d'eau distillée, bien que la courbe de calibrage se réalise avec du glucose anhydre.

La mesure du glucose est réalisée en utilisant un kit commercial basé sur l'enzyme glucose oxydase peroxydase (provenant du laboratoire RANDOX®), lequel compte deux réactifs : le réactif A, composé de tampon phosphate, 4-aminophenazone, phénol, glucose oxydase, peroxydase, et le réactif B ou standard composé de glucose (voir Annexe 2).

2.5. Equipement et matériel de laboratoire

Les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées au Laboratoire de Biodétérioration et Préservation du Département d'Ingénierie du Bois de l'Université du Chili. Voici la liste des équipements et matériel utilisés lors de la réalisation de ces hydrolyses :

- pH-mètre
- Agitateur-incubateur orbital (« shaker »)
- Tubes Falcon® de 50 mL
- Instruments et matériel de laboratoire courants

La détermination des sucres réducteurs et du glucose a été réalisée au Centre d'Ingénierie Biochimique et de Biotechnologie de la Faculté de Sciences Physiques et Mathématiques de l'Université du Chili. Le matériel utilisé est le suivant :

- Spectrophotomètre Ultrospec®, modèle 3000 (UV-visible)
- Centrifugeuse de tubes Eppendorf®
- Lecteur de microplaques Anthos®, modèle 2010
- Instruments et matériel de laboratoire courant

3. METHODE

3.1. L'hydrolyse enzymatique

3.1.1. Principe de l'hydrolyse

L'hydrolyse enzymatique est réalisée sur les « pin-chips ». Pour cela, on sèche les substrats dans une étuve à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durant 24 heures. On profite de cette opération pour déterminer l'humidité des substrats avant séchage, grâce à l'équation 1 :

$$H(\%) = \frac{(m_H - m_0)}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

- PARTIE 2 - MATERIEL ET METHODE.

Les solutions enzyme-substrat se préparent à 10% (masse/volume) de « pin-chips » sèches où l'on applique une charge enzymatique totale correspondant à 25 FPIU/g sec de « pin-chips », en utilisant les enzymes commerciales Celluclast® 1,5L et Novozyme® 188.

Dans des tubes Falcon® de 50 mL, on ajoute une certaine quantité de « pin-chips » humide, puis le complexe enzymatique composé des cellulases commerciales (endo- β -glucanases, exo- β -glucanases et β -glucosidase) et le tampon acétique de pH 5, pour finalement obtenir 10 mL au total.

Les tubes Falcon® sont placés dans un agitateur orbital (« shaker ») à la fréquence de 250 rotations par minute.

3.1.2. Définition des variables

Pour optimiser cette étape d'hydrolyse, on doit définir des variables sur lesquelles jouer pour obtenir différents résultats, pour finalement trouver la combinaison de variables menant au meilleur rendement.

Les paramètres pouvant varier lors de la réaction d'hydrolyse sont nombreux : fréquence de rotation de l'agitateur orbital, quantité d'enzymes, charge de substrat, température de réaction, temps de réaction...

La réaction d'hydrolyse ayant un certain coût, et ayant également été soumise à des contraintes de temps, il a été impossible de faire varier tous ces paramètres. Il a fallu choisir les bons paramètres à faire varier, et leur fixer des valeurs précises et intéressantes.

J'ai finalement choisi de faire varier les paramètres suivants : quantité d'enzymes, charge de substrat, température et temps de réaction. D'après le professeur René Carmona, la fréquence de rotation de l'agitateur orbital n'aurait qu'une très faible incidence sur le rendement de l'hydrolyse. C'est pourquoi j'ai choisi de ne pas traiter ce paramètre comme une variable, mais de le fixer à 250 rotations par minutes.

Pour les autres variables, des travaux réalisés auparavant au sein de l'Université du Chili pour ce même projet Biocomsa ont pu m'aider à les fixer (études réalisées par Consuelo FRITZ, chercheuse à l'Université du Chili).

- PARTIE 2 - MATERIEL ET METHODE.

Finalement, j'aurai choisi d'effectuer chaque test avec quatre concentrations d'enzymes différentes, car ce paramètre me paraît avoir une relation directe avec le rendement. En effet, plus les enzymes sont présentes, et plus l'hydrolyse devrait se faire rapidement et de manière complète. Les quatre concentrations d'enzymes choisies sont les suivantes : 15 FPIU/g ; 20 FPIU/g ; 25 FPIU/g ; 30 FPIU/g

Les autres variables seront fixées de la manière suivante pour chaque groupe (le contenu des groupes, de A à F, est détaillé dans la partie 2.2. de la Partie 2) :

Groupes A, B et C	Cas testés			
	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température de la réaction (°C)	40	50	40	50
Temps de la réaction (h)	70	48	70	48

Groupe D	Cas testés	
	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température de la réaction (°C)	40	40
Temps de la réaction (h)	48	48

Groupes E et F	Cas testés	
	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température de la réaction (°C)	50	50
Temps de la réaction (h)	24	24

Les valeurs des trois variables ont été choisies plus faibles dans le cas du maïs et du blé (groupes D, E et F), car ces deux substrats ont un taux de lignine très largement inférieur au bois. En effet, le blé a un taux de lignine d'environ 1,2 % (Arbouche, 2010), et le maïs de 0,1 % (FAO, 1993), contrairement à un taux de 20 à 30 % dans le bois

(Cours de Chimie du Bois, René Carmona). La cellulose est donc beaucoup plus accessible par les enzymes, et l'hydrolyse peut se produire plus aisément.

Mes hypothèses avant l'expérimentation sont que l'hydrolyse se ferait plus rapidement et de manière plus complète avec plus de réactifs (proportion de substrat), une température plus haute et une durée de réaction plus longue. Pour cela, abaisser les valeurs de ces variables dans le cas du blé et du maïs devrait pouvoir permettre d'obtenir des résultats plus homogènes avec ceux obtenus dans le cas du bois de Lenga ou de Pin de Monterey.

3.2. Détermination de la quantité de sucres réducteurs

Une fois la durée de l'hydrolyse écoulée, on prélève 1 mL de chaque tube Falcon®, en prenant bien la précaution de n'extraire que la fraction liquide. Cet extrait est placé dans un tube Eppendorf®. Ces tubes sont alors centrifugés à 10.000 rotations par minutes durant deux minutes. La phase du dessus est utilisée pour mesurer la quantité de sucres réducteurs selon la méthode de l'acide dinitrosalicilique (DNS) (Miller, 1959) adaptée au format de microplaques de 96 cavités.

On place un mélange de substrat-DNS équivalent à une dilution 1 : 2 dans chacune des cavités de la microplaque thermorésistante. Cette plaque est ensuite placée à 100°C durant 10 minutes, puis refroidie dans un bain glacé pour suspendre la réaction. On utilise une cuve de 50 µL et on mesure l'absorbance à 550 nm grâce à un lecteur de plaques Anthos, modèle 2010. Lorsque les valeurs d'absorbance relevées sont trop importantes, il est possible de diluer les solutions avec de l'eau distillée.

Pour traduire les valeurs d'absorbance en concentration de sucres réducteurs (exprimée en g/L), il faut utiliser une courbe de calibrage. Celle-ci se prépare avec une solution de D(+)-glucose, donc la linéarité est bonne entre 0,2 g/L et 1 g/L (coefficient de corrélation de 0,99). Cette courbe est présentée dans la Figure 10.

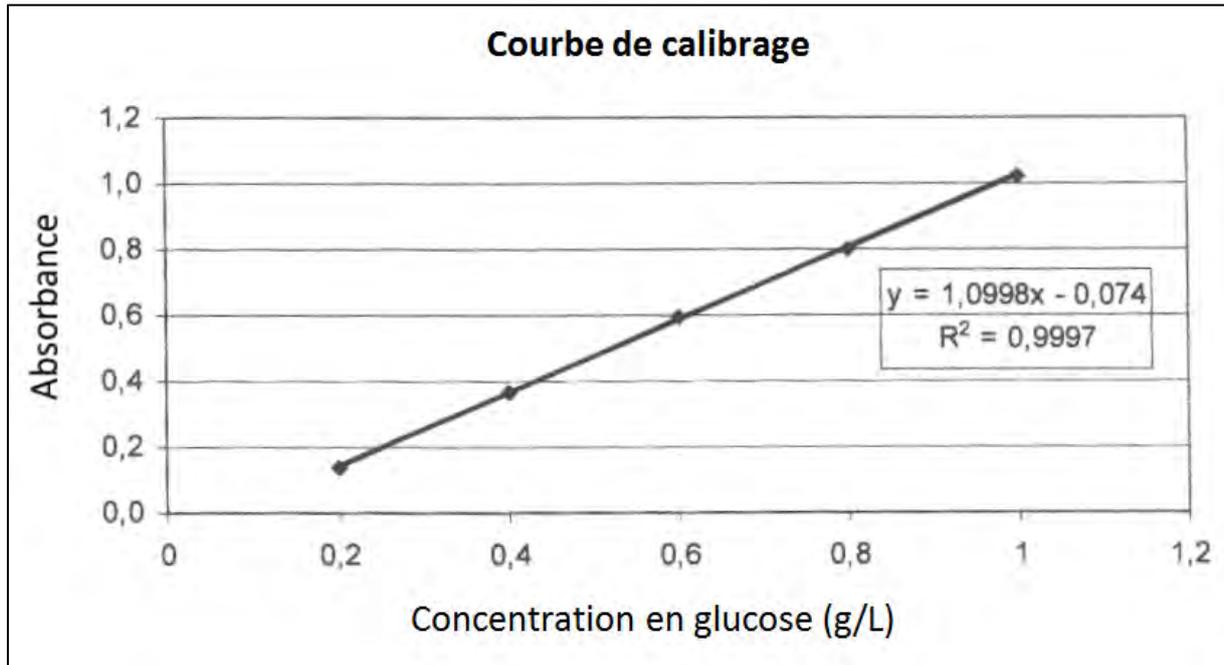


Figure 10 : Courbe de calibration pour la détermination de la quantité de sucres réducteurs

La formule utilisée pour le calcul est la suivante :

$$\text{Sucres réducteurs (g/L)} = \frac{ABS_{\text{mesurée}} + c}{m} \quad (2)$$

Avec :

- Sucres réducteurs : quantité totale de sucres obtenue, en g/L.
- $ABS_{\text{mesurée}}$: absorbance de l'échantillon à 550 nm de longueur d'onde.
- m : pente de la courbe de calibration.
- c : ordonnée à l'origine de la courbe de calibration.

Finalement, en remplaçant les valeurs obtenues sur la courbe de calibration, la formule devient :

$$\text{Sucres réducteurs (g/L)} = \frac{ABS_{\text{mesurée}} + 0,0739}{1,0998} \quad (3)$$

3.3. Détermination de la quantité de glucoses

D'après les objectifs fixés pour ce projet, la détermination du taux de sucres réducteurs suffiraient à évaluer le rendement de la réaction. Cependant, le principal sucre à partir duquel est formé l'éthanol est le glucose. Sachant cela, des financements ont été apportés par les décideurs du projet Biocomsa pour déterminer également le taux de glucose obtenus suite à l'hydrolyse. En effet, d'autres personnes travaillant sur d'autres parties du projet Biocomsa nécessitent les taux de sucres réducteurs tout comme ceux de glucose pour estimer plus précisément la quantité de bioéthanol pouvant potentiellement être produite à partir de la biomasse ligno-cellulosique à l'échelle nationale du Chili. Il a donc fallu déterminer ce taux de glucose.

Pour estimer cette quantité de glucose, on prend une dose de 10 µL de liquide de chacun des tubes Eppendorf® contenant les produits de l'hydrolyse précédemment centrifugés. On mélange ensuite ces 10 µL à 1000 µL de réactif fourni dans le kit commercial de glucose (réactif A) dans une cuvette en plastique de capacité 1,5 mL.

Les cuvettes sont placées durant 25 minutes à température ambiante (environ 25°C). Ensuite, on ajoute deux cuvettes, l'une contenant seulement le réactif du kit (réactif A), et l'autre les réactifs A et B, selon le protocole fourni dans le kit et détaillé dans l'Annexe 3.

La mesure se fait avec un spectrophotomètre Ultrospec®, modèle 3000, dans lequel on mesure l'absorbance pour une longueur d'onde de 500 nm. Les mesures se font en relation avec l'absorbance du réactif A.

La formule utilisée pour déterminer la concentration de glucose est la suivante :

$$Glucose (g/L) = \frac{ABS_{mesurée}}{ABS_{standard}} \quad (4)$$

Avec :

- Glucose : quantité totale de glucoses obtenue, en g/L.
- $ABS_{mesurée}$: absorbance de l'échantillon à 500 nm de longueur d'onde.
- $ABS_{standard}$: absorbance du mélange des réactifs A et B à 550 nm.

- PARTIE 3 - PRESENTATION ET ANALYSE DES RESULTATS.

Afin de ne pas baser mes résultats sur une seule valeur, j'ai décidé de réaliser chaque test sur 5 échantillons identiques. Chaque valeur exprimée ici dans les résultats est donc en réalité la moyenne faite sur 5 échantillons.

Pour éviter une surcharge dans le corpus, seuls les graphiques y sont exposés. Les tableaux de valeurs sont présentés en annexe (Annexe 3).

1. SUCRES REDUCTEURS

1.1. Groupe A

Le groupe A correspond aux échantillons de Lenga traités par le *Ganoderma applanatum* sur une durée de 60 jours. Les quantités de sucres réducteurs obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

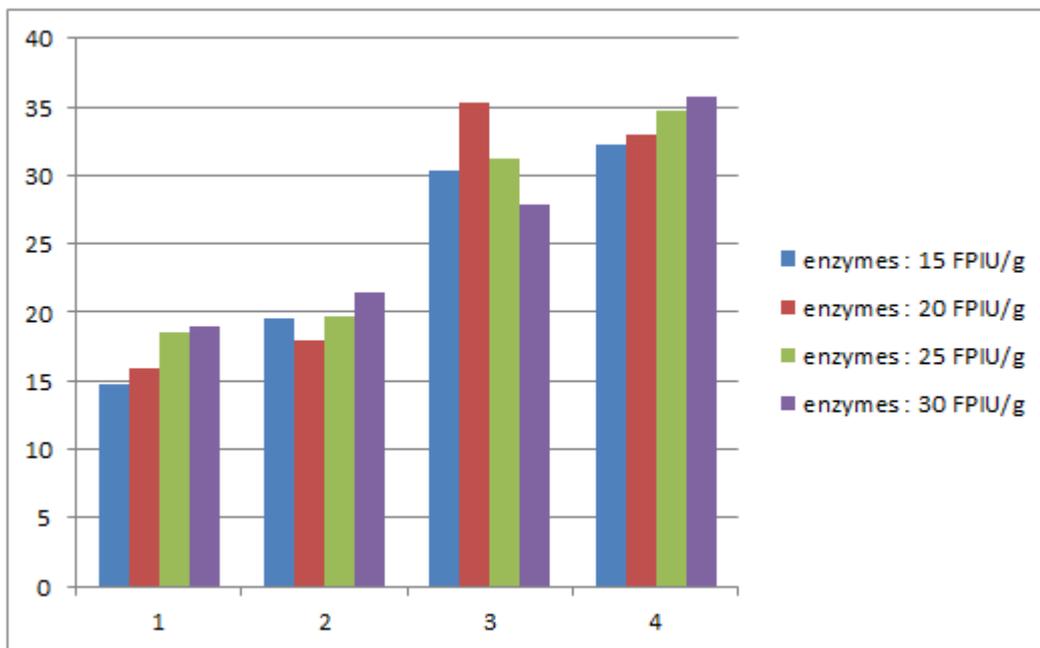


Figure 11 : Quantité de sucres réducteurs obtenus par le groupe A (en mg/mL)

- PARTIE 3 - PRESENTATION ET ANALYSE DES RESULTATS.

L'axe des abscisses représente les références suivantes :

Référence	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48

On remarque déjà que de manière générale, plus la quantité de substrat hydrolysé est importante, plus la quantité de sucres réducteurs produits est importante. En doublant la quantité de substrat utilisé (on passe de 5% à 10%), on double quasiment la quantité de sucres réducteurs obtenus.

Cependant, bien que cette quantité de sucres obtenus augmente aussi avec la concentration d'enzymes utilisées, ce paramètre agit de manière beaucoup plus faible sur le rendement. En effet, pour les tests de références 1, 2 et 4, en doublant la quantité d'enzymes, la quantité de sucres obtenus augmente seulement de 8% (référence 2) à 21% (référence 1). Dans le cas du test de référence 3, cette quantité de sucres diminue même de 9%.

Aussi, on constate que la production de sucres est très légèrement plus importante lorsqu'à paramètres égaux, la réaction se passe à température plus haute sur une durée plus courte. La température semble donc affecter de manière plus importante le rendement que le temps de réaction.

Finalement, on trouve que le résultat le moins satisfaisant est obtenu lorsque la concentration en enzymes est la plus faible (15 FPIU/g), que la proportion de substrat est la plus faible (5%), et que la température est la plus faible (40°C). Le résultat le plus satisfaisant est obtenu pour la concentration en enzymes la plus haute (30 FPIU/g), la proportion de substrat la plus forte (10%), et la température la plus haute (50°C).

1.2. Groupe B

Le groupe B correspond aux échantillons de Lenga traités par le *Ceriporiopsis subvermispora* sur une durée de 45 jours. Les quantités de sucres réducteurs obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

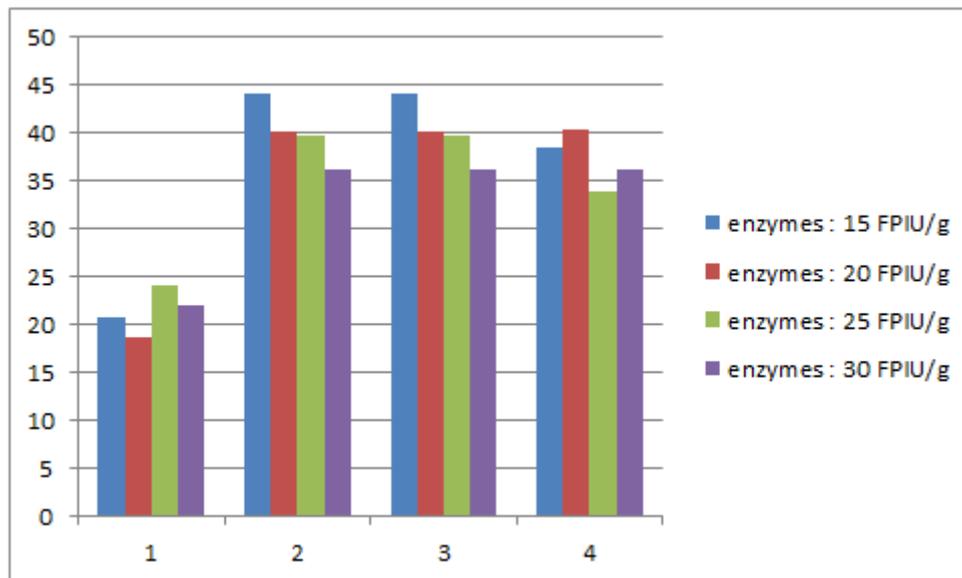


Figure 12 : Quantité de sucres réducteurs obtenus par le groupe B (en mg/mL)

Les références placées sur l'axe des abscisses correspondent aux mêmes références que dans le cas du groupe A.

Ces résultats sont plutôt différents de ceux trouvés pour le groupe A. En effet, bien que les résultats les plus faibles soient obtenus également pour de faibles quantités de substrat et de basses températures, on remarque que plus la concentration en enzymes est élevée, et plus faible est la quantité de sucres obtenue.

Cela pourrait s'expliquer par le fait que le champignon utilisé lors du prétraitement ait été différent. Si ce champignon a détruit la lignine plus efficacement, les enzymes ont pu rapidement finir de détruire les chaînes de cellulose et ont pu commencer ensuite à détruire les sucres (présence de glucohydrolases). Ainsi, l'utilisation d'une quantité d'enzymes trop importante pourrait réduire le rendement en sucres réducteurs. Lorsque beaucoup de substrats sont utilisés et que la température est trop haute, on peut constater ce même phénomène. C'est ce que l'on observe entre les tests de références 3 et 4.

1.3. Groupe C

Le groupe C correspond aux échantillons de Pin de Monterey traités par le *Ceriporiopsis subvermispora* sur une durée de 45 jours. Les quantités de sucres réducteurs obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

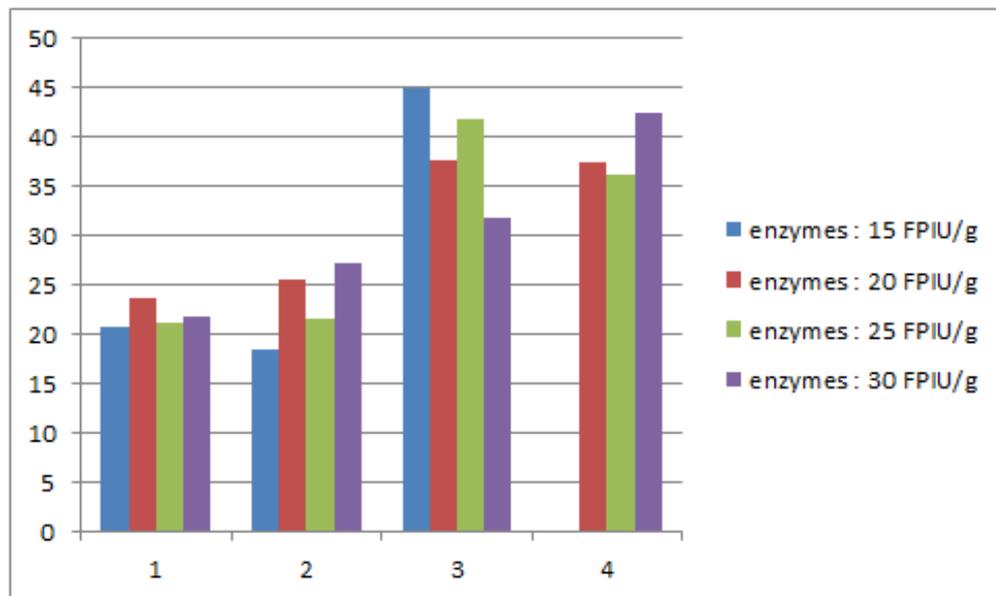


Figure 13 : Quantité de sucres réducteurs obtenus par le groupe C (en mg/mL)

Les références placées sur l'axe des abscisses correspondent aux mêmes références que dans le cas des groupes A et B. L'absence de valeur pour la référence 4 avec une concentration en enzymes de 15 FPIU/g est due à une erreur de manipulation et au manque de temps nécessaire pour renouveler cette manipulation.

Le groupe C semble combiner les résultats obtenus. En effet, les échantillons étant également été traité par le *Ceriporiopsis subvermispora*, on pourrait s'attendre à des résultats identiques à ceux obtenus pour le groupe B. Cependant, il se trouve que le Pin de Monterey possède plus de lignine que le Lenga (PROTA, 2011). Il n'est donc pas absurde de penser que le champignon a détruit un peu moins la lignine, ce qui finalement a empêché les enzymes de détruire la totalité de la cellulose puis le glucose. On obtient donc en fin de comptes des résultats assez proches de ceux obtenus pour le groupe A. Pour résumer, le fort taux de lignine du Pin de Monterey aurait pu compenser la forte puissance d'attaque du *Ceriporiopsis subvermispora*.

1.4. Groupe D

Le groupe D correspond aux échantillons de maïs traités par le *Ganoderma applanatum* sur une durée de 25 jours. Les quantités de sucres réducteurs obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

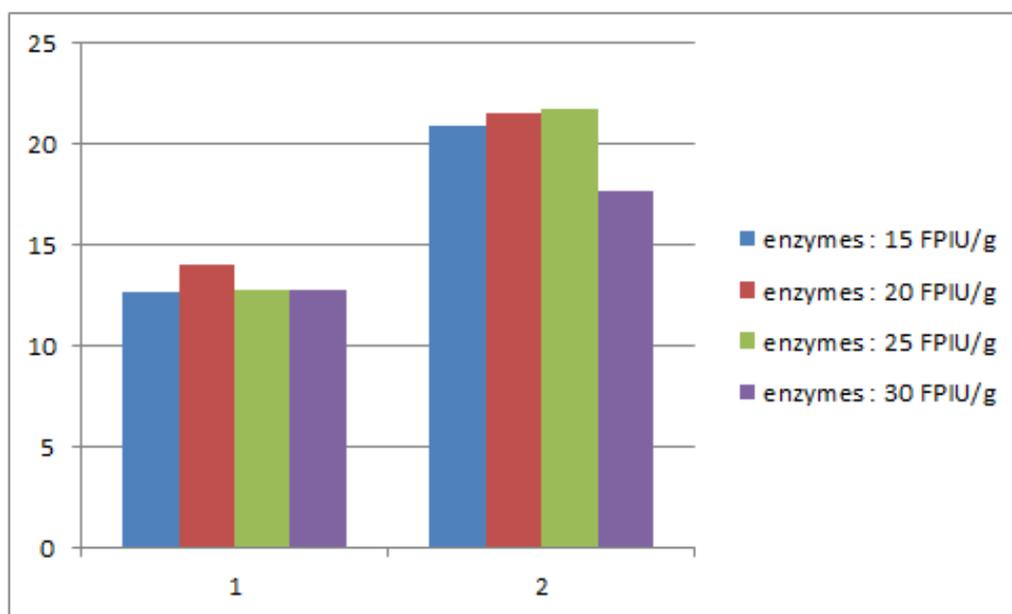


Figure 14 : Quantité de sucres réducteurs obtenus par le groupe D (en mg/mL)

L'axe des abscisses représente les références suivantes :

Référence	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	40	40
Temps (h)	48	48

Le maïs ayant un taux de lignine très faible, il est normal que le prétraitement n'ait duré que 25 jours. Malgré ce temps très faible, on peut deviner que la valeur assez basse du test de référence 2 avec une concentration enzymatique de 30 FPIU/g est due au fait que les enzymes ont commencé à s'attaquer aux sucres après avoir détruit la cellulose, comme l'explique l'hypothèse émise dans la partie présentant les résultats du groupe B.

Mis à part ce constat, on remarque logiquement que la quantité de sucres obtenus augmente avec la proportion de substrat mise en jeu.

1.5. Groupe E

Le groupe E correspond aux échantillons de maïs non prétraités. Les quantités de sucres réducteurs obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

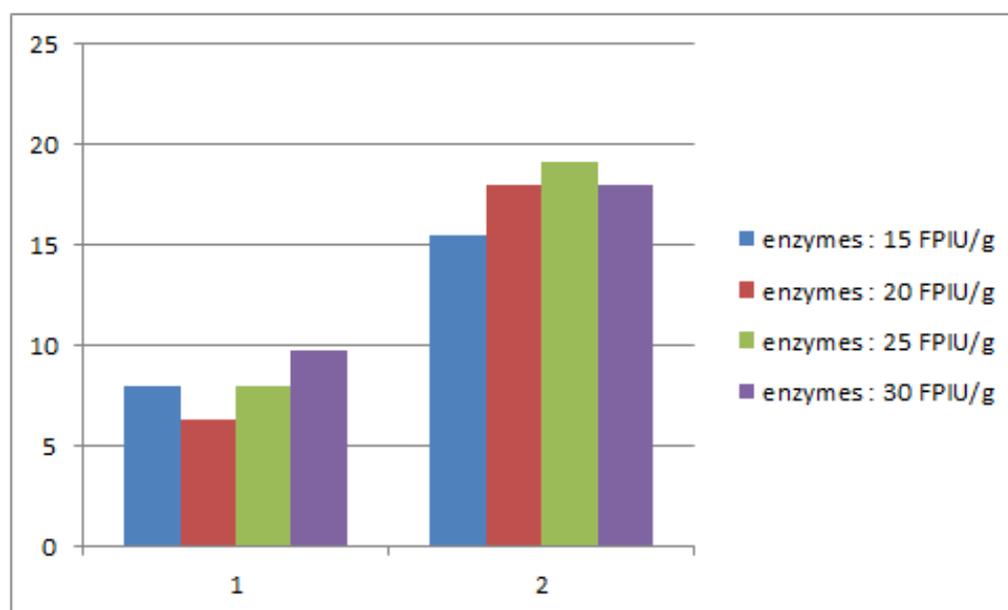


Figure 15 : Quantité de sucres réducteurs obtenus par le groupe E (en mg/mL)

L'axe des abscisses représente les références suivantes :

Référence	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	50	50
Temps (h)	24	24

On notera que pour une quantité de substrat de 3%, la différence se fait sentir entre les résultats donnés par le maïs traité et non traité. Cependant, en moyenne, le maïs non traité ne produit que que 13% de sucres en moins par rapport au même maïs prétraité. La faible influence de ce prétraitement pour le maïs s'explique à nouveau par sa très faible teneur en lignine (0,1% (FAO, 1993)).

1.6. Groupe F

Le groupe F correspond aux échantillons de blé non prétraités. Les quantités de sucres réducteurs obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

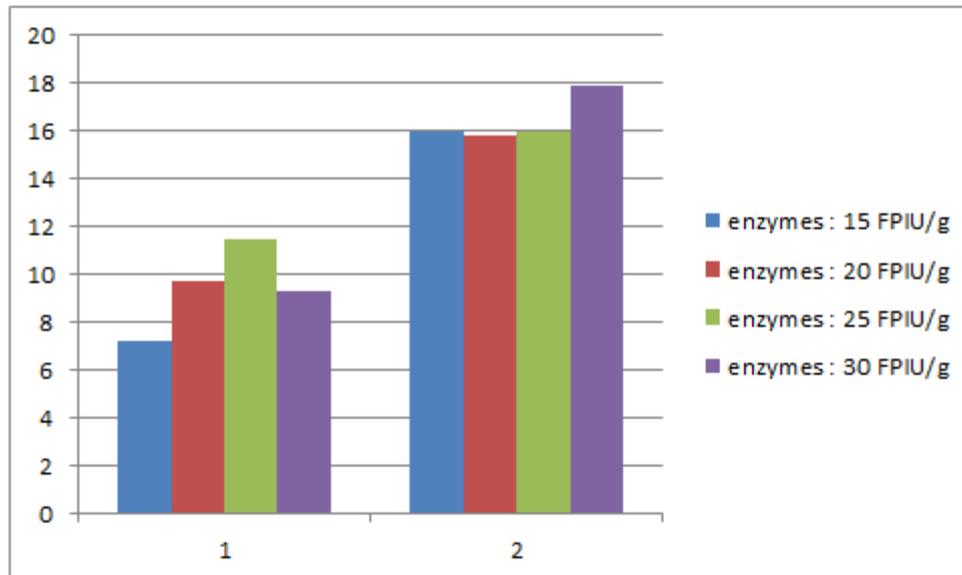


Figure 16 : Quantité de sucres réducteurs obtenus par le groupe F (en mg/mL)

Les références placées sur l'axe des abscisses correspondent aux mêmes références que dans le cas du groupe E.

Les résultats trouvés pour le groupe F sont très comparables à ceux trouvés pour le groupe E. Cela peut aisément s'expliquer par le fait que le blé, tout comme le maïs, possède un taux de lignine faible (1,2% (Arbouche, 2010)).

2. GLUCOSE

Les résultats trouvés sur le glucose sont exposés dans cette partie car leur élaboration a fait partie de mon travail au sein du projet Biocomsa. Cependant, l'analyse ne faisant pas partie de mes objectifs, elle ne sera pas abordée. Tout comme dans la partie précédente consacrée aux sucres réducteurs, les tableaux de valeurs seront donnés en annexe (Annexe 3).

2.1. Groupe A

Le groupe A correspond aux échantillons de Lenga traités par le *Ganoderma applanatum* sur une durée de 60 jours. Les quantités de glucose obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

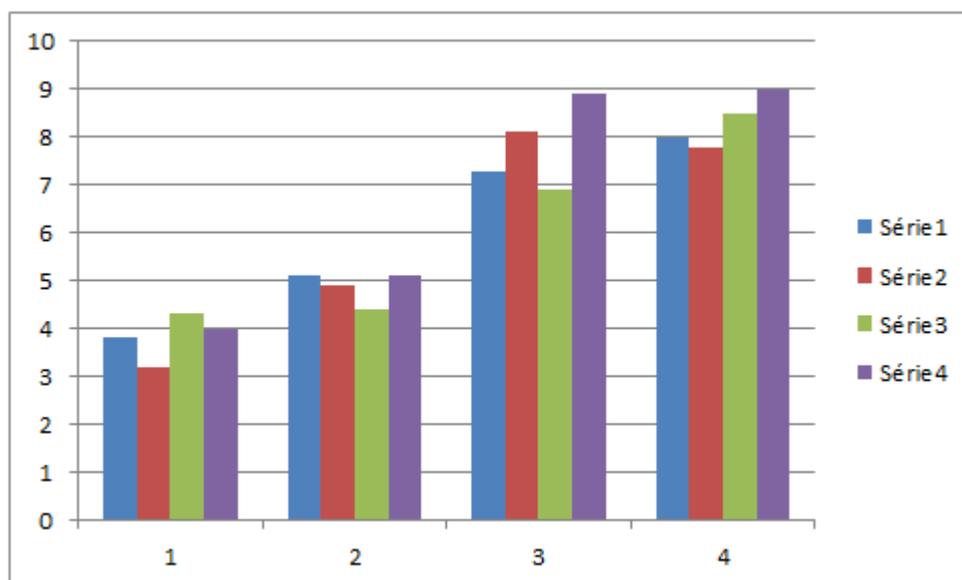


Figure 17 : Quantité de glucose obtenu par le groupe A (en mg/mL)

L'axe des abscisses représente les références suivantes :

Référence	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48

2.2. Groupe B

Le groupe B correspond aux échantillons de Lenga traités par le *Ceriporiopsis subvermispora* sur une durée de 45 jours. Les quantités de glucose obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

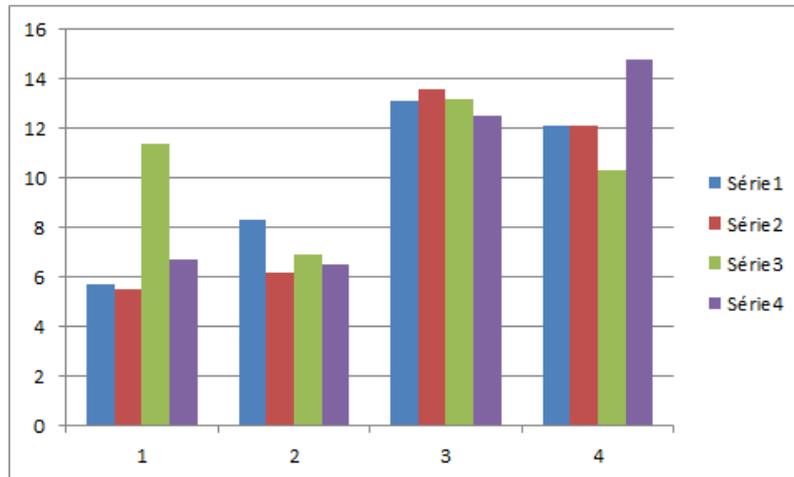


Figure 18 : Quantité de glucose obtenu par le groupe B (en mg/mL)

Les références placées sur l'axe des abscisses correspondent aux mêmes références que dans le cas du groupe A.

2.3. Groupe C

Le groupe C correspond aux échantillons de Pin de Monterey traités par le *Ceriporiopsis subvermispora* sur une durée de 45 jours. Les quantités de glucose obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

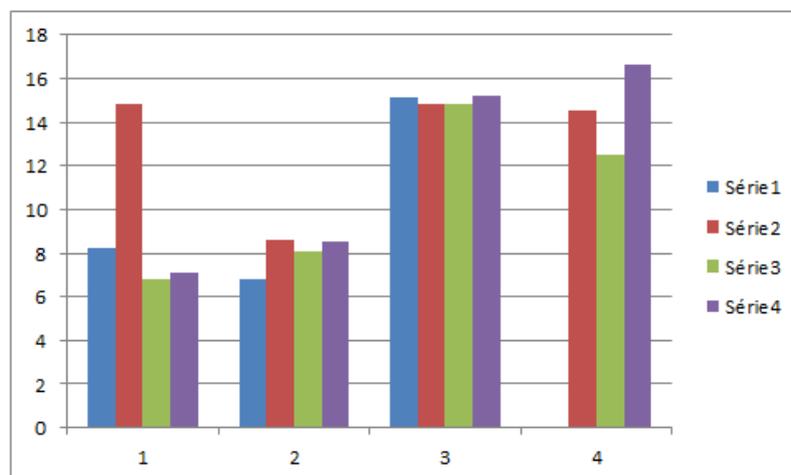


Figure 19 : Quantité de glucose obtenu par le groupe C (en mg/mL)

- PARTIE 3 - PRESENTATION ET ANALYSE DES RESULTATS.

Les références placées sur l'axe des abscisses correspondent aux mêmes références que dans le cas des groupes A et B.

2.4. Groupe D

Le groupe D correspond aux échantillons de maïs traités par le *Ganoderma applanatum* sur une durée de 25 jours. Les quantités de glucose obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

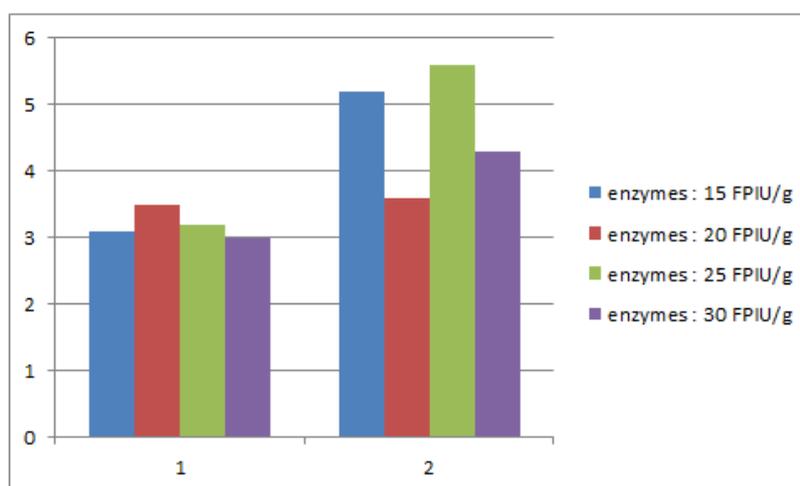


Figure 20 : Quantité de glucose obtenu par le groupe D (en mg/mL)

L'axe des abscisses représente les références suivantes :

Référence	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	40	40
Temps (h)	48	48

2.5. Groupe E

Le groupe E correspond aux échantillons de maïs non prétraités. Les quantités de glucose obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

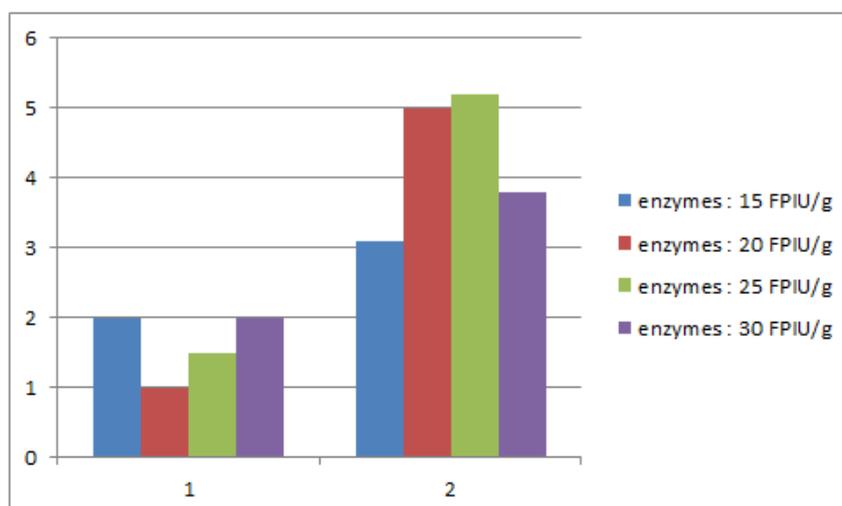


Figure 21 : Quantité de glucose obtenu par le groupe E (en mg/mL)

L'axe des abscisses représente les références suivantes :

Référence	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	50	50
Temps (h)	24	24

2.6. Groupe F

Le groupe F correspond aux échantillons de blé non prétraités. Les quantités de glucose obtenues pour chacun des cas sont exprimées dans le graphique suivant.

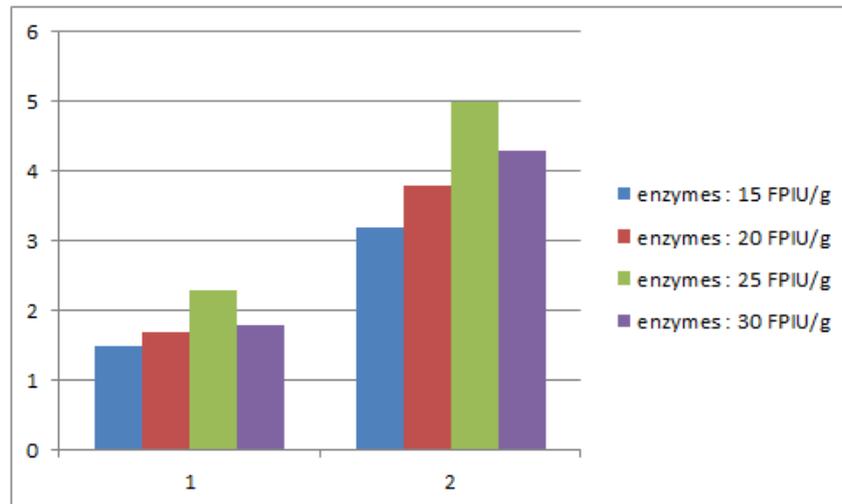


Figure 22 : Quantité de glucose obtenu par le groupe F (en mg/mL)

Les références placées sur l'axe des abscisses correspondent aux mêmes références que dans le cas du groupe E.

3. CONCLUSIONS

D'après les résultats obtenus lors de ce projet et les analyses qui en ont été faites, il est possible d'en tirer des conclusions.

Tout d'abord, comme mon intuition me le faisait pressentir, le rendement en sucres réducteurs augmente lorsqu'augmentent certains paramètres tels que la quantité d'enzymes utilisée, la charge de substrat, la température et le temps de réaction.

On peut également noter que la charge de substrat semble être le paramètre influant le plus fortement le rendement en sucres réducteurs. En revanche, le temps de réaction est également influant, mais très peu. La température de la réaction joue un rôle a priori plus important. Dans le but d'obtenir un bon rendement, il serait donc préférable de fixer une température plus haute, quitte à diminuer la durée de la réaction.

La quantité d'enzymes ajoutées est également liée au rendement de la réaction en sucres. Lorsque ce paramètre augmente, le rendement augmente aussi. Mais cela est vrai seulement jusqu'à un certain point. Lorsque la cellulose est entièrement consommée, il y a un moment où les sucres eux-mêmes commencent à être détruits par les glucohydrolases. Il faut donc trouver le dosage idéal pour détruire le plus possible de cellulose en formant des sucres, mais sans aller trop loin, pour ne pas détruire également ces derniers.

Si les résultats obtenus pour le maïs et le blé sont plus faibles, on peut imaginer que c'est pour cette même raison.

Finalement, les meilleurs résultats ont été obtenus à partir du Pin de Monterey traité par le *Ceriporiopsis subvermispora* sur une durée de 45 jours. L'hydrolyse a été réalisée dans les conditions suivantes : Proportion de substrat = 10% ; Température = 50°C ; Temps = 48h ; quantité d'enzymes = 30 FPIU/g.

CONCLUSION PERSONNELLE

Ce projet mené dans le cadre du projet BIOCOMSA a été pour moi une très bonne expérience.

D'un point de vue professionnel, cette expérience a été ma première expérience dans le domaine de la recherche. Guidé et encadré par des chercheurs de l'Université du Chili, j'ai pu me rendre compte plus précisément de ce qu'est la démarche suivie dans un travail de recherche scientifique. Faire face à une problématique, chercher des pistes possibles, les mettre en application et analyser les résultats sont une démarche m'ayant beaucoup plus.

Enfin, d'un point de vue culturel et humain, effectuer un tel projet en pays étranger est une expérience formidable. Ce projet m'aura permis de prendre du recul sur ma propre vie en me rendant compte que les méthodes de travail et les modes de vie en général peuvent être très différents d'un pays à l'autre.

BIBLIOGRAPHIE

- Akhtar, M., Blanchette, R., & Kent, T. (1997). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood.*
- Arbouche, H.-S. (2010). *Valorisation de quelques variétés de blé tendre cultivées en Algérie dans l'alimentation des ruminants.* El-Tarf: Centre Universitaire d'El-Tarf Algérie.
- Badger, P. (2002). *Ethanol From Cellulose: A General Review.* Récupéré sur <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/badger.pdf>
- Ballerini, D. (s.d.). Institut Français du Pétrole.
- Ballesteros, M. (2001). *Biocombustibles para el transporte.* McGraw-Hill.
- Béguin, P. (1990). *Molecular Biology of cellulose degradation.*
- Davila, G., & Vasquez-Duhalt, R. (2001). *Enzimas Ligninolíticas fungicas para fines ambientales.* Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Faculté de Médecine, Département de Biochimie.
- dddd. (s). *dd. ae: y.*
- Fan, L., Gharpuray, M., & Lee, Y. (1987). *Cellulose hydrolysis biotechnology monographs 57.* Berlin: Springer.
- FAO, F. a. (1993). *Le maïs dans la nutrition humaine.* Récupéré sur <http://www.fao.org/docrep/T0395F/T0395F00.htm#Contents>
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Wood. Chemistry, ultrastructure and reactions.* Berlin: Gruyter & Co.
- FOCER. (2002). *Fortalecimiento para la Capacidad en Energia Renovable para America Central.* Récupéré sur <http://www.bun-ca.org/publicaciones/BIOMASA.pdf>
- Hamelinck, C, Hooijdonk, G, & Faaij, A. (2003). *Prospects for etanol from lignocellulosic biomass: techno economic performance as development progresses.* Utrecht: Universiteit Utrecht, Copernicus institute Science Technology.
- Kirk, T, & Cullen, D. (1998). *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry.* John Wiley & Sons.
- Kuhad, R., Singh, A, & Eriksson, K. (1997). *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Microorganisms and their Enzymes Involved in the Degradation of Plant Fiber Cell Walls.*
- Macarron, M. (1992). *Purificacion y Caracterizacion de Endoglucanasa de Trichoderma reesei.* Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Faculté de Sciences Biologiques, Departement de Biochimie et Biologie Moléculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Martinez, A., Speranza, M, Ruiz-Duenas, F, Ferreira, P, Camarero, S, Guillén, F, et al. (2005). *Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*. Internation Microbiology.
- Mateos, I. (2001). *Aprovechamiento Biotecnologico de Residuos Agrarios*. Récupéré sur http://coli.usal.es/web/educativo/biotec_microb/temas/47isabelmateosmoreno.pdf.
- Micales, J. (2001). *Enzymes associated with wood decay and their potential uses in industry*. Wisconsin: University of Wisconsin La Crosse, Département de Microbiologie.
- Miller, G. (1959). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry.
- Montenecourt, B, & Eveleigh, D. (1979). *Production and characterization of high yielding cellulase mutants of Trichoderma reesei*. Atlanta: TAPPI.
- Negro, M. (1991). *Degradacion Enzimatica de la Biomasa de Onopordum nervosum bois*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia.
- ODEPA. (2007). *Comite publico-privado de Bioenergia, Informe final*. Santiago de Chile: Ministère Chilien de l'agriculture.
- Öhgren, K, Vehmaanpera, J, Siika-Aho, M, Galbe, M, Viikari, L, & Zacchi, G. (2006). *High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production*. ScienceDirect.
- Oliva, D. (2003). *Efecto de los Productos de Degradacion Originados en la Explosion a Vapor de Biomasa de Chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Sciences Biologiques, Département de Microbiologie.
- PROTA, P. R. (2011). Récupéré sur www.prota.org
- Romano, S, Gonzales, E, & Laborde, M. (2005). *Combustibles Alternativos. Nuevas Tecnologias para la obtencion de Biocombustibles*. Buenos Aires: Ediciones Cooperativas.
- Royo, J. (2003). *Usos Energeticos de la biomasa Energias Renovables y Desarrollo Humano*. Zaragoza: Universidad de Zaragoza.
- Sanchez, O, & Cardona, C. (2005). *Produccion biotecnologica de alcohol carburante. Obtencion a partir de diferentes materias primas*. Récupéré sur <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/339/33911003.pdf>
- Sjöström, E. (1993). *Wood Chemistry: fundamentals and applications*. Academic Press, Inc. California, USA.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review*. Bioresurce Technology.
- TROUY-TRIBOULOT, M.-C. (2012). *Cours d'Anatomie du Bois*. Epinal: ENSTIB.

ANNEXES

ANNEXE 1

Détermination des sucres réducteurs par la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS).

Préparation du DNS :

Mélanger :	de l'eau distillée	1416 mL
	de l'acide 3,5-dinitrosalicylique	10,6 g
	du NaOH	19,8 g
Bien dissoudre puis ajouter :	du sel de Seignette	306g
	du phénol à 50°C	7,6 mL
	du métabisulfite de sodium	8,3 g

Conserver le tout dans un flacon, dans un lieu frais et sec.

Protocole pour réaliser la courbe de calibration :

- A partir de glucose de concentration 4 g/L, on prépare des dilutions pour faire le patron de la courbe, et de l'eau comme étalon.
- Pour chaque dilution, on prend 50 µL et on ajoute 50 µL de DNS.
- Agiter tous les échantillons.
- Mettre à 100°C pendant 10 minutes.
- Refroidir dans un bain de glace.
- Lire l'absorbance avec un lecteur de plaques, à 550 nm.
- Réaliser la courbe d'absorbance en fonction de la concentration. Elle doit avoir un coefficient de corrélation compris entre 0,991 et 0,999.

Calcul :

La quantité de sucres réducteurs obtenus se calcule de la manière suivante :

$$\text{Sucres réducteurs} = \frac{ABS_{\text{mesure}} - c}{m}$$

Où m est la pente de la courbe et c son ordonnée à l'origine.

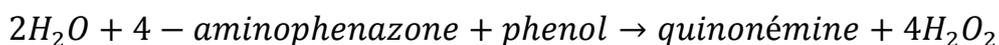
ANNEXE 2

Détermination du glucose par un procédé standard.

Il s'agit d'un test colorimétrique enzymatique sur le glucose, selon le laboratoire Randox®, suivant la méthode GLUC-PAP. On utilise un test sans déprotéinisation.

Méthode :

Le glucose est déterminé après l'oxydation enzymatique en présence de glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit suivant une catalyse de peroxydase avec du phénol et du 4-aminophenazone, formant un complexe rouge-violet utilisant la quinonémine comme indicateur.

Principe de la réaction :Réactifs :

- Réactif A :
 - Tampon phosphate (pH 7,5)
 - 4-aminophenazone
 - Phénol
 - Glucose oxydase
 - Peroxydase
 - Mutarotase
 - Stabilisants
- Réactif B ou glucose seul

Procédé : Il se présente selon le schéma suivant :

	Macro		Semi Micro	
	Standard ou échantillon	Blanc réactif	Standard ou échantillon	Blanc réactif
Standard ou échantillon	20 μL	---	10 μL	---
Réactif A	2000 μL	2000 μL	1000 μL	1000 μL

Bien mélanger, mettre pendant 25 minutes entre 15 et 25°C ou 10 minutes à 37°C.

Mesurer l'absorbance du standard et des mesures avec le blanc réactif dans les 60 minutes.

Calcul :

$$[\text{Glucose}] = \frac{ABS_{\text{mesure}}}{ABS_{\text{standard}}}$$

ANNEXE 3

Tableaux de résultats : Quantité de Sucres Réducteurs (en mg/mL)

Résultats pour le groupe A

<i>Référence</i>	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48
enzymes : 15 FPIU/g	14,8	19,6	30,4	32,3
enzymes : 20 FPIU/g	15,9	18,0	35,3	33,0
enzymes : 25 FPIU/g	18,5	19,7	31,2	34,7
enzymes : 30 FPIU/g	18,9	21,4	27,9	35,8

Résultats pour le groupe B

<i>Référence</i>	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48
enzymes : 15 FPIU/g	20,8	44,1	44,1	38,5
enzymes : 20 FPIU/g	18,7	40,1	40,1	40,4
enzymes : 25 FPIU/g	24,2	39,7	39,7	33,8
enzymes : 30 FPIU/g	22,1	36,3	36,3	36,2

Résultats pour le groupe C

<i>Référence</i>	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48
enzymes : 15 FPIU/g	20,7	18,4	44,9	
enzymes : 20 FPIU/g	23,6	25,5	37,7	37,4
enzymes : 25 FPIU/g	21,2	21,5	41,8	36,2
enzymes : 30 FPIU/g	21,9	27,3	31,9	42,5

Tableaux de résultats : Quantité de Sucres Réducteurs (en mg/mL) (SUITE)

Résultats pour le groupe D

<i>Référence</i>	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	40	40
Temps (h)	48	48
enzymes : 15 FPIU/g	12,7	20,9
enzymes : 20 FPIU/g	14,0	21,5
enzymes : 25 FPIU/g	12,8	21,7
enzymes : 30 FPIU/g	12,8	17,7

Résultats pour le groupe E

<i>Référence</i>	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	50	50
Temps (h)	24	24
enzymes : 15 FPIU/g	8,0	15,5
enzymes : 20 FPIU/g	6,3	18,0
enzymes : 25 FPIU/g	8,0	19,1
enzymes : 30 FPIU/g	9,8	18,0

Résultats pour le groupe F

<i>Référence</i>	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	50	50
Temps (h)	24	24
enzymes : 15 FPIU/g	7,2	16,0
enzymes : 20 FPIU/g	9,7	15,8
enzymes : 25 FPIU/g	11,5	16,0
enzymes : 30 FPIU/g	9,3	17,9

Tableaux de résultats : Quantité de Glucose (en mg/mL)

Résultats pour le groupe A

<i>Référence</i>	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48
enzymes : 15 FPIU/g	3,8	5,1	7,3	8,0
enzymes : 20 FPIU/g	3,2	4,9	8,1	7,8
enzymes : 25 FPIU/g	4,3	4,4	6,9	8,5
enzymes : 30 FPIU/g	4,0	5,1	8,9	9,0

Résultats pour le groupe B

<i>Référence</i>	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48
enzymes : 15 FPIU/g	5,7	8,3	13,1	12,1
enzymes : 20 FPIU/g	5,5	6,2	13,6	12,1
enzymes : 25 FPIU/g	11,4	6,9	13,2	10,3
enzymes : 30 FPIU/g	6,7	6,5	12,5	14,8

Résultats pour le groupe C

<i>Référence</i>	1	2	3	4
Proportion de substrat (%)	5	5	10	10
Température (°C)	40	50	40	50
Temps (h)	70	48	70	48
enzymes : 15 FPIU/g	8,2	6,8	15,1	
enzymes : 20 FPIU/g	14,8	8,6	14,8	14,5
enzymes : 25 FPIU/g	6,8	8,1	14,8	12,5
enzymes : 30 FPIU/g	7,1	8,5	15,2	16,6

Tableaux de résultats : Quantité de glucose (en mg/mL) (SUITE)

Résultats pour le groupe D

<i>Référence</i>	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	40	40
Temps (h)	48	48
enzymes : 15 FPIU/g	3,1	5,2
enzymes : 20 FPIU/g	3,5	3,6
enzymes : 25 FPIU/g	3,2	5,6
enzymes : 30 FPIU/g	3,0	4,3

Résultats pour le groupe E

<i>Référence</i>	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	50	50
Temps (h)	24	24
enzymes : 15 FPIU/g	2,0	3,1
enzymes : 20 FPIU/g	1,0	5,0
enzymes : 25 FPIU/g	1,5	5,2
enzymes : 30 FPIU/g	2,0	3,8

Résultats pour le groupe F

<i>Référence</i>	1	2
Proportion de substrat (%)	3	5
Température (°C)	50	50
Temps (h)	24	24
enzymes : 15 FPIU/g	1,5	3,2
enzymes : 20 FPIU/g	1,7	3,8
enzymes : 25 FPIU/g	2,3	5,0
enzymes : 30 FPIU/g	1,8	4,3

RESUMÉ

Dans un contexte actuel où nos ressources naturelles s'épuisent et où leur préservation est primordiale pour notre avenir, il est important de chercher de nouvelles alternatives en termes de production d'énergie. Au Chili, un sujet de recherche actuel est la production de bioéthanol à partir de matière ligno-cellulosique. Mon projet s'inscrit donc dans le cadre du projet de recherche BIOCOMSA, mené par l'Université du Chili (Santiago du Chili).

Ce projet a pour but de faire subir à de la matière ligno-cellulosique un prétraitement biologique (effectué grâce à l'action de champignons), suivi d'une hydrolyse enzymatique et enfin d'une fermentation. L'objectif de ma partie, présentée ici, est d'optimiser le processus d'hydrolyse enzymatique pour quatre substrats très communs au Chili : le Lenga (*Nothofagus pumilio*), le Pin de Monterey (*Pinus radiata*), le maïs et le blé.

Les variables à optimiser choisies sont les suivantes : la quantité d'enzymes, la quantité de substrat, la température et le temps de réaction.

On remarquera que de manière générale, le rendement de la réaction augmente avec la quantité d'enzymes utilisée, le temps de la réaction, et la température de la réaction.

Finalement, le meilleur rendement est obtenu avec du Pin de Monterey prétraité 45 jours avec un champignon de type *Ceriporiopsis subvermispora*, dans les conditions suivantes : concentration de l'enzyme = 10 mg/mL ; durée de réaction = 48 heures ; température de réaction = 50°C.

Mots clés: Optimisation, hydrolyse, enzymes, bioéthanol, matière ligno-cellulosique, prétraitement.

ABSTRACT

In the actual context where natural resources are becoming exhausted and their preservation is fundamental for our future, it is really important to look for new alternatives in energy production. In Chile, an actual subject of investigation is production of bioethanol from lignocellulosic material. My project is a part of the investigation's project Biocomsa, lead by the University of Chile (Santiago de Chile).

The aim of this project is to take ligno-cellulosic material, to make it undergo a biological pretreatment (by fungi), an enzymatic hydrolysis, and finally a fermentation. The aim of my part of the project, presented here, was to optimize the process of enzymatic hydrolysis for four different substrates, very common in Chile: Lenga (*Nothofagus pumilio*), Pine of Monterey (*Pinus radiata*), maize and corn.

The variables to optimize were: quantity of enzyme, quantity of substrate, temperature, and duration of reaction.

In general, the yield of the reaction increased with the proportion of enzymes used, the duration and the temperature of the reaction.

Finally, the best result was obtained with Pine of Monterey pretreated for 45 days with *Ceriporiopsis subvermispora*, under the following conditions: concentration of enzyme = 10 mg/mL; duration of reaction = 48 hours; temperature of the reaction = 50°C.

Keywords: Optimization, hydrolysis, enzymes, bioethanol, lignocellulosic material, pretreatment.