
La fermentation en milieu solide est un bioprocédé pouvant éventuellement être utilisé comme technologie de rupture pour diminuer le coût des biocatalyseurs utilisés dans la conversion de biomasse lignocellulosique comme le son de blé. La première partie de ces travaux de recherche a donc étudié le potentiel de cette technologie par rapport à celle de fermentation en milieu submergé lors d'une comparaison en application. Plusieurs tests de saccharification ont ainsi été réalisés sur différentes matières premières (cellulose, son de blé) et ont permis de montrer l'avantage différenciateur des biocatalyseurs produits par fermentation en milieu solide. Ensuite, la deuxième partie de ces travaux de recherche a porté sur l'étude des facteurs de la récalcitrance du son de blé à l'hydrolyse enzymatique. Deux principaux facteurs ont ainsi pu être démontrés : un facteur physique, lié à l'accessibilité des biocatalyseurs aux polysaccharides, et un facteur biochimique, lié à l'absence ou à la faible présence de certaines activités enzymatiques (féruloyl estérase,...) dans le complexe enzymatique de *Trichoderma reesei* Rut-C30. Cette étude a également permis d'identifier l'origine des différentes fractions glucidiques hydrolysées et de déterminer le potentiel glucidique actuellement hydrolysable à partir de cette biomasse. Enfin, la dernière partie de ces travaux de recherche a été consacrée à l'étude pratique d'un concept innovant de procédé permettant de favoriser la conversion des polysaccharides contenus dans le son de blé. Une levée de la barrière physique au transfert de masse et par conséquent une validation de ce concept a finalement pu être réalisée.

Mots-clés : fermentation en milieu solide, fermentation en milieu submergé, comparaison, lignocellulose, son de blé, *Trichoderma reesei*.

Solid-state fermentation is

TABLE DES MATIERES

<u>REMERCIEMENTS</u>	7
<u>RESUME</u>	10
<u>TABLE DES MATIERES</u>	12
<u>Liste des Tableaux</u>	17
<u>Liste des Figures</u>	18
<u>Liste des Abréviations</u>	21
<u>Liste des Acronymes</u>	22
 INTRODUCTION.....	 23
 ETAT DE L'ART.....	 26
1. CONTEXTE ET ENJEUX	27
<i>1.1. Les défis énergétiques, économiques et géopolitiques</i>	27
<i>1.2. Les défis alimentaires et sociétaux</i>	28
<i>1.3. Les défis climatiques et environnementaux</i>	29
<i>1.4. La troisième révolution industrielle : l'essor des bioraffineries</i>	30
2. LE PROCÉDE DE CONVERSION	

2.3. LES PRINCIPAUX BIOCATALYSEURS LIGNOCELLULOLYTIQUES	51
2.3.1. Les cellulases et la cellulolyse.....	51
2.3.2. Les hémicellulases et les enzymes accessoires	54
2.3.3. Les ligninases	56
2.4. LA PRODUCTION D'ENZYMES ET L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	56
2.4.1. Les souches productrices de complexes lignocellulolytiques.....	56
2.4.2. La récalcitrance de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique	59
2.4.3. Les fournisseurs de biocatalyseurs et leurs produits commerciaux	59
2.5. LA FERMENTATION.....	62
3. LA FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE	62
3.1. DEFINITION.....	62
3.2. HISTOIRE ET APPLICATIONS DE LA FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE	6

2. LES HYDROLYSES ENZYMATIQUES ET FERMENTATIONS ALCOOLIQUES	80
.....	80
2.1. LES SUBSTRATS	80
2.2. LES PRETRAITEMENTS	80
2.2.1. Broyage en voie sèche	80
2.2.2. Broyage en voie humide	80
2.2.3. Traitement enzymatique	80
2.3. LES HYDROLYSES ENZYMATIQUES	81
2.4. LES FERMENTATIONS ALCOOLIQUES	81
3. LES METHODES ANALYTIQUES	82
3.1. LES SUCRES REDUCTEURS	82
3.2. LE DOSAGE DES PROTEINES	82
3.3. LES ACTIVITES ENZYMATIQUES	82
3.3.1. L'activité papier filtre ou cellulases totales (FPase)	82
3.3.2. L'activité end	

4. Conclusions	96
Acknowledgment	96
References.....	96

CHAPITRE II : *Understanding the recalcitrant factors in lignocellulosic biomass hydrolysis to determine the carbohydrates potentially releasable in wheat bran.....*

<u>RESUME</u>	103
ABSTRACT	104
1. Introduction	105
2. Methods	107
2.1. Chemicals and substrate.....	107
2.2. Enzymes	108
2.3. Successive processing of wheat bran	109
2.4. Enzymatic hydrolysis	109
2.5. Analytical methods	110
<	

4. Conclusion	133
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	134
GLOSSAIRE	137
BIBLIOGRAPHIE	140

LISTE DES TABLEAUX

ETAT DE L'ART

<u>Tableau n°1</u> : Concentrations mondiales (fractions molaires) et évolution depuis 1750 des principaux gaz à effet de serre persistants.....	29
<u>Tableau n°2</u> : Les dix principaux pays producteurs de blé au monde en 2010	34
<u>Tableau n°3</u> : Les principaux acides phénoliques présents dans le son de blé.....	45
<u>Tableau n°4</u> : Les précurseurs et unités de base de la lignine	47
<u>Tableau n°5</u> : Les principaux types de prétraitements	50
<u>Tableau n°6</u> : Les principales hémicellulases nécessaires à l'hydrolyse des arabinoxylanes.....	55
<u>Tableau n°7</u> : Liste des principaux produits commerciaux cellulolytiques et hémicellulolytiques	61
<u>Tableau n°8</u> : Histoire du développement de la fermentation en milieu solide	64
<u>Tableau n°9</u> : Produits alimentaires traditionnels réalisés par fermentation en milieu solide	66
<u>Tableau n°10</u> : Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide	67
<u>Tableau n°11</u> : Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergé.....	73

CHAPITRE I

<u>Table 1:</u> Enzymatic complexes activities introduced in cellulose (Avicel [®] PH-101) hydrolysis tests (A) and carbohydrate content of the hydrolyzates after 72 h of hydrolysis (B)	100
--	-----

<u>Table 2:</u> Enzymatic complexes activities introduced in lignocellulosic complex (wheat bran) hydrolysis tests (A) and carbohydrate content of the hydrolyzates after 72 h of hydrolysis (B)	101
--	-----

CHAPITRE II

<u>Table 1:</u> Composition of different layers in mature wheat bran	121
--	-----

<u>Table 2:</u> Carbohydrate content after 72 h of enzymatic hydrolysis of the pretreated wheat bran without grinding and complementation.....	123
--	-----

<u>Table 3:</u> Carbohydrate content after 72 h of enzymatic hydrolysis of the pretreated wheat bran with grinding and without complementation	124
--	-----

<u>Table 4:</u> Carbohydrate content after 72 h of enzymatic hydrolysis of the pretreated wheat bran with grinding and complementation.....	125
---	-----

CHAPITRE III

<u>Tableau n°1 :</u> Taille et épaisseur des cellules et couches cellulaires constituant le son de blé....	129
--	-----

<u>Tableau n°2 :</u> Profil chromatographique obtenu par C.L.H.P. des différents essais après 6 heures d'hydrolyse et/ou de fermentation	132
--	-----

LISTE DES FIGURES

ETAT DE L'ART

<u>Figure n°1</u> : Un exemple de bioraffinerie : le complexe agro-industriel « Les Sohettes » de Pomacle-Bazancourt.....	31
<u>Figure n°2</u> : Représentation schématique du procédé de conversion par voie biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioproduits	33
<u>Figure n°3</u> : Schéma d'un grain de blé mature en coupe longitudinale	35
<u>Figure n°4</u> : Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé industriel	36
<u>Figure n°5</u> : Représentation schématique de l'organisation des parois cellulaires végétales et de leur composition	40
<u>Figure n°6</u> : Structure de la cellulose : fibrille élémentaire (A), liaisons inter- et intramoléculaires (B), microfibrille de 36 chaînes de glucanes (C).....	41
<u>Figure n°7</u> : Les principaux arabinoxylanes présents dans le blé : dans l'endosperme (A) ; dans le péricarpe (B)	43
<u>Figure n°8</u> : Les différents déhydrodimères et déhydrotrimères d'acide férulique présents dans les grains de céréales	46
<u>Figure n°9</u> : Schéma hypothétique de la lignine de blé.....	48
<u>Figure n°10</u> : La cellulolyse	53
<u>Figure n°11</u> : Mode d'action des principales hémicellulases nécessaires à l'hydrolyse des (glucurono)arabinoxylanes.....	54

<u>Figure n°12</u> : Arbre généalogique des souches de <i>Trichoderma reesei</i>	58
<u>Figure n°13</u> : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS	63
<u>Figure n°14</u> : Méthode traditionnelle pour la culture de Koji avec <i>Aspergillus oryzae</i>	65

CHAPITRE II

<u>Figure 1</u> : Experimental procedure used to successive processing of wheat bran	122
--	-----

CHAPITRE III

<u>Figure n°1</u> : Illustration d'une cinétique d'hydrolyse selon le concept de procédé établi	129
<u>Figure n°2</u> : Distribution de la taille des particules au début de la phase 1 et à la fin de la phase 2 de ce procédé.....	132

LISTE DES ABREVIATIONS

®	: <i>Registered</i> (marque déposée)
A/X	: Arabinose/Xylose
BSA	: <i>Bovine serum albumine</i> (albumine de sérum bovin)
CFC	: Chlorofluorocarbures
CH ₄	: Méthane
CO ₂	: Dioxyde de carbone
DNS	: <i>3,5-Dinitrosalicylic acid</i> (acide 3,5-dinitrosalicylique)
DP	: Degré de polymérisation
Gtep	: Giga tonne d'équivalent pétrole
H ₂ O	: Eau
H ₂ SO ₄	: Acide sulfurique
J.-C.	: Jésus-Christ
Mn	: Manganèse
MS	: Matière sèche
N ₂ O	: Protoxyde d'azote
n.c.	: Non communiqué
O ₂	: Dioxygène
ppb	: <i>Parts per billion</i> (partie par milliard)
ppm	: <i>Parts per million</i> (partie par million)
rpm	: <i>Revolutions per minute</i> (tours par minute)
SO ₂	: Dioxyde de soufre
tr/min	: Tour par minute
U	: Unité

LISTE DES ACRONYMES

AFEX	: <i>Ammonia fiber explosion</i>
AIE	: Agence Internationale de l'Energie
BRICS	: <i>Brazil, Russia, India, China, South Africa</i>
CAPEX	: <i>Capital expenditures</i> (« dépenses d'investissement »)
CBP	: <i>Consolidated BioProcessing</i>
CLHP	: Chromatographie Liquide Haute Performance
GIEC	: Groupement d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat
FAO	: <i>Food and Agriculture Organization</i>
FML/SmF	: Fermentation en Milieu Liquide (Submergé)/ <i>Submerged Fermentation</i>
FMS/SSF	: Fermentation en Milieu Solide/ <i>Solid-State Fermentation</i>
HSF	: <i>Hybrid Saccharification and Fermentation</i>
IAR	: Industries et Agro-Ressources
OCDE	: Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OPEX	: <i>Operational expenditures</i> (« dépenses de fonctionnement »)
PAC	: Politique Agricole Commune
SHF	: <i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i>
SSCF	: <i>Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation</i>
SSF	: <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>

INTRODUCTION

Les bioprocédés sont probablement apparus conjointement avec les premières formes de société, principalement pour répondre aux besoins fondamentaux de l'homme, avec des usages alimentaires (pain, fromages, boissons alcoolisées, vinaigre) dans les premiers temps, puis petit à petit pour des applications de plus en plus diverses et spécifiques. Pendant très longtemps, ces bioprocédés sont demeurés empiriques et ce n'est que très récemment que la démarche scientifique, appliquée à la microbiologie et symbolisée par les travaux de Louis Pasteur, a permis d'améliorer rationnellement leur maîtrise technologique. Historiquement, deux principaux types de bioprocédés ont émergé et ont coexisté jusque dans les années 1940 : la fermentation en milieu submergé et la fermentation en milieu solide. C'est avec le boom économique suivant la seconde guerre mondiale et la nécessité de normalisation et de standardisation que la fermentation en milieu submergé, plus facile de mise en œuvre, a pris le pas sur la fermentation en milieu solide. Cette prépondérance a ensuite été consolidée à partir des années 1970 grâce à l'utilisation des organismes génétiquement modifiés. Depuis, la fermentation en milieu solide est restée un procédé jugé artisanal et principalement de marchés de niche, avec seulement quelques sociétés au monde utilisant encore cette technologie (Alltech[®] aux Etats-Unis d'Amérique, Biocon en Inde, Amano[®] enzyme au Japon et Lyven[®] en France).

A l'aube de ce XXI^{ème} siècle, la raréfaction des énergies fossiles, en particulier celle du pétrole, est en train de provoquer de profonds changements dans notre modèle de société dont l'économie repose majoritairement sur ces ressources. L'une des solutions envisagées pour la substitution du pétrole se base sur l'utilisation de la biomasse comme matière première pour la production de bioproduits au sein de complexes agro-industriels, aussi appelé bioraffineries. Actuellement, la plupart des sites de production utilisent les parties nobles des plantes, c'est-à-dire les organes de réserve (grains, tubercules, fruits), normalement exploitées pour l'alimentation humaine. Cependant, avec les tensions actuelles autour de l'alimentation, l'essor des bioraffineries ne pourra vraisemblablement se faire qu'en utilisant les parties non alimentaires des plantes, c'est-à-dire les organes de structure, composées principalement de lignocellulose. Parmi les nombreuses biomasses potentiellement disponibles, la valorisation des fractions lignocellulosiques déjà présentes sur les sites industriels permettrait d'ouvrir cette voie et de réaliser un gain significatif grâce à la production de molécules à forte valeur ajoutée. Pour le moment, seule la faisabilité technique de cette valorisation a pu aboutir puisque la faisabilité économique reste encore grevée par le coût de l'étape de conversion de la biomasse en sucres fermentescibles. Par conséquent, il existe des verrous économiques à lever, transcrits en verrous technologiques, avec la nécessité

simultanée de diminuer les coûts de production des enzymes et d'améliorer l'efficacité des biocatalyseurs produits.

Dans ce contexte, le groupe Soufflet a choisi de réaliser une diversification stratégique de ses métiers afin de valoriser au mieux ses agro-ressources et les différents coproduits de ses usines. Pour cela, il a initié, en 2008, le programme OSIRIS visant au développement d'une nouvelle filière technologique de fermentation en milieu solide, unique en Europe, notamment en travaillant sur la normalisation et la standardisation de ce bioprocédé, tout en cherchant à provoquer un changement de paradigme quant à la production conventionnelle de biocatalyseurs par fermentation en milieu liquide ou submergé, à l'aide d'organismes génétiquement modifiés, et à l'utilisation d'enzymes traditionnellement purifiées. L'ensemble de ces efforts ayant pour vocation de favoriser l'émergence d'une technologie de rupture jugée potentiellement plus performante et plus compétitive, pour certains marchés, que la fermentation en milieu submergé.

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé dans le cadre du projet Cellignozym, l'un des projets du programme OSIRIS. L'objectif de ce projet était de développer des biocatalyseurs lignocellulolytiques par fermentation en milieu solide, puis de les comparer à ceux produits par fermentation en milieu submergé. Le groupe Soufflet, l'un des tout premier meunier européen, avait également choisi de baser cette étude sur le son de blé, un coproduit lignocellulosique issu du procédé de meunerie, disponible en grande quantité sur les sites industriels et présentant actuellement une valeur ajoutée limitée.

Bien que la comparaison en production des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu submergé ait fait l'objet de travaux durant cette thèse, nous avons délibérément choisi de ne pas aborder cette partie dans ce manuscrit puisque nous avons jugé l'intérêt scientifique limité, dû à l'absence d'échelle comparative faisant consensus, et l'approche trop économique, due à la nécessité d'une comparaison de ces bioprocédés au sein d'une chaîne de production, pour permettre une présentation critique objective. Aussi, la première partie de ce mémoire traitera de la comparaison en application de ces technologies lors de tests de saccharification. Ensuite, la seconde partie de ce manuscrit sera consacrée à l'étude de la conversion du son de blé et à la compréhension de la récalcitrance de cette biomasse. Enfin, la troisième et dernière partie des travaux présentés reposera sur l'étude pratique d'un concept innovant de procédé pour convertir l'ensemble des polysaccharides en bioproduits et permettre une autre utilisation du son de blé qu'en alimentation animale.

ETAT DE L'ART

1. CONTEXTE ET ENJEUX

Au début du XX^{ème} siècle, l'essor de l'exploitation pétrolière a permis d'accéder à une source d'énergie bon marché, notamment pour le secteur du transport avec le boom de l'automobile que l'on connaît, et a contribué pour une bonne part à la seconde révolution industrielle. Tout au long de ce siècle, l'utilisation du pétrole a ensuite progressivement continué son expansion et pris une part de plus en plus importante dans nos économies, provoquant de profondes mutations dans nos sociétés et une amélioration considérable du niveau de vie des populations des pays dits développés. Aujourd'hui, malgré les nombreux chocs pétroliers et bien que certains secteurs aient diminué leur dépendance vis-à-vis de cette matière première, le pétrole représente encore un poids important dans l'économie mondiale avec près de 41,2% de la consommation totale d'énergie finale en 2010 ^[1] et occupe toujours une place prépondérante dans de nombreux secteurs avec plus de 100 000 produits dérivés du pétrole (vêtements, engrais, médicaments, cosmétiques, insecticides, instruments chirurgicaux, puces et ordinateurs...) ^[2]. Cependant, à l'aube de ce XXI^{ème} siècle, la raréfaction et l'augmentation inéluctable des prix de cette ressource finie provoquera indéniablement de nouvelles mutations au sein de nos sociétés. Actuellement, l'une des principales ressources envisagées à moyen terme pour se substituer au pétrole est la biomasse. En 2010, elle représentait la première forme d'énergies renouvelables et la quatrième source d'énergie primaire consommée dans le monde (10,0%) après le pétrole (32,4%), le charbon (27,3%) et le gaz naturel (21,4%) ^[1]. A terme, l'exploitation de la biomasse et l'essor des biotechnologies, plus particulièrement des biotechnologies blanches, devraient permettre l'émergence des bioraffineries et faciliter la transition énergétique. Parallèlement à ce nouveau tournant majeur dans son histoire, l'humanité devra également répondre à de nombreux défis afin de réaliser sa troisième révolution industrielle.

1.1. LES DEFIS ENERGETIQUES, ECONOMIQUES ET GEOPOLITIQUES

Aujourd'hui, avec la flambée des prix du baril de pétrole et après avoir subi trois chocs pétroliers (1971-1978, 1978-1981 et 2003-2009), la nécessité d'une « révolution énergétique » et d'une substitution du pétrole se fait de plus en plus pressante. Les ruptures économiques liées à la raréfaction de cette matière première se produiront très prochainement, alors que la demande mondiale d'énergie primaire devrait continuer de croître de près de 35%, entre 2010 et 2035, en passant de 12,4 Gtep à 16,7 Gtep ^[3]. En effet, les modèles montrent que la

production mondiale de pétrole aurait déjà atteint son point culminant pour le pétrole conventionnel, léger et bon marché ^[4], ou culminera à l'horizon 2020-2030 pour le pic pétrolier global, c'est-à-dire prenant en compte le pétrole conventionnel et non conventionnel ^[5]. L'atteinte de ces pics contribuera à accentuer les tensions économiques et géopolitiques actuelles, notamment pour l'Europe qui doit importer 53,7% de l'énergie primaire qu'elle utilise et qui est dépendante à hauteur de 84,1% des importations de pétrole pour sa consommation intérieure brute ^[6]. L'importance d'avancées scientifiques concrètes permettant de substituer le pétrole et ses dérivés par des produits issus du carbone renouvelable, mais aussi de limiter la dépendance énergétique européenne, est donc plus que jamais nécessaire.

Depuis les années 70, un phénomène de désindustrialisation touche les pays dits développés, avec pour principale caractéristique la perte d'emplois industriels. Sur la période 1980-2007, la France a ainsi perdu 1,9 million d'emplois, soit près de 36% des effectifs de l'industrie ^[7]. La transition énergétique pourrait permettre d'enrayer ce phénomène et contribuer à une réindustrialisation en favorisant la création de nouvelles activités économiques fortement liées aux territoires ruraux. Selon une étude datant de 2010, le développement des bioraffineries pourrait ainsi créer en région agricole près de 141 000 emplois directs et indirects pour la France et près d'un million d'emploi en Europe d'ici 2020 ^[8]. Ces emplois nécessiteraient pour une bonne part de la main-d'œuvre qualifiée et non délocalisable. L'Europe, dans sa vision stratégique « Europe 2020 », a officiellement adopté et mis en avant ce concept de « croissance verte » qui figurera notamment comme un des cinq axes prioritaires de la nouvelle PAC ^[9, 10].

1.2. LES DEFIS ALIMENTAIRES ET SOCIETAUX

Selon les études prospectives de la division population des nations unies, la population mondiale devrait augmenter progressivement dans les années à venir et pourrait atteindre entre 8 et 11 milliards d'habitants à l'horizon 2050. En outre, la FAO prévoit également une augmentation de la demande mondiale en denrées alimentaires de 70% d'ici 2050, liée pour partie au changement de mode de consommation des populations des pays émergents (groupe des BRICS) ^[11], alors qu'actuellement émerge un contexte de ralentissement dans l'amélioration des cultures et de limitation pour les principales productions agricoles. Ces changements majeurs laissent présager des pressions accrues sur les ressources alimentaires et sur l'environnement, ainsi qu'une concurrence exacerbée pour l'accès aux ressources naturelles ^[9], ne laissant par conséquent guère d'autres places qu'aux usages alimentaires.

Bien qu'une amélioration puisse être envisagée sur le gaspillage de près d'un tiers de la production alimentaire mondiale ^[12], il faudra néanmoins limiter l'utilisation industrielle des parties alimentaires des plantes, notamment pour la production de bioéthanol aux Etats-Unis d'Amérique qui absorbe actuellement près de 40% de la production américaine de maïs ^[13], afin d'assurer la sécurité alimentaire et prévenir tout risque de crise alimentaire.

1.3. LES DEFIS CLIMATIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX

Depuis 1750, les activités de l'homme, liées à l'utilisation des ressources énergétiques d'origine fossile et à l'industrialisation de nos sociétés, ont provoqué une accumulation progressive de gaz à effet de serre persistants dans l'atmosphère (tableau n°1) et l'amorce d'un réchauffement climatique planétaire. Selon les scénarios climatiques établis par le GIEC et l'AIE, la hausse moyenne de la température à l'équilibre à la surface du globe en 2100 pourrait varier de + 2°C à + 6°C par rapport à l'ère préindustrielle ^[3, 14].

Tableau n°1 : Concentrations mondiales (fractions molaires) et évolution depuis 1750 des principaux gaz à effet de serre persistants ^[15].

	CO ₂	CH ₄	N ₂ O	CFC et gaz halogénés mineurs
Concentration moyenne mondiale en 2011	390,9 ± 0,1 ppm	1813 ± 2 ppb	324,2 ± 0,1 ppb	n.c.
Concentration moyenne mondiale en 2011 par rapport à l'année 1750*	+ 140%	+ 259%	+ 120%	n.c.
Contribution à l'augmentation du forçage radiatif global depuis 1750*	64%	18%	6%	12%

* En supposant une fraction molaire préindustrielle de 280 ppm pour le CO₂, de 700 ppb pour le CH₄ et de 270 ppb pour le N₂O.

En 1998, avec la signature du protocole de Kyoto, de nombreux états, dont ceux de l'Union Européenne, s'étaient engagés à réduire pour 2012 leurs émissions totales de gaz à effet de serre d'au moins 5% par rapport aux niveaux relevés en 1990. Afin de poursuivre cette lutte contre le réchauffement climatique, l'Europe s'est maintenant engagée à réduire d'ici 2020 ses émissions de gaz à effet de serre d'au moins 20% par rapport aux niveaux de 1990, et de 30% si les conditions sont favorables ^[9]. L'Union Européenne s'est donc

désormais orientée vers une économie à faible émission de carbone. Sur le long terme, une réduction de plus de 50% sera nécessaire afin de stabiliser les niveaux de gaz à effet de serre présents dans l'atmosphère.

1.4. LA TROISIEME REVOLUTION INDUSTRIELLE : L'ESSOR DES BIORAFFINERIES

Depuis 2006, J. Rifkin ^[16] défend la nécessité de réaliser une troisième révolution industrielle, notamment pour faire face à la raréfaction du pétrole. Pour cela, il propose d'établir une « économie décarbonée », c'est-à-dire produisant moins de gaz à effet de serre, en favorisant l'utilisation d'énergies renouvelables, dont la biomasse. En 2007, le Parlement européen a officiellement adopté cette vision.

Le concept de bioraffinerie ou raffinerie du végétal s'inscrit pleinement dans cette optique. Ce concept, né dans les années 1980 suite aux crises énergétiques pétrolières et concrétiser par la réforme de la PAC de 1992, se base sur le modèle de la raffinerie pétrolière consistant à utiliser du pétrole brut pour fabriquer des produits énergétiques (carburants et combustibles), des produits de base (issus de la pétrochimie) et des produits à usage spécifique (lubrifiants et solvants). Dans le cas de la bioraffinerie, il s'agit en fait de fractionner la matière première végétale, puis d'extraire et/ou de transformer les différents éléments afin d'obtenir des produits d'usage dans les domaines ^[17] :

- bioénergétique (biocarburants et additifs, biocombustibles) ;
- non énergétique :
 - biomatériaux (fibres, biopolymères, matériaux composites) ;
 - biomolécules issues de la chimie fine ou de la chimie verte (alcools, solvants, huiles et lubrifiants, tensioactifs, intermédiaires chimiques) ;
- alimentaire, agroalimentaire et traditionnel (ingrédients, auxiliaires de fabrication, principes actifs pour l'alimentation humaine et animale ou pour les cosmétiques).

Afin de respecter cet esprit de développement durable, les bioraffineries s'intègrent également dans une logique d'écologie industrielle, en tenant compte à la fois de l'aménagement du territoire qu'elles occupent et de l'optimisation des synergies possibles entre les différents sites de production, notamment en ce qui concerne la valorisation des coproduits et des rejets. L'une des bioraffineries les plus aboutie et servant actuellement de modèle de base est celle du complexe agro-industriel « Les Sohettes » de Pomacle-Bazancourt (figure n°1, page 31).

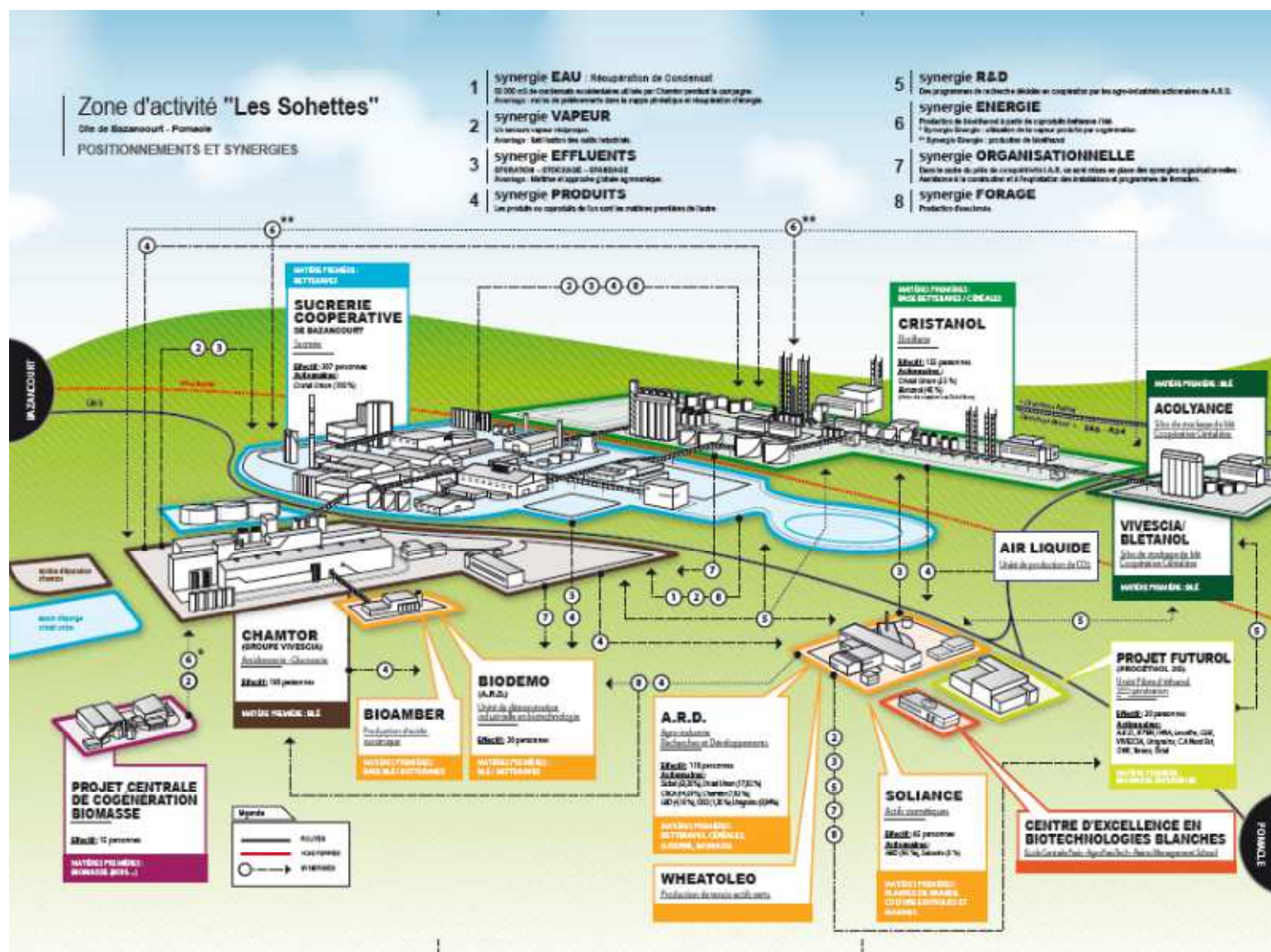


Figure n°1 : Un exemple de bioraffinerie : le complexe agro-industriel « Les Sohettes » de Pomacle-Bazancourt^[18].

Dans le contexte actuel, le développement des bioraffineries permettrait d'apporter une réponse aux nombreux défis à relever, notamment :

- en augmentant la sécurité énergétique nationale et/ou européenne ;
- en réduisant les émissions de gaz à effet de serre ;
- en utilisant des ressources renouvelables ;
- en permettant la création d'une industrie chimique biosourcée ;
- en permettant des bénéfices macroéconomiques pour les économies rurales et la société en général ^[19].

Cependant, des efforts de recherche et d'innovation sont encore indispensables pour permettre l'essor des bioraffineries. Selon le compte-rendu des premiers entretiens IAR ^[20], une des priorités serait de travailler au développement de nouveaux biocatalyseurs, en tenant compte des contraintes industrielles. Pour être plus précis, il faudrait pour obtenir un procédé plus économique et potentiellement viable :

- augmenter la productivité volumétrique des enzymes commerciales ;
- réduire le coût de production des enzymes, notamment en utilisant des matières premières abondantes et bon marché, et/ou améliorer les performances des biocatalyseurs ;
- produire des enzymes avec une plus haute activité spécifique sur substrat solide (le fractionnement de la cellulose en phase solide étant jugé comme une étape limitante de l'hydrolyse) ;
- améliorer le rendement de l'étape de conversion (prétraitement et hydrolyse enzymatique) ^[21, 22].

2. LE PROCEDE DE CONVERSION PAR VOIE BIOCHIMIQUE DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE EN BIOPRODUITS

Le procédé de conversion par voie biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioproduits est schématiquement composé des phases suivantes (figure n°2) :

- une phase de récolte, puis de stockage de la matière première ;
- une phase de prétraitement ;
- une phase d'hydrolyse enzymatique ;
- une phase de fermentation des hydrolysats en bioproduits ;
- une phase d'extraction et de purification des produits finaux.

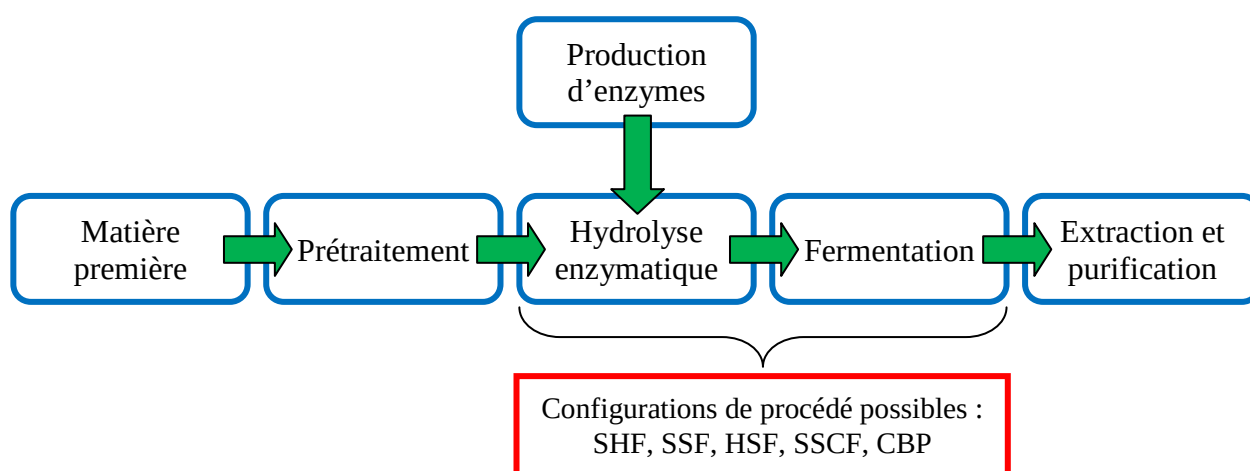


Figure n°2 : Représentation schématique du procédé de conversion par voie biochimique de la biomasse lignocellulosique en bioproduits.

(SHF : *Separate Hydrolysis and Fermentation* ; SSF : *Simultaneous Saccharification and Fermentation* ; HSF : *Hybrid Saccharification and Fermentation* ; SSCF : *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation* ; CBP : *Consolidated BioProcessing*)

Il existe différentes configurations de ce procédé dont les principales variantes concernent les phases d'hydrolyse enzymatique et de fermentation des hydrolysats en bioproduits. En effet, celles-ci peuvent être soit séparées (procédé de SHF ou *Separate Hydrolysis and Fermentation*), soit couplées (procédé de SSF ou *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), soit réalisées selon un procédé intermédiaire entre les deux précédents (procédé de HSF ou *Hybrid Saccharification and Fermentation*). Il existe également encore deux autres conceptions de ce procédé : le procédé SSCF ou *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*, consistant à réaliser la fermentation simultanée de tous les glucides libérés (pentoses et hexoses), contrairement à une fermentation exclusive des

hexoses dans le cas du procédé SSF ; et le procédé CBP ou *Consolidated BioProcessing*, consistant à réaliser en une seule et même étape (ou un même réacteur) les phases de production d'enzymes, d'hydrolyse enzymatique et de fermentation des hydrolysats en bioproduits ^[23].

2.1. LA MATIERE PREMIERE

2.1.1. Le blé

Le blé est une plante herbacée annuelle appartenant à la classe des monocotylédones commélinoides, à la famille des Poacées ou Graminées et au genre *Triticum*. Il existe de nombreuses espèces de blé dont les deux principalement cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*). En 2010, les principales utilisations de ces cultures étaient en alimentation humaine (farines, semoules,...) pour 69,25%, en alimentation animale pour 18,07%, en tant que semence pour 9,75% et en applications industriels (amidonnerie, glucoserie,...) pour 2,93% ^[24]. Le blé représentait alors la quatrième culture de la planète avec près de 653,6 millions de tonnes produites, la troisième plus importante culture céréalière au monde après le maïs et le riz, et enfin la culture la plus répandue sur terre avec 217,2 millions d'hectares récoltés. La France était alors le cinquième producteur mondial et le premier producteur européen de blé avec près de 40,8 millions de tonnes produites (tableau n°2) ^[25].

Tableau n°2 : Les dix principaux pays producteurs de blé au monde en 2010 ^[25].

Rang	Pays	Production (milliers de tonnes)	Pourcentage de la production mondiale (%)
1	Chine	115 181	17,62
2	Inde	80 800	12,36
3	Etats-Unis d'Amérique	60 062	9,19
4	Fédération de Russie	41 508	6,35
5	France	40 787	6,24
6	Allemagne	24 107	3,69
7	Pakistan	23 311	3,57
8	Canada	23 167	3,54
9	Australie	22 138	3,39
10	Turquie	19 660	3,00
Union Européenne		139 073	21,28
Monde		653 654	100

2.1.2. Le grain de blé

Le grain de blé est un caryopse, c'est à dire un fruit sec et indéhiscant dont la graine est intimement soudée à l'enveloppe qui la renferme. De forme ovoïde, il possède un pôle apical surmonté d'une brosse, un pôle basal où se trouve le germe et présente un sillon s'étendant sur toute sa longueur (figure n°3) ^[26]. Le grain de blé est composé de trois parties distinctes :

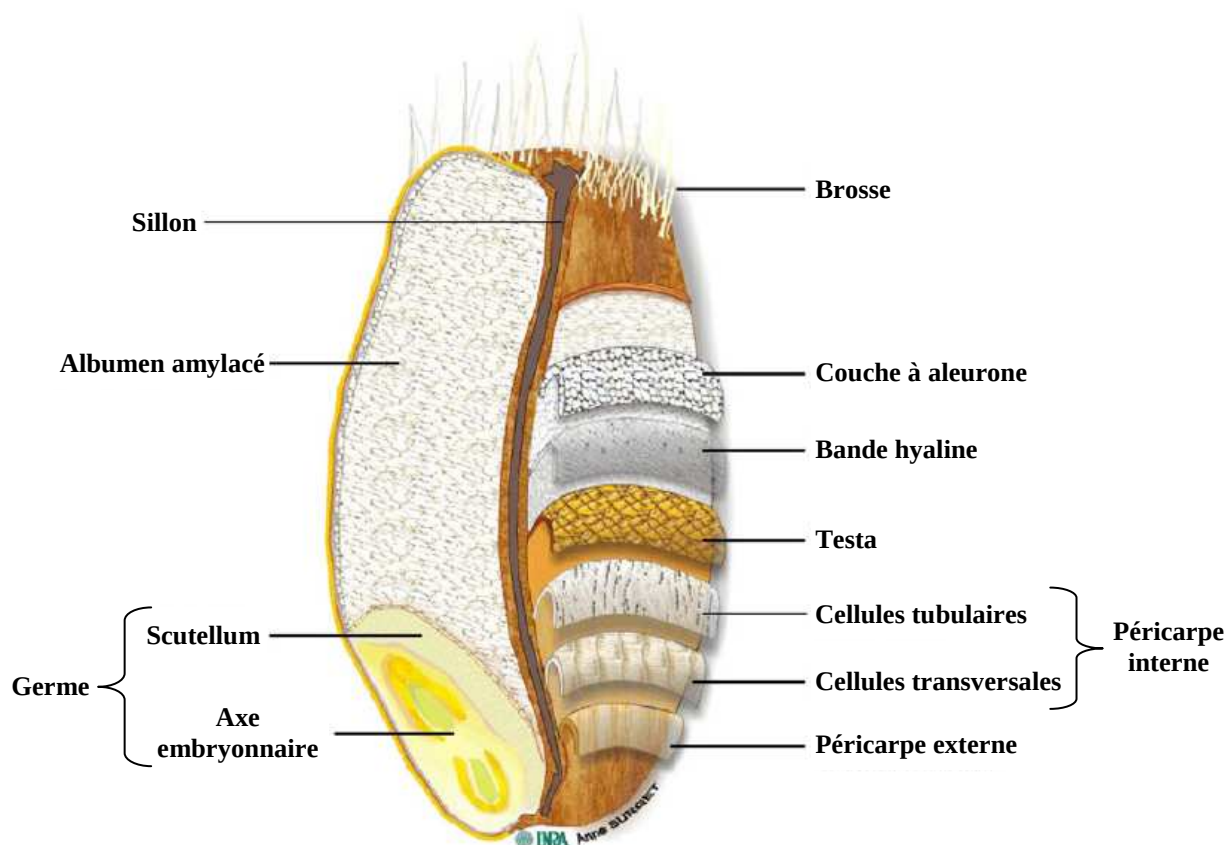


Figure n°3 : Schéma d'un grain de blé mature en coupe longitudinale ^[26].

- Le germe

Le germe représente entre 2 et 4% de la masse totale du grain de blé et est constitué de deux parties : l'axe embryonnaire et le cotylédon embryonnaire, aussi appelé scutellum. Il contient beaucoup de lipides, mais aussi des vitamines et des minéraux ^[26, 27].

- L'albumen amylicé ou endosperme

L'albumen amylicé représente entre 80 et 85% de la masse totale du grain de blé ^[27]. Il est composé de granules d'amidon sphériques et lenticulaires enchâssés dans une matrice

protéique viscoélastique, appelé gluten. Les cellules composant ce tissu sont mortes et possèdent des parois relativement minces, constituées de microfibrilles de cellulose dont la surface est associée à un réseau d'arabinoxylanes, de β -glucanes à liaisons mixtes, de glucomannanes et de protéines ^[28].

- Le son de blé

Le son de blé est une enveloppe externe multi-lamellaire composée des tissus maternels (bande hyaline, testa, péricarpe et cuticule), au sens anatomique du terme, additionné de la couche aleurone et de restes de l'endosperme, au sens industriel du terme (figure n°4). Il représente entre 11 et 15% de la masse totale du grain de blé ^[27] et son rôle est de protéger la graine. La composition biochimique du son de blé industriel comprend de 22 à 25% de (glucurono)arabinoxylanes, de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à 10% de lignine, des β -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement ^[29]. Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des (glucurono)arabinoxylanes ^[30].

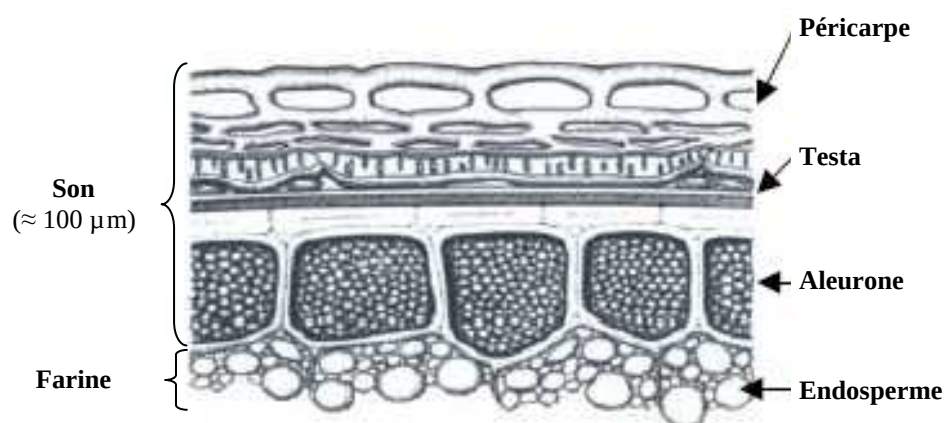


Figure n°4 : Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé industriel ^[26, 31].

2.1.3. Le son de blé

Le son de blé est un coproduit des minoteries et des semouleries dont la production annuelle est estimée à 2 millions de tonne pour la France et à 6 millions de tonne pour l'Europe ^[32]. Actuellement, il est principalement destiné à l'alimentation animale et pour une petite part à l'alimentation humaine. Le son de blé est histologiquement composé des couches cellulaires suivantes :

- **La couche à aleurone ou assise protéique**

La couche à aleurone correspond à la partie externe de l'albumen amylicé et représente entre 6 et 9% de la masse totale du grain de blé ^[27]. Elle est composée d'une couche unique de cellules vivantes (37-65 μm $\times$ 25-75 μm) dont le cytoplasme contient de nombreuses vacuoles remplies d'enzymes hydrolytiques et d'antagonistes protéiques (inhibiteurs de ces mêmes enzymes). Les cellules de cette couche sont riches en protéines, en lipides et en micronutriments (minéraux, vitamines et antioxydants), mais ne contiennent pas d'amidon ^[26, 33]. Les parois constituant ces cellules sont épaisses (jusque 8 μm d'épaisseur) et présentent une composition relativement proche de celles de l'albumen amylicé avec majoritairement des arabinoxylanes ($\approx$ 60%), des β -glucanes à liaisons mixtes ($\approx$ 25%), et de faibles quantités de glucomannanes et de cellulose ^[33]. En outre, ces parois ne sont pas lignifiées, mais possèdent une proportion importante d'acides phénoliques, principalement sous forme d'acide férulique estérifié aux arabinoxylanes. Enfin, les arabinoxylanes de cette couche cellulaire présentent une chaîne principale plus longue mais moins substituée (ratio arabinose/xylose ou A/X de 0,44) que dans le péricarpe ^[33, 34].

- **La bande hyaline ou couche nucellaire**

La bande hyaline a un aspect transparent. Elle est constituée de l'épiderme du nucelle, recouvert d'une cuticule, et du lysat cellulaire ^[26]. Cette couche est composée de cellules mortes et allongées (125-210 μm $\times$ 25-30 μm), possédant de fines parois principalement constituées d'arabinoxylanes faiblement substitués (ratio A/X de 0,12) ^[26, 34]. Les parois de ces cellules sont dépourvues de lignine et les acides phénoliques présents dans cette couche sont en majorité sous la forme de monomère d'acide férulique ^[33, 35].

- **La testa ou endotesta ou tégument séminal**

La testa représente 1% de la masse totale du grain de blé ^[27]. Elle est cloisonnée par deux épaisses cuticules, d'où sa richesse en lipides, et joue un rôle important dans la circulation de l'eau entre l'extérieur et la graine ^[33]. La testa est composée de cellules mortes (100-150 μm $\times$ 9-20 μm), réparties en deux couches, dont au moins une est pigmentée ^[26]. Les parois de ces cellules sont épaisses et contiennent des arabinoxylanes faiblement substitués (ratio A/X de 0,13), mais peu ou pas de cellulose. Enfin, les acides phénoliques trouvés dans cette couche sont en majorité sous forme d'acide férulique ^[33, 35].

- Le péricarpe

Le péricarpe représente entre 4 et 5% de la masse totale du son de blé et est constitué de deux parties : le péricarpe interne et le péricarpe externe ^[27]. Il joue un rôle dans la protection mécanique de la graine, dans la résistance face aux pathogènes et dans la régulation de l'absorption de l'eau ^[33].

- Le péricarpe interne

Le péricarpe interne est constitué de trois couches de cellules mortes : les cellules intermédiaires, les cellules tubulaires (120-250 μm $\times$ 12-15 μm) et les cellules transversales ou croisées (100-150 μm $\times$ 15-20 μm) ^[26]. Les parois de ces cellules sont épaisses et possèdent une composition biochimique comparable à celle du péricarpe externe, avec des (glucurono)arabinoxylanes fortement substitués (ratio A/X de 1,06). Les parois du péricarpe interne sont également lignifiées et présentent un faible contenu en composés phénoliques, principalement sous forme de déhydrodimère d'acide férulique ^[33, 35].

- Le péricarpe externe ou épicarpe ou *beeswing bran*

Le péricarpe externe est constitué de l'épiderme, recouvert d'une fine cuticule, et de l'hypoderme. Cette couche est composée de cellules mortes et allongées (125-210 μm $\times$ 25-30 μm) ^[26], présentant des parois épaisses majoritairement constituées de cellulose, de (glucurono)arabinoxylanes, de lignine, mais également de protéines et de composés phénoliques, principalement sous forme de déhydrodimère d'acide férulique ^[33]. Les (glucurono)arabinoxylanes présents dans cette couche sont très variés, avec un ratio global A/X de 1,16 ^[35], et comprennent : de petites quantités d'arabinoxylanes faiblement substitués, des quantités importantes d'arabinoxylanes hautement substitués, et de faibles quantités d'arabinoxylanes présents sous la forme d'un complexe arabinoxylane-xyloglucane, relié de manière covalente par de petites quantités de composés phénoliques ^[36].

2.1.4. Les parois cellulaires végétales et leur structure

Les parois cellulaires végétales sont des structures extracellulaires principalement composées de lignocellulose, un assemblage complexe de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, mais peuvent également contenir des proportions variables de pectines, de protéines, de lipides et de composés phénoliques ^[37]. Leur composition et leur structure varie énormément en fonction du type de cellule et de sa maturité, avec près de 35 sortes différentes

^[38], du tissu, de l'espèce et de la plante. Cependant, les parois cellulaires restent toujours construites selon le même modèle de base, comportant trois niveaux d'organisation hiérarchique liés à des stades successifs de maturation cellulaire, avec de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (figure n°5, page 40) :

- **La lamelle moyenne**

C'est une couche mitoyenne à deux cellules voisines, de 0,5 à 2 µm d'épaisseur ^[39], constituée presque exclusivement de lignine et de pectines. Elle est supposée renforcer la résistance des cellules et leur cohésion ^[40, 41].

- **La paroi primaire**

C'est une couche de 0,1 à 0,2 µm d'épaisseur ^[39], prépondérante chez les cellules jeunes. Sa nature souple et extensible permet l'allongement cellulaire. Elle est composée de microfibrilles de cellulose organisées au hasard, combinées avec de l'hémicellulose, des pectines, des glycoprotéines et emprisonnées dans un réseau de lignine ^[38, 42]. Sa composition biochimique varie en fonction de l'origine botanique de la plante et se distingue principalement en deux types :

- la paroi primaire de type I : c'est la paroi commune aux plantes à fleurs, sauf les Graminées. Elle est composée majoritairement de cellulose, d'hémicellulose (principalement sous forme de xyloglucane) et de 22 à 35% de pectines ;

- la paroi primaire de type II : c'est la paroi caractéristique de la famille des Graminées ou Poacées. Elle est composée majoritairement de cellulose, d'hémicellulose (principalement sous forme de (glucurono)arabinoxylane), d'une faible quantité de pectines (10%) et de composés phénoliques ^[43].

- **La paroi secondaire**

C'est une couche très épaisse, représentant les $\frac{3}{4}$ de la paroi cellulaire. Elle est majoritairement composée de cellulose (jusqu'à 45%), d'hémicellulose, et d'une petite quantité de pectines et de lignine. Sa structure est constituée de sous-couches distinctes de microfibrilles de cellulose cristalline (S1 de 0,1 à 0,3 µm, S2 de 1 à 5 µm, S3 de 0,1 µm d'épaisseur) ^[39] orientées presque perpendiculairement les unes par rapport aux autres. Cette organisation rend la paroi secondaire compacte, rigide et inextensible et confère une grande résistance mécanique à la cellule ^[38, 41, 42].

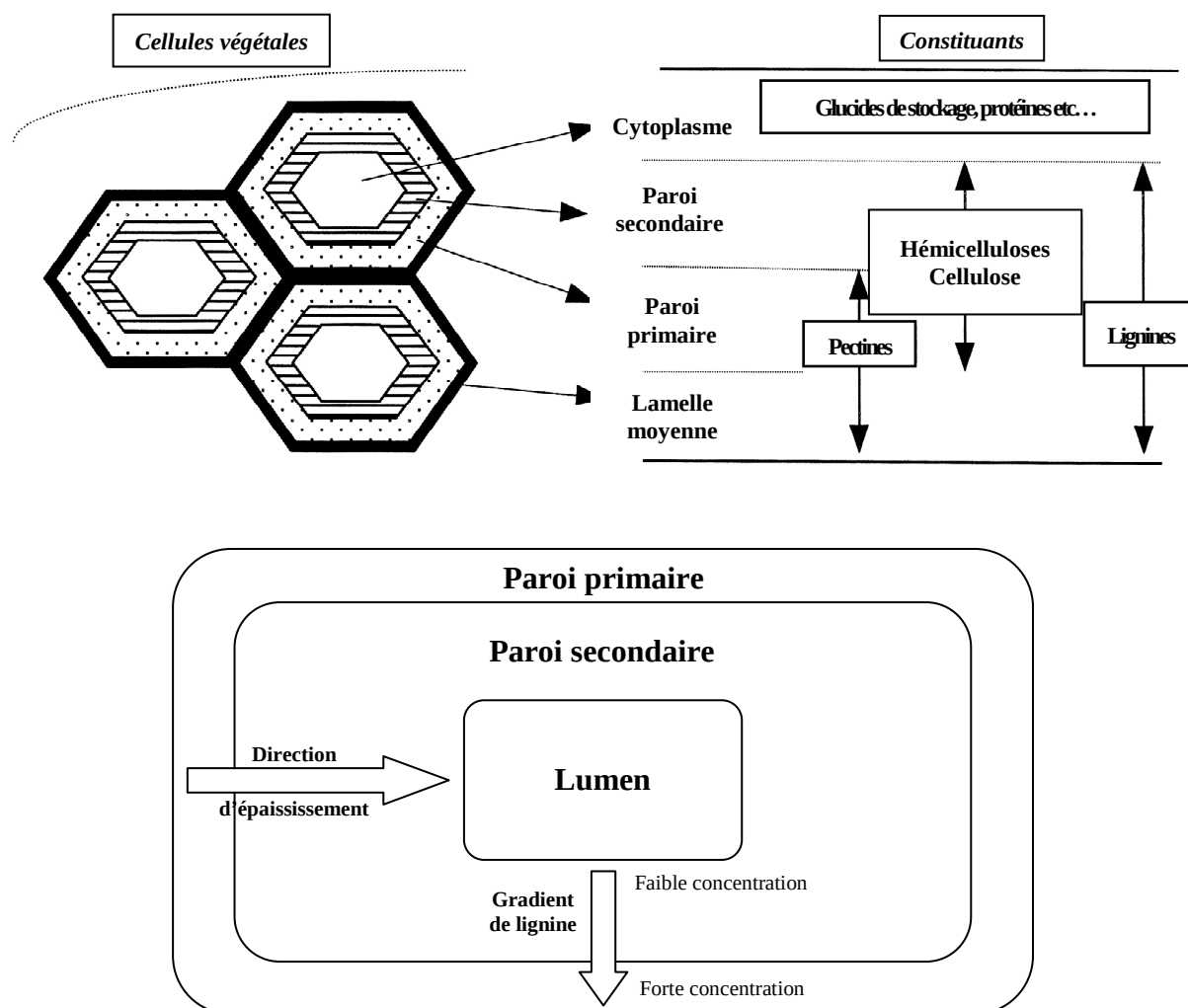


Figure n°5 : Représentation schématique de l'organisation des parois cellulaires végétales et de leur composition ^[40, 44].

2.1.5. Les principaux constituants des parois cellulaires végétales

Le principal constituant des parois cellulaires végétales est la lignocellulose. Elle représente la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète et plus de 70% de la biomasse produite sur la terre ^[17], avec une production annuelle estimée à 200 milliards de tonnes ^[45].

2.1.5.1. La cellulose

La cellulose est le plus important polysaccharide de la planète. Elle représente entre 20 et 50% de la matière sèche des parois cellulaires végétales ^[40, 46] et confère à la plante une grande résistance à la flexion et à la traction. D'un point de vue biochimique, la cellulose est

un homopolysaccharide linéaire et insoluble, composé d'unités D-anhydroglucopyranose reliées entre elles par des liaisons osidiques de type β -1,4. Selon l'origine végétale, son degré de polymérisation varie de 100 à 10 000 unités, et peut même atteindre 15 000 unités dans le cas du coton [5, 37, 46]. Les unités de base constituant ce polysaccharide sont alternativement inversées de 180° par rapport au plan de la molécule, faisant du cellobiose le plus petit motif de répétition de cette structure. Les chaînes de glucanes ou fibrilles élémentaires, composées de ce motif, sont regroupées pour former des microfibrilles de 3 à 5 nm de diamètre, dont le nombre peut varier de 36 chaînes de glucanes à plus de 200 chaînes chez les algues. Ces chaînes sont reliées entre elles par des liaisons répétitives de type Van der Waals et de type hydrogène, à la fois intermoléculaires, entre l'O3 et l'O5, et intramoléculaires (figure n°6) [37, 38].

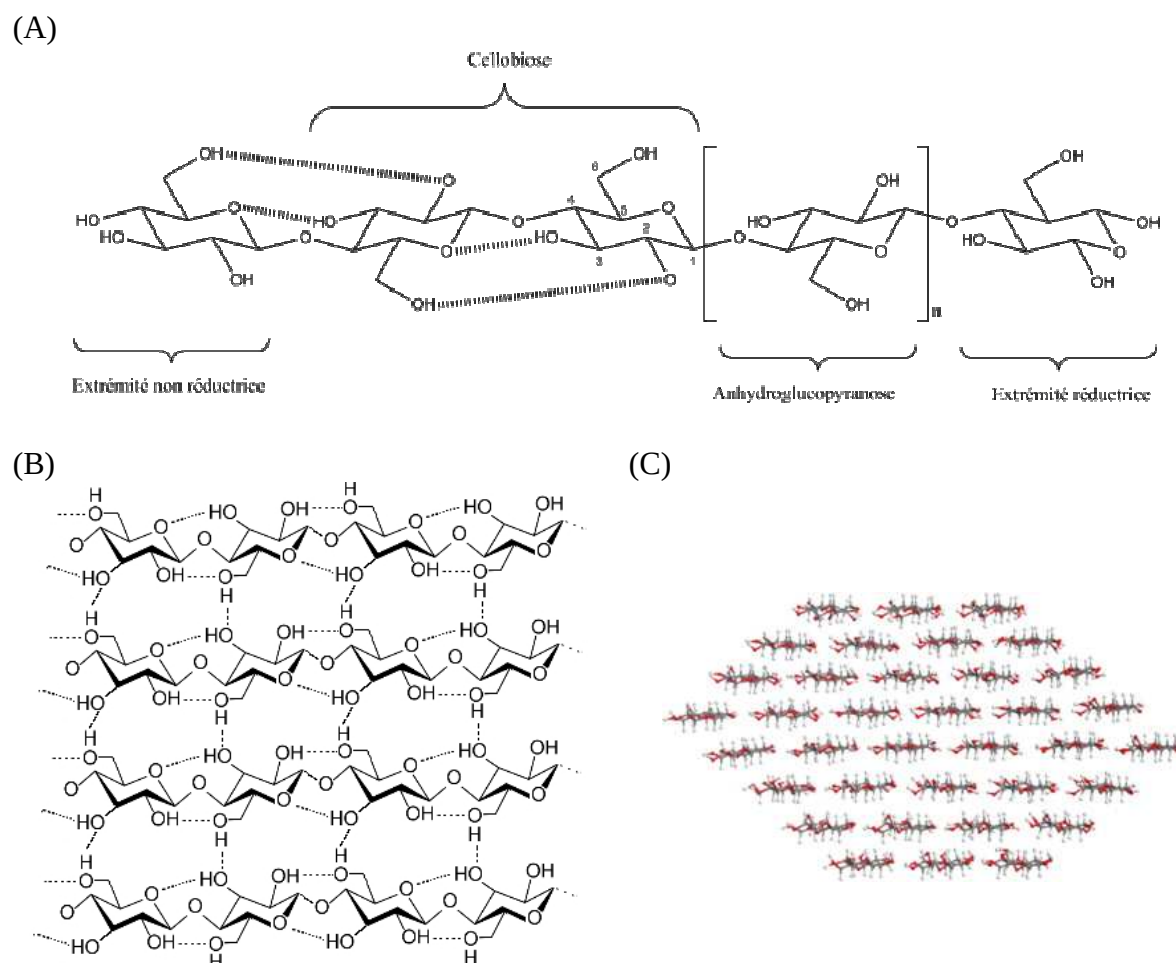


Figure n°6 : Structure de la cellulose : fibrille élémentaire (A), liaisons inter- et intramoléculaires (B), microfibrille de 36 chaînes de glucanes (C) [47, 48, 49].

Les microfibrilles de cellulose sont composées de trois groupes de chaînes de glucanes différant selon leur degré d'organisation : des chaînes cristallines rigides avec un degré d'organisation important (6 chaînes), des chaînes sous-cristallines avec un degré d'organisation modéré (12 chaînes), et des chaînes de surface sous-cristallines avec un faible degré d'organisation (18 chaînes). Le cœur de cette structure est hydrophobe (interactions hydrophobes entre les feuillets de cellulose), rigide et hautement résistant à l'hydrolyse chimique et enzymatique, tandis que la surface est amorphe. Cette structure confère solidité, stabilité, rigidité, mais aussi élasticité à la fibre de cellulose ^[50]. Enfin, la cellulose existe sous deux formes thermodynamiques (type I ou II), différant selon l'orientation des chaînes de glucanes. La cellulose de type I représente la forme native et la plus répandue avec des chaînes de glucanes exclusivement parallèles. Elle se compose de deux formes : la forme I α composant majoritairement les algues et les bactéries, et la forme I β composant majoritairement les plantes et les tunicates ^[51].

2.1.5.2. L'hémicellulose

L'hémicellulose est la seconde source de polysaccharide de la biosphère et représente entre 15 et 35% de la matière sèche des parois cellulaires végétales ^[52, 53]. Elle est présente dans toutes les plantes vertes et se retrouve principalement dans la paroi primaire et la paroi secondaire où elle joue un rôle de renforcement. Au sein de la paroi, l'hémicellulose forme un réseau robuste en s'associant étroitement à la surface des microfibrilles de cellulose via des liaisons hydrogène et en se liant à la lignine par l'intermédiaire d'acides hydroxycinnamiques via des liaisons covalentes de type ester. D'un point de vue biochimique, l'hémicellulose représente un groupe hétérogène de polysaccharides branchés, composés d'un mélange de pentoses (D-xylose, L-arabinose majoritairement en configuration furanose), d'hexoses (D-mannose, D-glucose, D-galactose) et d'acides uroniques (glucuroniques, galacturoniques avec de méthylations (4-O) et des branchements) ^[53]. Elle est amorphe, insoluble dans l'eau et possède une masse molaire relativement basse, avec un degré de polymérisation variant de 100 à 200 résidus. La nature de sa structure, le type et la fréquence des branchements peuvent varier d'une espèce de plante à une autre, d'un tissu à un autre, et au sein d'une même cellule. L'hémicellulose est principalement composé de quatre groupes de polysaccharides constitués d'un squelette de résidus β -(1,4)-D-pyranose : les xyloglucanes ; les xylanes comprenant les glucuronoxyanes, les arabinoxylanes, les glucuronoarabinoxylanes et les homoxyanes non

substituées ; les mannanes comprenant les galactomannanes et les galactoglucomannanes ; les β -(1,3 ; 1,4)-glucanes ou β -glucanes à liaisons mixtes ^[52].

L'hémicellulose est le principal composant du son de blé, représentant près de 30 à 40% de la matière sèche, et se retrouve sous trois formes :

1) Sous la forme de (glucurono)arabinoxylanes (figure n°7). Ce type de polysaccharide est constitué d'une chaîne principale de xylane branchée en α -1,2 et/ou en α -1,3 par de courtes chaînes d'arabinose (principalement), d'acide acétique, d'acide glucuronique ou son dérivé 4-O-méthyle ^[54]. Il présente également des branchements d'acide férulique estérifié aux arabinose et des traces de galactopyranose lié en α ^[55]. Le taux de substitution des arabinoxylanes varie et augmente de l'intérieur (la couche aleurone) vers l'extérieur (le péricarpe) du son de blé.

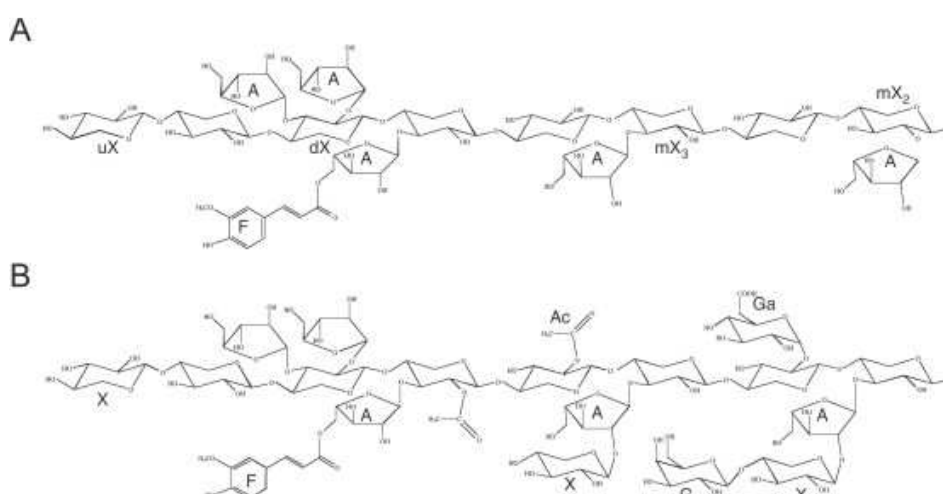


Figure n°7 : Les principaux arabinoxylanes présents dans le blé : dans l'endosperme (A) ; dans le péricarpe (B) ^[56].

(A : arabinose, X : xylose, G : galactose, Ac : acide acétique, Ga : acide glucuronique, F : acide férulique, uX : xylose non substitué, dX : xylose disubstitué, mX₃ : xylose monosubstitué en O3, mX₂ : xylose monosubstitué en O2)

2) Sous la forme de β -glucanes à liaisons mixtes. Ce type de polysaccharide est composé d'une longue chaîne non ramifiée de résidus D-glucose reliés par un mélange de liaisons β -1,3 ou β -1,4, avec cependant une absence de liaisons β -1,3 consécutives, et est principalement composé (à plus de 90%) par deux motifs de structure : du cellotriose et du cellotetraose, le restant étant des penta à nona glucose (moins de 10%). Le rapport tri- et tetra-

est variable et dépend du type de céréale, avec dans le cas du son de blé, un ratio de 4,5 ^[52, 57]. Les β -glucanes à liaisons mixtes sont exclusivement retrouvés dans la couche aleurone.

3) Sous la forme de xyloglucanes. Ce type de polysaccharide est composé d'un squelette d'unités glucose, greffés par des résidus xylose en α -1,6, de galactose greffés en β -1,2 sur les résidus xylose et de fucose greffés en α -1,2 sur les résidus galactose. Les xyloglucanes sont exclusivement retrouvés dans le péricarpe ^[36, 52].

2.1.5.3. Les pectines

Les pectines représentent la troisième source de polysaccharides retrouvés dans les parois cellulaires végétales et sont principalement présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire. Elles forment un groupe de polysaccharide hétérogène composé des homogalacturonanes, des rhamnogalacturonanes de type I et des rhamnogalacturonanes de type II. La structure de ces polysaccharides est formée d'une chaîne principale linéaire d'acides galacturoniques reliés par des liaisons en α -1,4, éventuellement alternés avec des résidus L-rhamnose en α -1,2. Cette chaîne principale peut avoir différents branchements (acétylation et méthylation) avec du L-rhamnose, de l'arabinose, du galactose ou du xylose en fonction de la plante. Dans le son de blé, les pectines représente entre 0,6 et 2% de la matière sèche ^[33, 58].

2.1.5.4. Les lipides

Les lipides représentent environ 4% de la matière sèche du son de blé. Ils sont composés de polyesters d'acides gras hydroxy- et époxy-substitués et sont principalement présents au niveau de la testa sous la forme d'assises cuticulaires. Ils participent à la résistance aux stress biotiques et abiotiques en formant une barrière physico-chimique sélective au passage de nombreux composés ^[33].

2.1.5.5. Les protéines

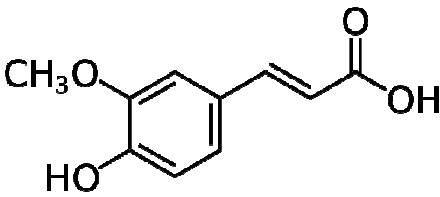
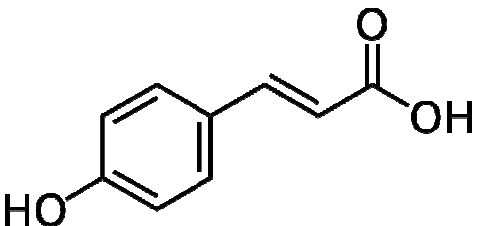
Les protéines représentent entre 10 et 20% de la matière sèche du son de blé et sont essentiellement contenues dans le cytoplasme des cellules de la couche aleurone. Elles sont également présentes en faibles quantités dans les parois des différentes couches cellulaires du

son de blé où elles contribuent à la mise en place de leur structure par des liaisons entre les acides aminés aromatiques de deux protéines ou entre les acides aminés aromatiques (tyrosine) d'une protéine et les arabinoxylanes (via l'acide férulique) ^[28, 33].

2.1.5.6. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des acides hydroxycinnamiques, dérivés de l'acide cinnamique. Les principales formes retrouvées chez les monocotylédones, comme le blé, sont l'acide férulique (acide 4-hydroxy 3-méthoxycinnamique) et l'acide para-coumarique (acide para-hydroxycinnamique) (tableau n°3). D'autres composés aromatiques comme l'acide synapique, l'acide syringique, l'acide caféique, l'acide vanillique et l'acide parahydroxybenzoïque sont cependant présents mais en moindre quantité ^[59].

Tableau n°3 : Les principaux acides phénoliques présents dans le son de blé.

	
Acide férulique (Acide 4-hydroxy 3-méthoxycinnamique)	Acide para-coumarique (Acide para-hydroxycinnamique)

L'acide férulique est le plus abondant des acides hydroxycinnamiques contenus dans les parois cellulaires végétales des céréales et représente près de 95% des acides phénoliques présents dans le son de blé. Il est majoritairement présent sous la forme de monomère (principalement contenu dans la couche aleurone), mais 39% serait présent sous la forme de dimère et un peu sous la forme de trimère et de tétramère, indiquant par là un haut degré de réticulation. Les déhydrodimères d'acides féruliques seraient principalement concentrés dans le péricarpe, contrairement à la couche aleurone qui en contiendrait peu, et seraient majoritairement liés sous la forme 8-O-4', bien que d'autres liaisons existent (8-5' ; 5-5' ; 8-8' ; 4-O-8' ; 5'-5'') (figure n°8, page 45) ^[35].

Les acides phénoliques (férulique et coumarique) jouent principalement le rôle de liaison, en étant liés de manière covalente aux arabinoxylanes par des liaisons de type ester

sur l'O5 des chaînes latérales d'arabinose et aux composants de la lignine par des liaisons de type éther. Les acides phénoliques permettent également l'établissement de pont entre deux chaînes d'arabinoxylanes (liaisons ester-ester), entre une protéine de structure et un arabinoxylane (liaison tyrosine-acide férulique) ^[28]. Pour finir, les acides phénoliques joueraient un rôle dans la protection contre les attaques microbiologiques en servant d'inhibiteurs.

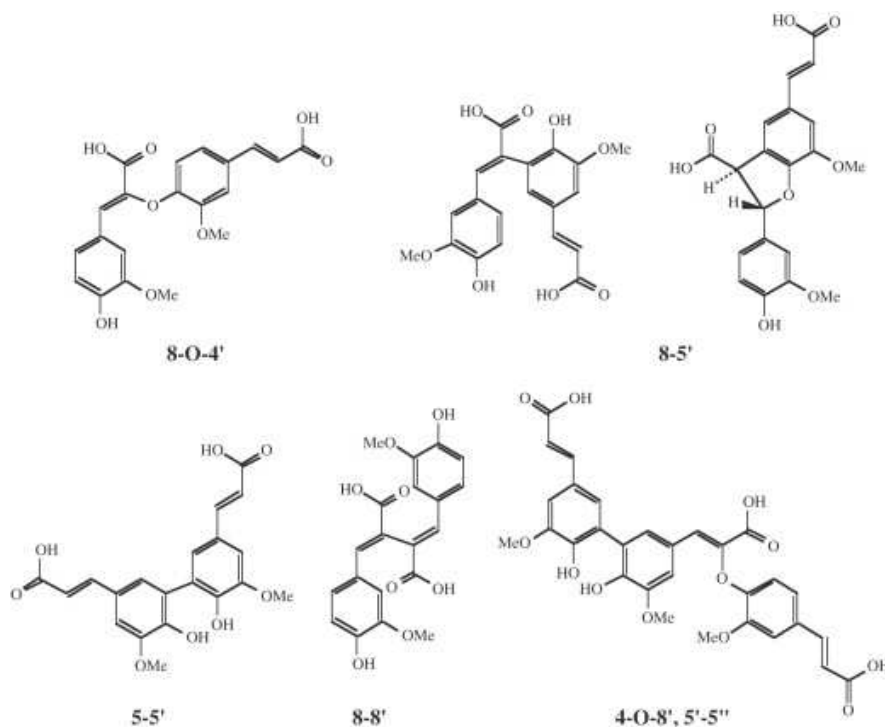


Figure n°8 : Les différents déhydrodimères et déhydrotrimères d'acide férulique présents dans les grains de céréales ^[60].

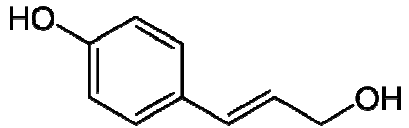
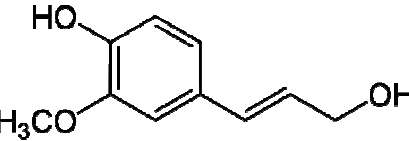
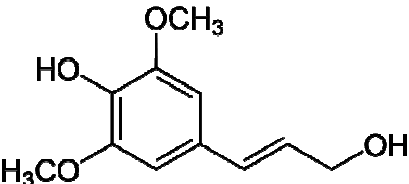
2.1.5.7. La lignine

La lignine est un terme générique définissant un vaste groupe de polymères aromatiques complexes, représentant entre 10 et 30% de la matière sèche des parois cellulaires végétales ^[37]. Elle est principalement présente dans les plantes vasculaires où elle joue un rôle important dans le soutien mécanique, en conférant dureté et résistance à la compression, et dans le transport de la sève, en conférant une imperméabilité. Elle permet également de protéger les polysaccharides des agressions extérieures (biotiques et abiotiques), notamment de la dégradation microbienne en conférant une résistance par l'inhibition à la

pourriture et représente donc un des principaux facteurs limitant la bioconversion de la biomasse ^[33, 61].

La lignine est un hétéropolymère de très haute masse moléculaire, amorphe et hydrophobe, possédant une structure tridimensionnelle extrêmement ramifiée et réticulée. Elle est constituée d'unités phénylpropanoïdes, dérivés d'unités phénylpropanes. La lignine se forme aléatoirement à partir de la polymérisation de trois types d'alcools hydroxycinnamyliques ou monolignols ou 4-hydroxyphénylpropanoïdes : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, précurseurs respectifs du para-hydroxyphényle (H), guaïacyle (G) et siryngyle (S), unités de base de la lignine (tableau n°4) ^[61].

Tableau n°4 : Les précurseurs et unités de base de la lignine.

Monolignols	Unités de base de la lignine	Structure
Alcool para-coumarylique	H ou para-hydroxyphényle	
Alcool coniférylique	G ou Guaïacyle	
Alcool sinapylique	S ou Siryngyle	

Les liaisons entre les monolignols sont extrêmement variables, mais peuvent être classées :

- en liaisons labiles ou non condensées de type β -aryl éther (β -O-4), impliquant principalement les unités S ;
- en liaisons résistantes ou condensées, comme les liaisons biphényles (5-5), impliquant principalement les unités G et H.

La proportion des différentes unités et la fréquence des liaisons intermonomères varient en fonction de la lignée végétale, de l'espèce, du tissu, de la strate pariétale, de l'âge des cellules et de l'environnement (figure n°9, page 48). La lignine des angiospermes monocotylédones contient les trois unités de base (H, G et S), mais elle est majoritairement

composée d'unités G et S. Au sein de la paroi, la concentration en lignine est la plus importante dans la lamelle moyenne et la paroi primaire, mais la quantité totale la plus élevée est dans la couche S2 de la paroi secondaire, du fait de son épaisseur. Pour finir, l'association de la lignine à l'hémicellulose se fait par l'intermédiaire des acides phénoliques, reliés aux chaînes aliphatiques de la lignine ^[61].

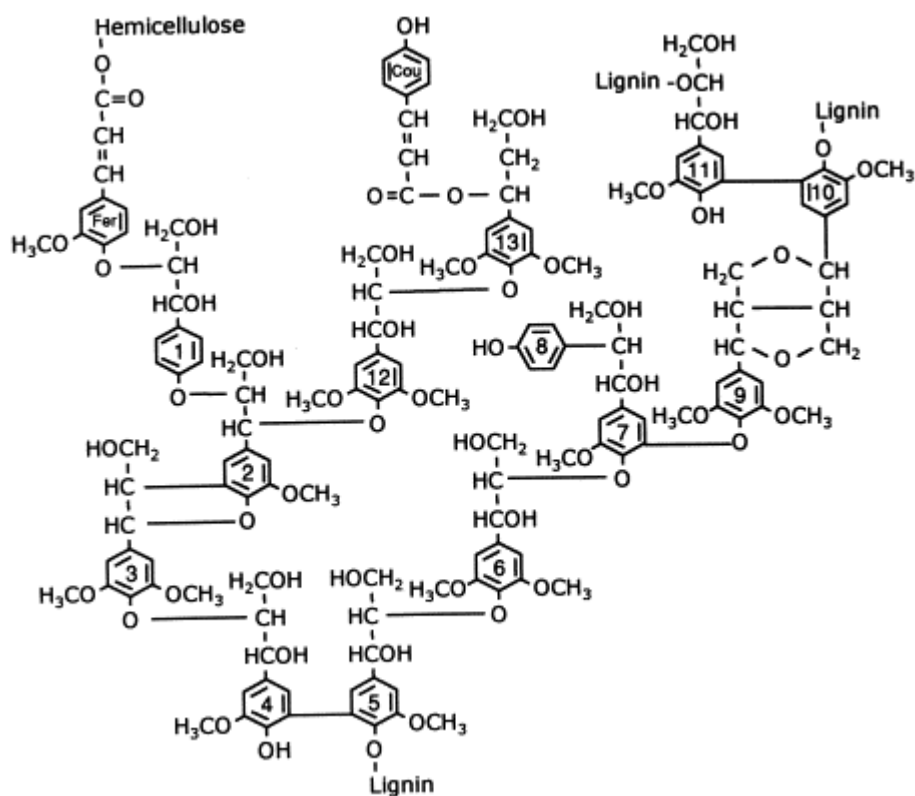


Figure n°9 : Schéma hypothétique de la lignine de blé ^[62].

2.2. LE PRETRAITEMENT

Le prétraitement de la biomasse lignocellulosique est le deuxième poste de coût dans le procédé de conversion par voie biochimique ^[63]. Il a pour but de déstructurer la rigidité macroscopique de la biomasse, de réduire la barrière physique au transfert de masse des agents chimiques ou enzymatiques ^[64], et de lever les limitations dues à la structure physico-chimique et à la nature des composés de la biomasse. Pour cela, il doit notamment permettre :

- d'améliorer l'accessibilité à la cellulose en rompant la structure de l'hémicellulose et de la lignine ;
- d'augmenter la surface accessible et la porosité en diminuant la taille des particules ;
- de diminuer le degré de polymérisation, plus particulièrement celui de la lignine et de la cellulose ;
- de réduire le taux de cristallinité de la cellulose ^[64].

De nombreux types de prétraitements peuvent être utilisés (tableau n°5, page 50) dans le procédé de conversion par voie biochimique dont le choix variera en fonction de la matière première et de l'intégralité du procédé (efficacité du prétraitement et coût relatif à l'économie de production). Cependant, pour être jugé efficace et économiquement acceptable, un prétraitement doit permettre :

- de limiter le broyage de la matière première (taille des particules à atteindre) ;
- de rendre la biomasse hautement hydrolysable par attaque enzymatique, sans provoquer de perte significative des sucres (hexoses et pentoses) ;
- d'utiliser un contenu en biomasse élevé ;
- de récupérer la lignine et les autres constituants afin de permettre leur valorisation ;
- d'éviter ou de limiter la génération de produits de dégradation toxiques ou de composés inhibiteurs des enzymes et/ou des micro-organismes (furfural, 5-hydroxyméthylfurfural, acides organiques (acétique, formique, lévulinique) et composés phénoliques) ;
- d'éviter ou de limiter le traitement des effluents ;
- de limiter le CAPEX (matériel simple, peu volumineux et peu onéreux) et l'OPEX (consommation de vapeur, d'électricité, de réactifs chimiques avec ou sans recyclage, énergie requise pour l'agitation,...) ^[63, 65, 66].

Tableau n°5 : Les principaux types de prétraitements ^[64, 65].

PROCEDES	TYPE	PRINCIPE
PHYSIQUES	MECANIQUE	La biomasse subit un broyage mécanique intense, par voie sèche ou par voie humide, jusqu'à atteindre la taille de particules souhaitée.
	EXTRUSION	La biomasse est chauffée, homogénéisée et cisailée durant son passage dans une extrudeuse.
	PYROLYSE (THERMOLYSE)	La biomasse est chauffée à une température inférieure à 300°C (en absence d'oxygène).
	MICRO-ONDE	La biomasse est traitée avec une solution alcaline diluée et soumise à des rayonnements micro-ondes.
PHYSICO- CHIMIQUES	EXPLOSION A LA VAPEUR (AUTO-HYDROLYSE)	La biomasse est chauffée rapidement (généralement à une température comprise entre 160 et 260°C) par injection de vapeur saturée, sous haute pression (10-50 bar), pendant quelques secondes à quelques minutes et subit ensuite une détente brutale (décompression explosive) de la pression jusqu'à l'atmosphère. Le traitement peut se faire avec de la vapeur d'eau, avec du CO ₂ , ou de l'ammoniac liquide (AFEX) et la réaction peut éventuellement être catalysée (H ₂ SO ₄ , SO ₂).
	THERMOHYDROLYSE (LIQUID HOT WATER)	La biomasse est cuite à l'eau à une température comprise entre 160 et 240°C, sous forte pression (supérieure à 5 MPa), pendant 15 à 60 minutes.
CHIMIQUES	ACIDE	La biomasse est traitée avec un acide minéral (sulfurique, phosphorique, chlorhydrique, nitrique) ou organique (maléique, fumarique), dilué ou concentré, et chauffée à une température comprise entre 50 et 200°C selon la concentration en matière sèche.
	ALCALIN	La biomasse est traitée avec une solution alcaline (soude, potasse, chaux ou ammoniaque) et chauffée à une température comprise entre 80 et 120°C pendant 30 à 60 minutes.
	SOLVANT (ORGANOSOLV)	La biomasse est traitée avec un solvant organique (méthanol, éthanol, acétone, éthylène glycol,...) ou un mélange solvant organique/milieu aqueux et un catalyseur acide (acide sulfurique, chlorhydrique, oxalique, salicylique, phosphorique), puis chauffée à une température comprise entre 150 et 200°C.
	OXYDATION CHIMIQUE	La biomasse est traitée avec un agent chimique (peroxyde d'hydrogène, acide peracétique), avec de l'ozone (ozonolyse à température ambiante) ou soumise à une oxydation humide sous haute pression en O ₂ ou en air et à une température supérieure à 120°C pendant 30 minutes.
	OXYDATION BIOLOGIQUE	La biomasse est traitée à l'aide des champignons de la pourriture blanche, brune ou molle.

2.3. LES PRINCIPAUX BIOCATALYSEURS LIGNOCELLULOLYTIQUES

Il existe principalement trois catégories d'enzymes nécessaires à la dégradation des parois cellulaires végétales :

- les cellulases ;
- les hémicellulases et les enzymes accessoires (glycosides hydrolases de débranchement et carbohydrates estérases) ;
- les éventuelles enzymes dégradant ou modifiant la lignine^[50].

2.3.1. Les cellulases et la cellulolyse

Les cellulases des champignons filamenteux se présentent sous la forme de complexes enzymatiques sécrétés dans le milieu de culture. Ces enzymes sont des protéines modulaires constituées d'un module catalytique, permettant l'hydrolyse d'une liaison osidique, d'où l'appellation de glycosides hydrolases, et d'un module de liaison ou CBM (*Carbohydrate Binding Module*), permettant à la fois de localiser et de déstructurer le substrat, facilitant ainsi l'interaction enzyme-substrat. Ces deux modules sont reliés entre eux par un pont peptidique^[5, 39, 67]. Le système cellulolytique servant de modèle de référence est celui de *Trichoderma reesei* et repose principalement sur l'action complémentaire de trois types d'enzymes :

- Les **endoglucanases** (EGs) ou 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4) qui hydrolysent de manière aléatoire les parties amorphes de la cellulose, principalement les chaînes de surface des microfibrilles, générant des oligosaccharides de différentes tailles pouvant rester liés à la fibre de cellulose jusqu'à un DP de 8, ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes. Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline.

- Les **exoglucanases** ou 1,4- β -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs) qui agissent de manière processive et s'adsorbent sur la cellulose en 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. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline.

- Les **β -glucosidases** (BGs) ou cellobiases ou β -D-glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21) qui hydrolysent le cellobiose ou les cello-oligosaccharides (DP inférieur à 6) en glucose. Elles n'ont pas d'action sur la cellulose insoluble^[39, 67].

Le complexe cellulolytique de *Trichoderma reesei* se compose de 80% de CBH (50-60% de CBHI et 12-20% de CBHII par rapport aux cellulases totales), de 20% d'EG (5-10% de EGI et 1-10% de EGII) et de moins de 1% de β -glucosidase (puisque la plupart de ces enzymes sont intracellulaires) ^[5].

Le mécanisme de dégradation de la cellulose ou cellulolyse (figure n°10, page 53), tout comme celui d'un polysaccharide pariétal, est un phénomène de catalyse enzymatique hétérogène et suit les étapes suivantes :

- Etape 1 : transfert de l'enzyme du milieu aqueux vers le polysaccharide insoluble et adsorption des enzymes (cellulases) sur le substrat à l'interface liquide-solide via le module de liaison grâce à des interactions non covalentes (hydrogène, électrostatique ou hydrophobe) ;
- Etape 2 : localisation d'une liaison susceptible d'être hydrolysée à la surface du substrat ;
- Etape 3 : formation du complexe enzyme-substrat (par insertion de l'extrémité de chaîne dans le tunnel catalytique pour initier l'hydrolyse) ;
- Etape 4 : hydrolyse de la liaison β -glycosidique et glissement simultanée vers l'avant de l'enzyme le long de la chaîne de cellulose ;
- Etape 5 : désorption des cellulases du substrat ou répétition de l'étape 4 ou des étapes 2/3 si ce n'est que le domaine catalytique se détache de la chaîne ;
- Etape 6 : transfert des produits de dégradation du polysaccharide vers le milieu aqueux et hydrolyse du cellobiose en glucose par la β -glucosidase (si cette enzyme est présente dans le cocktail enzymatique). ^[33, 68].

L'attaque initiale de la cellulose est la plus lente et la réaction d'hydrolyse des différents produits s'accélère. Au cours de cette hydrolyse, les produits d'inhibition (cellobiose, glucose) et les changements de propriété du substrat affectent les différentes étapes.

Lors de la cellulolyse, un certain nombre de synergies vont se produire entre :

- les exoglucanases et les endoglucanases ;
- les exoglucanases processives par l'extrémité réductrice et celles processives par l'extrémité non réductrice ;
- les exoglucanases et les β -glucosidases qui hydrolysent le cellobiose, produit final inhibiteur des cellobiohydrolases ;

- le module catalytique et le module de liaison composant les cellulases (endoglucanases et exoglucanases) pour produire des oligosaccharides et/ou du cellobiose [39, 69].

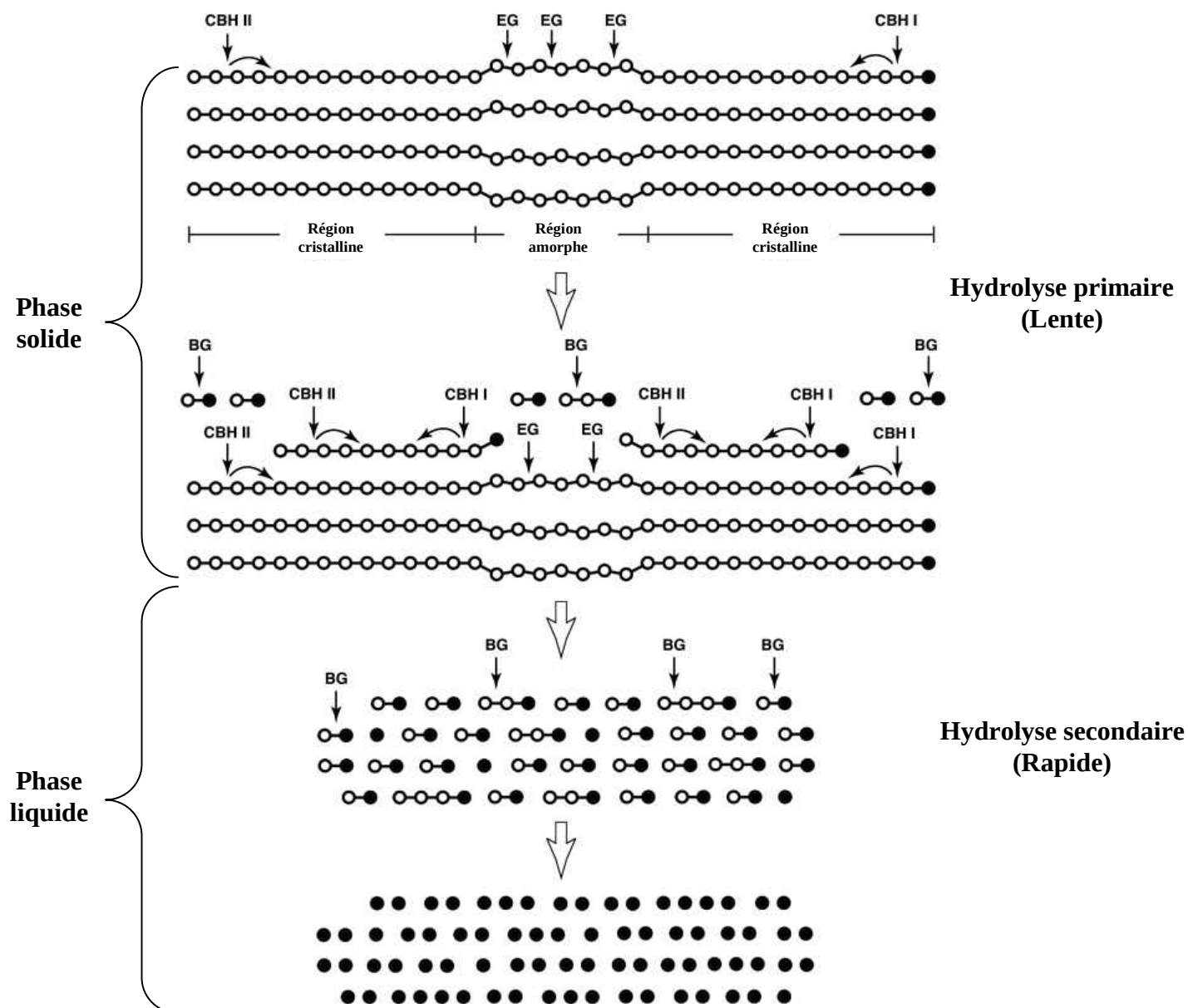


Figure n°10 : La cellulolyse [adaptée de 70].

(EG : endoglucanase, CBHI : cellobiohydrolase de type I, CBHII : cellobiohydrolase de type II, BG : β-glucosidase)

2.3.2. Les hémicellulases et les enzymes accessoires

Le groupe des hémicellulases est un groupe varié d'enzymes hydrolysant de façon synergique les différentes structures composant l'hémicellulose afin d'obtenir une dégradation complète. Ce sont des protéines modulaires comportant un module catalytique et un module de liaison (CBM), facilitant l'accrochage des enzymes aux polysaccharides insolubles. Les hémicellulases peuvent être de deux types : des glycosides hydrolases, hydrolysant les liaisons glycosidiques et des carbohydres estérases, hydrolysant les liaisons ester des acétates ou des acides hydroxycinnamiques des chaînes latérales. Les principales hémicellulases nécessaires à l'hydrolyse des (glucurono)arabinoxylanes sont résumées dans le tableau n°6 (page 55) et leur mode d'action sur l'hémicellulose est présenté dans la figure n°11 ^[52].

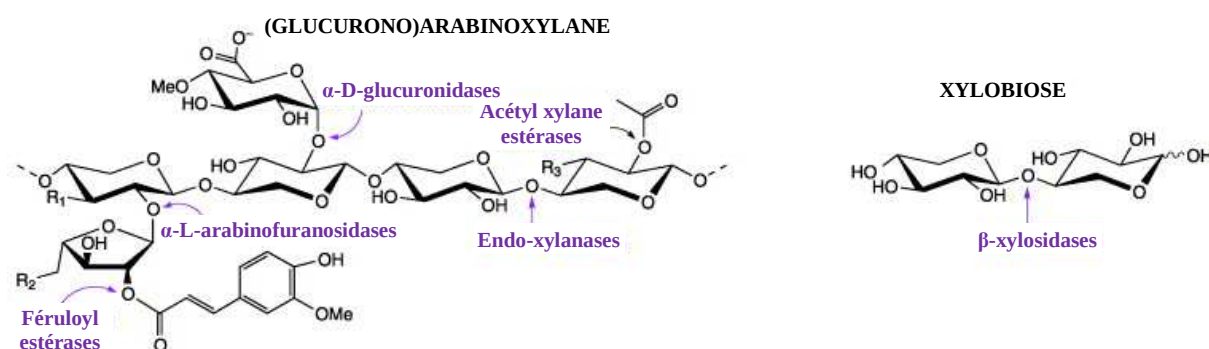


Figure n°11 : Mode d'action des principales hémicellulases nécessaires à l'hydrolyse des (glucurono)arabinoxylanes ^[71].

Tableau n°6 : Les principales hémicellulases nécessaires à l'hydrolyse des arabinoxylyanes ^[71, 72].

GLYCOSIDES HYDROLASES				
<i>Enzymes</i>	<i>EC numbers</i>	<i>Liaison hydrolysée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit principal</i>
Endo- β -1,4-xylanase	3.2.1.8	Liaison osidique Interne en β -1,4	Chaîne principale (Xylanes)	Xylooligomères de xylose
β -xylosidase	3.2.1.37	Liaison osidique Terminale en β -1,4 (non réductrice)	Xylooligomères et xylobiose	Xylose
GLYCOSIDES HYDROLASES DE DEBRANCHEMENT				
<i>Enzymes</i>	<i>EC numbers</i>	<i>Liaison hydrolysée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit principal</i>
α -L-arabinofuranosidase	3.2.1.55	Liaison osidique Terminale en α -1,2 ou α - 1,3 (non réductrice)	Chaîne latérale (chaînes avec des α - arabinofuranosyles)	Arabinose
α -glucuronidase	3.2.1.139	Liaison osidique Terminale en α -1,2	Chaîne latérale (chaînes avec des acides glucuroniques ou leurs dérivés 4-O-méthyle)	Acide méthylglucuronique
CARBOHYDRATES ESTERASES				
<i>Enzymes</i>	<i>EC numbers</i>	<i>Liaison hydrolysée</i>	<i>Substrat</i>	<i>Produit principal</i>
Acétyl xylane estérase	3.1.1.72	Liaison ester Terminale en O2 ou O3	Chaîne latérale (acétyl de xylane)	Acide acétique
Féruloyl estérase	3.1.1.73	Liaison ester	Chaîne latérale	Acide férulique
Coumaroyl estérase	3.1.1.73	Liaison ester	Chaîne latérale	Acide coumarique

2.3.3. Les ligninases

Les ligninases sont principalement produites par des champignons basidiomycètes de la pourriture blanche. Ce sont des généralement des métallos-enzymes qui vont oxyder les phénols composant les chaînes ramifiées des lignines. Elles sont classées en deux catégories :

- Les phénols oxydases ou laccases (EC 1.10.3.2). Ce sont des oxydoréductases glycosylées à cuivre qui utilisent l'O₂ pour oxyder divers composés aromatiques et non aromatiques. Elles catalysent la réaction : $4 \text{ benzènediol} + \text{O}_2 \leftrightarrow 4 \text{ benzosemiquinone} + 2 \text{H}_2\text{O}$ ^[61].

- Les peroxydases à hème :

- 1) Les lignine peroxydases (LiP) ou diarylpropane peroxydases (EC 1.11.1.14). Ce sont des glycoprotéines contenant un groupement hème et qui jouent un rôle crucial dans la biodégradation de la lignine. Elles catalysent la réaction générale, dépendante du H₂O₂, de dépolymérisation oxydante de composés non phénoliques (diarylpropane) suivante : $(3,4\text{-diméthoxyphényl)méthanol} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow 3,4\text{-diméthoxybenzaldéhyde} + 2 \text{H}_2\text{O}$.

- 2) Les manganèse-peroxydases (MnP) (EC 1.11.1.13). Ce sont des glycoprotéines à groupe hémique qui dépolymérisent la lignine conjointement avec les lignine peroxydases. Elles catalysent la réaction, dépendante du manganèse, suivante : $2 \text{Mn(II)} + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 = 2 \text{Mn(III)} + 2 \text{H}_2\text{O}$.

- 3) Les peroxydases versatiles (VP) (EC 1.11.1.16). Elles constituent un groupe d'enzymes capable d'oxyder le Mn (II) en Mn (III), comme les manganèse-peroxydases, mais présentent aussi les activités des lignine peroxydases.

Les enzymes accessoires impliquées dans la dégradation de la lignine comportent des oxydases (aryl alcool oxydase, glyoxal oxydase), générant du peroxyde d'hydrogène nécessaire aux peroxydases, et des déshydrogénases (cellulose déshydrogénase) ^[61, 73].

2.4. LA PRODUCTION D'ENZYMES ET L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

2.4.1. Les souches productrices de complexes lignocellulolytiques

La capacité de dégradation des parois cellulaires végétales (lignocellulose) ou capacité lignocellulolytique est très répandue chez les micro-organismes. Parmi les souches présentant cette capacité, l'une des plus étudiée, servant actuellement de modèle de base et dont

l'utilisation est la plus répandue est la souche *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). Ce champignon filamenteux est un ascomycète, hétérotrophe et mésophile, et un agent de la pourriture brune reconnu pour ses capacités de production d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques extracellulaires, mais aussi pour l'efficacité de son complexe enzymatique lors de la dégradation de la cellulose cristalline et de l'hémicellulose, avec cependant une déficience en β -glucosidase pour les souches mutantes industrielles et une capacité de dégradation de la lignine limitée ^[74, 75, 76].

Historiquement, cette souche (*Trichoderma viride* QM6a) a été isolée durant la seconde guerre mondiale sur l'île de Bougainville de l'archipel des Salomons (Pacifique Sud), afin de lutter contre sa capacité à dégrader les toiles de tente en coton des soldats américains. A partir des années 1970, un effort majeur a été entrepris pour trouver les moyens d'améliorer les capacités de dégradation de la cellulose. Une étude réalisée par Mandels et Sternberg en 1976 sur près de 14 000 souches collectées et criblées pour leur activité cellulolytique a confirmé le potentiel de ce champignon ^[70]. D'importants travaux de mutation et sélection ont également été entrepris dans de nombreux pays (figure n°12, page 58) sur la souche « sauvage » *Trichoderma reesei* QM6a, ayant pour résultat l'obtention de souches présentant une haute capacité de production et de sécrétion des cellulases (de 40 à 100 g/L de protéines), des activités spécifiques plus élevées pour les enzymes et des mutants produisant ces cellulases à partir de sucres solubles inducteurs et métabolisables ^[77]. Depuis les années 2000, de nouveaux efforts ont été fait, notamment par les principaux producteurs de biocatalyseurs (Genencor et Novozymes), afin d'améliorer l'efficacité des cocktails enzymatiques produits, principalement en employant les outils de la biologie moléculaire, avec comme principal résultat de pallier la déficience de cette souche en β -glucosidase. Enfin, en 2008, l'analyse du génome de cette souche a révélé, de manière surprenante, un faible répertoire de gènes codant pour des cellulases (10 avec 2 CBH et 8 EG), des hémicellulases (16) et des pectinases (polygalacturonase et rhamnogalacturonase) par rapport à d'autres champignons filamenteux. En outre, l'absence d'enzymes comme les pectines estérases, les pectate lyases, les tannases et les féruloyl estérases limiteraient l'efficacité des cellulases et des hémicellulases lors de la dégradation de la lignocellulose ^[78].

Les principales productions de complexes cellulolytiques se font actuellement par fermentation en milieu liquide selon la technique du fed-batch avec des sucres solubles afin d'obtenir une forte productivité volumique et une meilleure production globale, de limiter la répression catabolique et d'éviter les problèmes rhéologiques liés à l'utilisation de biomasse.

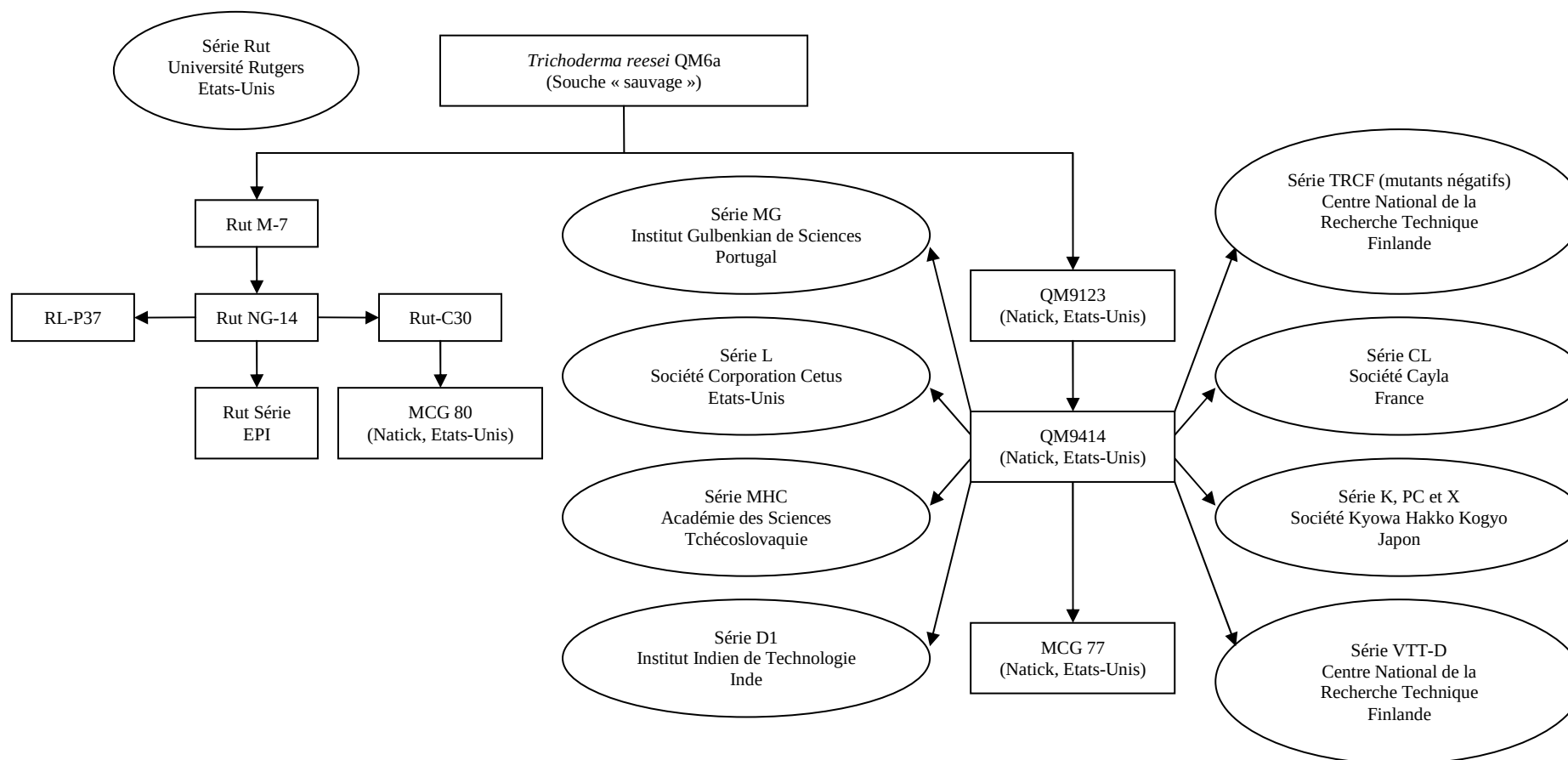


Figure n°12 : Arbre généalogique des souches de *Trichoderma reesei* (adapté de 77, 79, 80).

2.4.2. La récalcitrance de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique

Dans la nature, l'hydrolyse des parois cellulaires végétales est très lente puisque le substrat est naturellement récalcitrant à l'attaque microbienne (enzymatique). Selon Himmel et al. ^[50], il y aurait principalement sept facteurs naturels responsables de cette récalcitrance :

- 1) Le tissu épidermique de la plante, et plus particulièrement la cuticule et les cires épicuticulaires ;
- 2) Les arrangements et la densité des faisceaux vasculaires ;
- 3) La quantité relative de tissu sclérenchymateux (c'est-à-dire possédant une paroi épaisse) ;
- 4) Le degré de lignification ;
- 5) La structure hétérogène et la complexité des constituants des parois cellulaires comme les microfibrilles et les matrices de polymères ;
- 6) La difficulté des enzymes d'agir sur un substrat insoluble ;
- 7) Les inhibiteurs de fermentation présents naturellement dans les parois cellulaires.

Lors de la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en milieu industriel, les principales limites ou contraintes pouvant être rencontrées sont :

- une adsorption non spécifique des enzymes sur la lignine ou irréversible sur la cellulose cristalline ;
- une accessibilité limitée au substrat ;
- une inhibition des enzymes par les produits d'hydrolyse ;
- un piégeage des enzymes dans les petits pores ;
- un problème de pénétration des liquides dans la matrice dû à la nature des composés ;
- un blocage des sites d'accès des cellulases à la cellulose par l'hémicellulose et/ou la lignine ^[22, 50, 81].

2.4.3. Les fournisseurs de biocatalyseurs et leurs produits commerciaux

Actuellement, environ 90% des enzymes industrielles sont produites par fermentation en milieu submergé, fréquemment avec des souches modifiées génétiquement et optimisées spécifiquement pour une application ou un marché ^[82]. La production d'enzymes industrielles par fermentation en milieu solide représenterait quant à elle une activité totale inférieure à 1%

de la production mondiale, dont 0,26% pour la société Lyven ^[83]. La plupart des produits commerciaux cellulolytiques ou hémicellulolytiques sur le marché sont obtenus à partir de *Trichoderma (longibrachiatum)* ou d'*Aspergillus* (tableau n°7, page 61).

Actuellement, les principaux travaux de recherche des différents producteurs de complexes cellulolytiques et hémicellulolytiques reposeraient sur une approche utilisant des souches génétiquement modifiées, avec l'emploi des techniques de la biologie moléculaire et du génie protéique. Trois approches sont principalement employées :

- Une conception rationnelle de chaque enzyme, basée sur la connaissance de la structure tridimensionnelle et du mécanisme catalytique afin d'introduire des mutations ciblées ;
- Une évolution dirigée et l'insertion de cassette d'expression pour chaque cellulase : les enzymes améliorées ou avec une propriété améliorée sont sélectionnées pour ensuite subir une mutagenèse aléatoire et/ou une recombinaison moléculaire (*DNA shuffling*) ;
- La création de protéines de fusion ou protéines artificielles ou protéines chimères par la combinaison de différentes protéines ou de partie de protéines ^[84].

Afin de permettre de confirmer les avancées de ces travaux, une reconstitution du cocktail cellulolytique actif sur substrat insoluble est réalisée pour déterminer une éventuelle amélioration du taux d'hydrolyse obtenu et/ou de la durée d'hydrolyse. L'objectif final de ces travaux étant d'améliorer les propriétés des biocatalyseurs comme l'activité spécifique, l'affinité des enzymes pour leur substrat, la stabilité des protéines aux conditions de température et de pH ^[53].

Cependant, selon Harris ^[85] de la société Novozymes, en dépit des nombreuses années de recherche sur les complexes cellulolytiques, la seule amélioration commerciale obtenue a été de compléter le système cellulolytique des *Trichoderma* en β -glucosidase.

Tableau n°7 : Liste des principaux produits commerciaux cellulolytiques et hémicellulolytiques ^[84].

Type	Appellation commerciale	Fournisseur	Localisation	Souche	Technologie de production
Cellulase	Accellerase [®] 1500™	Dupont/Danisco [®] /Genencor [®]	Danemark (Copenhague)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	GC220	Dupont/Danisco [®] /Genencor [®]	Danemark (Copenhague)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	Spezyme [®] CP	Dupont/Danisco [®] /Genencor [®]	Danemark (Copenhague)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	Cellic [®] CTec 2	Novozymes [®]	Danemark (Bagsvaerd)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	Celluclast [®] 1.5L	Novozymes [®]	Danemark (Bagsvaerd)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	Novozym [®] 188	Novozymes [®]	Danemark (Bagsvaerd)	<i>A. niger</i>	FML
Cellulase	Viscozyme [®] L	Novozymes [®]	Danemark (Bagsvaerd)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	Ultraflo [®] L	Novozymes [®]	Danemark (Bagsvaerd)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	Rohament [®] CL	AB enzymes	(Finlande) Rajamaki	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	AlternaFuel 200P	Dyadic	Etats-Unis d'Amérique (Floride, Jupiter)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Cellulase	Cellulyve 50L	Lyven [®]	France (Colombelles)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FMS
Hemicellulase	AlternaFuel 100P	Dyadic	Etats-Unis d'Amérique (Floride, Jupiter)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Hemicellulase	Cellic [®] HTec3	Novozymes [®]	Danemark (Bagsvaerd)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML
Hemicellulase	Accellerase [®] XY	Dupont/Danisco [®] /Genencor [®]	Danemark (Copenhague)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>	FML

2.5. LA FERMENTATION

La fermentation des hydrolysats, ou plutôt des sucres fermentescibles, est une étape pouvant être couplée avec l'étape d'hydrolyse enzymatique. Ce couplage, dépendant de la compatibilité des conditions d'hydrolyse et de fermentation, présente quelques avantages comme :

- de permettre de lever les phénomènes d'inhibition touchant les enzymes et ainsi d'atteindre un taux d'hydrolyse et de produit final supérieur ;
- de diminuer la quantité de biocatalyseurs nécessaires ;
- de limiter les risques de contamination et ainsi permettre de réduire les contraintes de stérilité ;
- de diminuer la durée de fermentation et du procédé global ;
- de diminuer la taille et/ou le nombre de réacteurs nécessaires ^[22].

Cependant, cette étape présente également l'inconvénient d'une inhibition possible des souches et/ou des biocatalyseurs par le produit final issu de la fermentation.

3. LA FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE

3.1. DEFINITION

La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons filamenteux et des champignons supérieurs, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique ^[86]. D'un point de vue fondamental, la fermentation en milieu solide est définie comme une fermentation impliquant des particules solides humides en absence ou presque d'eau libre et diffère de la fermentation en milieu liquide, où le milieu nutritif est complètement solubilisé dans un grand volume d'eau, et de la fermentation en milieu submergé où le milieu nutritif est par exemple sous forme d'une suspension de fines particules dans la phase liquide ^[87, 88]. La principale différence entre ces procédés réside dans la variation des proportions (de l'équilibre) des phases solide, liquide et gazeuse.

La FMS est donc constituée de trois phases : une matrice (phase) solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci. La capacité de rétention en eau des supports solides est

variable et peut aller de 12 à 90%, soit une activité de l'eau (A_w^1) comprise entre 0,65 et 0,98^[89]. Ils doivent posséder une humidité relative, ou plutôt une activité de l'eau, suffisante pour permettre la croissance et l'expression du métabolisme des souches^[87]. Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible A_w et à une pression osmotique élevée.

Le développement des champignons filamenteux en FMS (figure n°13) se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces interparticulaires (par croissance) à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon^[86, 90].

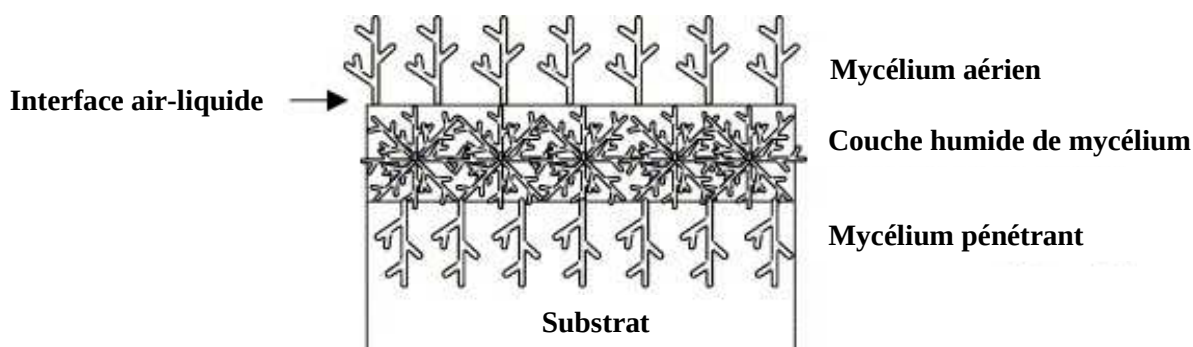


Figure n°13 : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS^[90].

¹ A_w : L'activité de l'eau est un paramètre thermodynamique définissant la disponibilité de l'eau d'un produit (l'eau libre par rapport à l'eau liée aux molécules). Elle est donnée par le rapport P_w/P_w^0 où P_w représente la pression partielle en vapeur d'eau à l'équilibre avec le produit et P_w^0 la pression partielle en vapeur d'eau au-dessus de l'eau pure. L'échelle de mesure est comprise entre 0 et 1. Ce paramètre est plutôt bien corrélé à l'humidité relative^[91].

3.2. HISTOIRE ET APPLICATIONS DE LA FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE

3.2.1. Histoire de la fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide est un des plus anciens procédés biotechnologiques connus au monde, sans doute le premier procédé technologique fermentaire connu de l'histoire, et possède donc une longue histoire résumée dans le tableau n°8.

Tableau n°8 : Histoire du développement de la fermentation en milieu solide ^[87, 92].

Date	Développement
2600 av. J.-C.	- Fabrication de pain par les Egyptiens.
2500 av. J.-C.	- Préservation du poisson, de la viande,...par fermentation, avec ajout de sucre ou de sel. - Procédé Koji.
Av. J.-C.	- Fabrication de fromage par <i>Penicillium roquefortii</i> .
7 ^{ème} siècle	- Le procédé Koji (fermentation de riz cuit à la vapeur avec <i>Aspergillus oryzae</i>) passe de la Chine au Japon par l'intermédiaire des prêtres bouddhistes. - Production de vinaigre à partir de marc de raisin.
18 ^{ème} siècle	- Production d'acide gallique utilisé en tannerie, en impression,...
1860-1900	- Traitement des eaux usées.
1900-1920	- Production d'enzymes fongiques (principalement de diastases ou amylases, notamment selon le procédé industriel développé par J. Takamine) et d'acide kojique.
1920-1940	- Production d'enzymes fongiques, d'acide gluconique, d'acide citrique. - Développement du fermenteur à tambour rotatif.
1940-1950	- Développement fantastique des fermentations industrielles. - Production d'antibiotiques (Pénicilline) par FMS et par fermentation en milieu submergé. - Abandon progressif de la FMS en Occident.
1950-1960	- Transformation de stéroïdes par les cultures fongiques.
1960-1980	- Production de mycotoxines, enrichissement en protéines des aliments pour animaux.
1980 à nos jours	- Production de divers produits (alcool, acide gibbérannique,...).

3.2.2. Applications de la fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide est traditionnellement utilisée pour la fabrication de nombreux produits alimentaires dans les pays orientaux et africains (tableau n°9, page 66). Ce procédé est principalement retrouvé en Asie pour la production (très traditionnelle) de Koji (figure n°14, page 65), un substrat fermenté contenant des enzymes et servant de base pour la

fabrication de produits alimentaires nécessitant une culture ultérieure en phase liquide. Cependant, la fermentation en milieu solide s'est également progressivement développée à d'autres domaines d'applications que l'alimentaire (comme expliqué dans la partie 3.2.1. et illustré dans le tableau n°10, page 67). De plus, il faut rappeler que la première production industrielle d'enzymes a été réalisée par Jokichi Takamine à l'aide de la fermentation en milieu solide (sur du son de blé et avec la souche *Aspergillus oryzae*).



Figure n°14 : Méthode traditionnelle pour la culture de Koji avec *Aspergillus oryzae*^[93].

Un brasseur (Toji) est en train d'inoculer des conidies de cette moisissure sur du riz cuit à la vapeur (à gauche), puis celui-ci est cultivé dans des conteneurs en bois (à droite).

3.3. LA CONDUITE DE PROCEDE

Le développement d'un bioprocédé de fermentation en milieu solide nécessite le choix minutieux d'une souche, d'un substrat et d'un système de réacteur afin d'optimiser les conditions de culture, mais surtout afin de les maintenir constantes durant le temps de fermentation. La conduite d'un procédé de fermentation en milieu solide est plus difficile que pour une fermentation en milieu liquide, principalement à cause de l'hétérogénéité de la culture et à l'absence d'eau libre. La variation des paramètres de culture est fonction de la matrice (composition, résistance mécanique, porosité et capacité de rétention d'eau). De plus, la conception limitée (non optimisée) de réacteurs et de systèmes de contrôle rend actuellement délicate la maîtrise des cultures (robustesse).

Tableau n°9 : Produits alimentaires traditionnels réalisés par fermentation en milieu solide ^[88, 94].

Produits	Matière première	Pays	Microorganismes
Ang-Kak	Riz	Chine et sud-est asiatique	<i>Monascus purpureus</i>
Gari	Manioc	Afrique de l'Ouest (Nigéria)	<i>Geotrichum candidum</i>
Tane koji	Soja, blé, riz cuit à la vapeur, simple ou en mélange	Japon	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus sojae</i>
Kome miso	Soja et riz	Japon	<i>Aspergillus oryzae</i>
Lao-chao	Riz	Chine	<i>Rhizopus oryzae</i>
Mame miso	Soja	Japon	<i>Aspergillus sojae</i>
Mugi miso	Soja et orge	Japon	<i>Aspergillus oryzae</i>
Natto	Fèves de soja cuites à la vapeur	Japon	<i>Bacillus natto</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Oncom ou Ontjom	Arachide	Indonésie	<i>Neurospora sitophila</i>
Saké	Riz	Japon	<i>Aspergillus oryzae</i>
Shoyu (sauce au soja)	Koji (soja et farine de blé)	Extrême-Orient	<i>Aspergillus oryzae</i>
Tempeh Kedelee	Soja	Indonésie	<i>Rhizopus oryzae</i>
Tempeh Bongkrek	Manioc ou coprah	Indonésie	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>
Tofu (lait de soja)	Graines de soja	Japon, Chine	<i>Mucor sufu</i>

Tableau n°10 : Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide [95, 96, 97].

Domaine d'application	Produits	Microorganismes
Alimentaire	Champignons supérieurs	<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris) <i>Lentinus edodes</i> (Shiitaké) <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pleurotes)
	Fromages à pâte persillée, fromages à croûte fleurie (camembert, brie,...)	<i>Penicillium roquefortii</i> <i>Penicillium camembertii</i> <i>Penicillium caseicolum</i>
	Pain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acides organiques	Acide citrique Acide lactique	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
Divers	Bioconversion de substrats agricoles (compostage, ensilage)	
	Biostimulation des plantes (ectomycorhizes)	
	Bioremédiation des polluants organiques dans le sol	
	Délignification de la biomasse	
	Détoxification biologique de composés toxiques et dangereux	
	Production d'inoculum fromager (conidies de <i>Penicillium</i>)	
Enzymes	Amylases, glucoamylases Cellulases, xylanases Pectinases Protéases	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>
Enrichissement nutritif (protéines) des aliments pour animaux	Canne à sucre, manioc, pulpe de betterave,...	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Métabolites secondaires	Arômes	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
	Antibiotiques (pénicilline)	<i>Penicillium notatum</i>
	Hormones végétales (acide gibbérélique)	<i>Gibberella fujikuroi</i>
	Alcaloïdes (ergot)	<i>Claviceps purpurea</i>
Lutte biologique (biocontrôle/biopesticide)	Biofongicides, bioinsecticides,...	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Coniothyrium minitans</i>

3.3.1. Le support

Le support est l'un des paramètres les plus importants en fermentation en milieu solide. Il doit être choisi avec attention en fonction de plusieurs facteurs comme la taille des particules, la porosité, la composition biochimique dans le cas d'un support organique puisque celle-ci aura une incidence sur les microorganismes et sur le profil enzymatique (substances inductrices), sa capacité de rétention d'eau et/ou sa capacité à contenir les éléments nutritifs (source de carbone, d'azote et de sels minéraux), sa disponibilité et son coût ^[95, 98]. Ils sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques, et se présentent sous trois formes :

1) Sous la forme de matériaux organiques naturels (amylacés ou lignocellulosiques). Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes (bagasse, pulpes de betterave, paille, bois, son de blé, manioc,...). Ils servent à la fois de substrat (source de carbone) et de support ;

2) Sous la forme de matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif ;

3) Sous la forme de matériaux minéraux (granulés d'argile, perlite, pouzzolane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif ^[97].

3.3.2. Les facteurs environnementaux et les paramètres de culture

3.3.2.1. La température

La température est l'un des facteurs les plus difficiles à réguler en fermentation en milieu solide. La faible conductivité thermique de l'air (en comparaison de celle de l'eau), des supports et l'absence d'eau libre limite le transfert de chaleur et son élimination favorisant ainsi une élévation de la température pouvant aller jusqu'à 20°C au dessus de la température d'incubation ^[87]. Cette élévation de la température dépend du type de microorganisme, de la porosité, de la taille des particules et de la profondeur du support. Ce phénomène se produit surtout lors de la croissance de la souche et est directement proportionnel à son activité métabolique génératrice de chaleur, de l'ordre de 100 à 300 kJ par kg de masse cellulaire ^[95]. Une mauvaise dissipation de la chaleur peut entraîner des gradients de température au sein du milieu de culture durant la fermentation et peut provoquer des déviations métaboliques, l'assèchement du milieu, la dégradation des produits sécrétés, une diminution de la

disponibilité des nutriments ou encore l'arrêt de la phase végétative au profit de la phase reproductive du champignon filamenteux (production de conidies) ^[88, 95]. Plusieurs possibilités existent pour limiter ou éliminer cette chaleur avec :

- de manière passive : le phénomène d'évaporation d'eau (mais avec une diminution de la disponibilité de l'eau) ou l'utilisation d'une fine couche de support (favorisant l'évacuation de la chaleur, contrairement aux couches profondes) ;
- de manière active : l'agitation mécanique du milieu de culture (de manière modérée et intermittente), la circulation d'eau froide à l'intérieur des plateaux (dans le cas d'un réacteur à plateaux), l'aération forcée du milieu de culture avec de l'air humidifiée et refroidie (le plus efficace, avec une dissipation de plus de 80% de la chaleur) ^[89, 98].

Le contrôle de ce paramètre se fait généralement avec des thermosenseurs, des thermistances/thermistors ou des sondes métaboliques Pt par une mesure dans la couche solide et dans l'air entrant/sortant ^[89].

3.3.2.2. L'humidité relative et l'activité de l'eau

En FMS, l'eau est présente sous deux formes : sous la forme d'eau complexée à l'intérieur de la matrice solide, et sous la forme d'une couche mince qui peut être absorbée à la surface des particules ou contenue dans les régions capillaires ^[96]. La teneur en eau nécessaire pour les cultures est avant tout dépendante des souches utilisées, mais sa limite basse serait fixée à 12%, seuil en deçà duquel les activités métaboliques cessent, et sa limite haute dépendrait principalement du support et de sa capacité de rétention (mais elle serait de 90% pour les substrats lignocellulosiques) ^[89, 99]. Le contenu en eau, ou plutôt la quantité d'eau disponible, est vraiment très important puisqu'une faible humidité limiterait l'hydrolyse du substrat, la solubilisation et la diffusion des nutriments et/ou l'accumulation de composés inhibiteurs dans les particules solides, tandis qu'une forte humidité réduirait la porosité (espace interparticulaire), le volume des gaz et les échanges gazeux, tout en favorisant la contamination bactérienne ^[88]. Le maintien d'une teneur en eau optimale est par conséquent essentiel. Cependant, des variations dues au développement du champignon (phénomène de respiration qui produit de l'eau), à l'aération, à l'hydrolyse du substrat et à la production de chaleur métabolique (augmentation de la température) peuvent provoquer un assèchement du milieu. Pour finir, la mesure de la teneur en eau dans le milieu (humidité relative) est

généralement déterminée en *off line* par une perte à la dessiccation. Cependant cette méthode ne permet de différencier l'eau disponible pour la souche de l'eau liée (indisponible) ^[89].

3.3.2.3. L'aération

L'aération est un facteur important (essentiel) en fermentation en milieu solide puisqu'elle va permettre : l'oxygénation (surtout pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux), la dissipation de la chaleur métabolique (régulation de la température du milieu) et l'élimination des produits du métabolisme (CO₂, vapeur d'eau, composés volatils) ^[88, 96]. Elle peut être passive (de surface) ou active (forcée par l'injection d'air humidifiée afin de ne pas assécher le milieu). Le choix d'un support poreux et la calibration de la taille des particules par broyage (de 1 mm à 1 cm) permettra d'optimiser l'aération du milieu de culture en facilitant la circulation de l'air ^[95]. Il faut cependant noter qu'un changement dans la porosité du support (pour les supports organiques) se produit lors de la dégradation du substrat avec le risque d'un tassement ou d'une compaction des particules, provoquant la formation de chemins préférentiels et une réduction de l'apport d'oxygène.

3.3.2.4. Le pH

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines ^[95]. Une régulation partielle de ce facteur au cours de la fermentation peut cependant être réalisée par l'ajout d'acide ou de base à l'eau utilisée pour ajuster le taux d'humidité du milieu. Un autre système de régulation (passif) consiste à utiliser des systèmes tampon, comme l'emploi de résidus agro-industriels présentant naturellement un excellent pouvoir tampon ou l'utilisation d'un mélange de sels d'ammonium et d'urée ^[96, 100]. Pour finir, le suivi de ce paramètre de culture ne se fait pas directement, puisqu'il n'existe pas d'électrode de mesure disponible (du fait de l'absence d'eau libre), mais se fait par la mesure d'un pH standard après mise en suspension d'un échantillon (homogène) dans de l'eau déminéralisée ^[89].

3.3.2.5. La biomasse

L'estimation de la biomasse pour le suivi des cinétiques de croissance est délicate car les microorganismes sont (presque) inséparables du support. Il existe cependant :

- des méthodes d'estimation directes. Elles sont très difficiles et consistent en une séparation de la biomasse (uniquement pour les organismes unicellulaires) ou en une suppression de la matrice solide (organique) ;

- des méthodes d'estimations indirectes. Elles se font soit par le dosage de composés spécifiques de la biomasse (protéines, acides nucléiques, glucosamine, ergostérol), soit par le suivi de l'activité métabolique de la biomasse (respirométrie : oxygène consommé ou CO₂ produit, production d'ATP, d'enzymes extracellulaires) ^[89, 96].

3.4. LES DIFFERENTS TYPES DE REACTEURS INDUSTRIELS

Lors de la conception d'un réacteur, deux facteurs sont principalement pris en compte : la hauteur de couche (mince ou profonde, c'est-à-dire jusqu'à un mètre) et l'aération. L'optimisation de ces paramètres permettra notamment d'éviter ou de limiter l'hétérogénéité du milieu et l'accumulation de chaleur.

Les différents types de réacteurs industriels existants sont principalement destinés à la production de saké ou de sauce soja et présentent généralement une taille de 1 à 2 T, mais certaines sociétés d'ingénierie sont capables de réaliser des réacteurs allant jusqu'à 20 T (société Fujiwara) ^[96]. Le nombre de réacteurs conçus pour la FMS reste cependant encore limité et ceux-ci ne sont pas optimisés. Les quatre principaux types de réacteurs communément utilisés sont :

1) Les bioréacteurs à plateaux (*Tray bioreactor*).

Ce type de bioréacteur est constitué de plateaux étagés (en bois, en métal ou en plastique), contenant une couche mince de support (5 à 15 cm), et placés dans une chambre à atmosphère contrôlée (température, humidité). La culture se déroule en principe de manière statique et l'aération de celle-ci se fait généralement de manière passive (sans aération forcée), bien qu'une aération puisse être réalisée en faisant circuler de l'air du bas vers le haut de la chambre. La température peut éventuellement être contrôlée par circulation d'air ou aspersion d'eau. Enfin, le principal désavantage de ce type de bioréacteur est le nombre de plateaux et le volume nécessaire, rendant compliqué le changement d'échelle ^[79, 98, 101].

2) Les bioréacteurs à lit fixe (*Packed bed bioreactor*).

Ce type de bioréacteur est généralement composé d'une colonne (en verre ou en plastique) contenant le support solide. L'enceinte peut éventuellement être équipée d'une double enveloppe permettant une circulation d'eau et par conséquent une meilleure régulation de la température. La culture est généralement statique et une aération peut être appliquée par le bas de la colonne. Les principaux inconvénients de ce type de bioréacteur résident dans l'obtention d'une culture non homogène, dans la difficulté à récupérer le produit (support) et dans le changement d'échelle (compliqué) ^[79, 98, 101].

3) Les bioréacteurs à tambour rotatif (*Rotating drum bioreactor*).

Ce type de bioréacteur est composé d'une cuve, avec ou sans baffles, tournant autour d'un axe (comme une bétonnière). Ce système permet une aération adéquate (forcée ou non) et une homogénéisation du milieu par une rotation périodique (afin de limiter le cisaillement) ou continue. Le principal désavantage de ce type de bioréacteur est son remplissage qui ne doit pas excéder 30% afin de garantir une agitation efficace ^[79, 98, 101].

4) Les bioréacteurs à lit fluidisé (*Fluidized bed bioreactor*).

Ce type de bioréacteur consiste à mettre des particules en suspension dans l'air à l'intérieur d'une colonne. Ce système permet une agitation et une aération continue, évitant ainsi l'agrégation des particules et favorisant l'élimination de la chaleur métabolique. Cependant, le principal désavantage de ce type de bioréacteur réside dans son coût (trop) élevé ^[79, 98, 101].

3.5. COMPARAISON DES TECHNOLOGIES DE FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE ET DE FERMENTATION EN MILIEU LIQUIDE OU SUBMERGE

Un tableau comparatif (tableau n°11) présentant les forces et les faiblesses de chaque technologie est présenté à la page 73.

Tableau n°11 : Comparaison des technologies de fermentation en milieu solide et de fermentation en milieu liquide ou submergé [89, 95, 96, 98]

		FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE	FERMENTATION EN MILIEU LIQUIDE OU SUBMERGE
CONDUITE DE PROCEDE	Température	- Contrôle compliqué (transfert de chaleur limité par le support, l'air et l'absence d'eau libre) - Risque de formation de gradients dans le milieu	- Contrôle aisé - Température homogène
	pH	- Contrôle compliqué - Régulation partielle possible (ajout de solutions acides ou basiques, utilisation de systèmes tampon : solutions, supports au pouvoir tampon)	- Contrôle aisé - Régulation par l'ajout de solutions acides ou basiques
	Aération	- Passive (de surface) ou active (forcée) - Pas ou peu de contrainte d'aération (oxygénation) - Circulation de l'air aisé et aération (transfert d'oxygène) élevée	- Nécessaire et compliquée - Contrainte d'aération (oxygénation) élevée, liée à la solubilité/au transfert de l'oxygène (fonction de la température) et à la rhéologie des milieux (viscosité)
	Agitation	- Absente, discontinue ou continue - Contrainte de cisaillement limitée - Peut limiter l'hétérogénéité du milieu	- Nécessaire (homogénéisation du milieu + aération pour les cultures aérobies) - Contrainte de cisaillement importante (limitation des souches cultivables) - Problème lié à la rhéologie des milieux (nature du substrat + culture de moisissures)
	Antimousse	- Pas nécessaire	- Nécessaire
	Stérilisation	- Possibilité de travailler en condition non stérile ou semi stérile du fait de la faible A_w (limitation des contaminants et de leur développement) et une fois l'implantation de la souche réalisée - Risque de contamination limité, principalement pour les souches à croissance lente et surtout par d'autres champignons - Prétraitement par cuisson ou traitement à la vapeur pour éliminer les principaux contaminants (flore autochtone)	- Nécessaire - Risque de contamination élevé

PROCEDE	Capteurs et contrôle du procédé/de la culture	- Contrôle et régulation compliqués des paramètres environnementaux (T, pH, humidité, biomasse, conditions nutritives,...) - Absence de capteurs <i>on line</i> pour le contrôle des paramètres environnementaux (pH, humidité, concentration en nutriments)	- Contrôle et régulation aisés des paramètres environnementaux - Capteurs <i>on line</i> disponibles
	OPEX	- Faibles coûts opérationnels du fait d'une consommation d'énergie (aération, agitation) et d'eau de <i>process</i> limitée	- Consommation d'eau et d'énergie (stérilisation, agitation, aération) importante - Durée importante des opérations unitaires
	CAPEX (réacteur/volume)	- CAPEX faible (coût des équipements et volume de réacteur limités du fait d'une quantité d'eau moins importante et d'une limitation dans les contraintes de stérilité)	- CAPEX important (taille des fermenteurs)
	<i>Scale-up</i>	- Besoin d'ingénierie et de conception de fermenteurs au niveau de l'échelle industrielle due à une faible standardisation, à l'hétérogénéité du système (gradients de T, pH,...), à une reproductibilité limitée (nécessité de robustesse), et à des problèmes de compaction - Problème d'extrapolation (en Occident surtout – réacteur de 20 T disponible au Japon)	- Equipements industriels disponibles
	<i>Downstream processing</i> (Extraction)	- Absence d'extraction (en fonction de l'application) ou faible volume de solvant utilisé - Haute impureté	- Traitements importants (volume important à traiter) - Impureté modérée
	Effluents	- Faible volume d'eaux résiduelles à traiter	- Volume important d'eaux résiduelles à traiter

CULTURE	Type de culture	- Cultures principalement en <i>batch</i>	- Cultures en <i>batch</i> , en <i>fed-batch</i> ou en continues
	Microorganismes	- Favorable aux organismes pluricellulaires et/ou aux organismes adaptés à une faible Aw et une forte pression osmotique (champignons filamenteux, supérieurs) - Favorable aux souches sauvages - Culture pure et possibilité de cultures mixtes avec synergie des métabolismes - Culture hétérogène - Inoculation en conidies ou en mycélium	- Favorable aux organismes unicellulaires (bactéries, levures) - Favorable aux souches mutées ou modifiées génétiquement - Cultures pures, peu favorable aux cultures mixtes - Culture homogène - Inoculation en cellules ou en volume de culture
	Milieu de culture	- Hétérogène - Matière première abondante et bon marché - Polymères solides insolubles - Prétraitement limité ou inexistant (déchets agricoles) - Quantité de substrat importante (concentration élevée, mais problème de diffusion des nutriments ; risque d'une concentration élevée en inhibiteurs) - Quantité d'eau limitante - Quantité d'air non limitante	- Homogène (souche, nutriments, métabolites) - Matière première coûteuse - Soluble ou sous forme de fines particules en suspension - Prétraitement parfois nécessaire - Quantité de substrat limitée (faible concentration) - Quantité d'eau non limitante - Quantité d'air limitante
	Produits	- Productivité élevée (rendement similaire ou supérieur et/ou temps de culture plus court que pour la FML) - Performances accrues : stabilité plus élevée (T, pH même extrême), optimum plus large (T, pH), résistance à l'inhibition, affinité pour le substrat - Expression de molécules inédites (profil protéique riche) - Produit fermenté concentré si utilisation directe et donc pas de nécessité de concentration (liquide)	- Produit (très) dilué
	Répression catabolique ou dégradation par des protéases	- Faible ou inexistante	- Elevée

MATERIEL ET METHODES

1. LES COMPLEXES ENZYMATIQUES

1.1. LES COMPLEXES ENZYMATIQUES PRODUITS AU LABORATOIRE

1.1.1. La souche : conservation et mise en culture

La production des complexes enzymatiques au sein du laboratoire a été réalisée à partir d'une souche de *Trichoderma reesei* Rut-C30 (référence VTT-D-86271), achetée au VTT Technical Research Centre of Finland (Espoo, Finlande). La souche a été conservée en cryotubes congelés à -20°C sous la forme de conidies mises en suspension dans une solution de glycérol à 20%, de chlorure de sodium à 0,95% et de Tween[®] 80 à 0,2%. La remise en culture de la souche a systématiquement été effectuée à partir d'un cryotube servant à l'inoculation d'une série de boîte de Pétri contenant le milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar). Après une semaine de culture à 30°C, une suspension de conidies a été réalisée en aspergeant les milieux à l'aide d'une solution d'eau tweenée à 0,1%, puis en grattant la surface des milieux avec une pipette. Cette suspension a ensuite servi à ensemercer les cultures principales en milieu solide ou en milieu submergé.

1.1.2. Le milieu de culture

- Le son de blé désamidonné. Cette matière première a servi de support/substrat aux cultures et a été produite au sein de notre laboratoire. Pour cela, nous avons utilisé du son de blé brut mis en suspension à 10% de matière sèche dans de l'eau de ville. Puis, nous avons fait agir une α -amylase thermostable, commerciale (Amylyve[®] UHT), introduite à 250 mg/kg de son de blé, à 90°C et pH = 6,5 durant 1 h. A la fin de ce traitement, nous avons filtré et lavé abondamment le son de blé avant de le sécher à 90°C et de le stocker à température ambiante jusqu'à son utilisation.

- Le milieu Mandels^[102]. Ce milieu de culture a servi de supplément pour les cultures en milieu solide. Il est composé de 0,30 g d'urée, de 2,0 g de phosphate monopotassique, de 1,40 g de sulfate d'ammonium, de 0,30 g de sulfate de magnésium heptahydraté, de 0,75 g de peptone de soja, de 0,50 g d'extrait de levure, de 0,40 g de chlorure de calcium dihydraté, de 5,0 mg de sulfate de fer heptahydraté, de 1,6 mg de sulfate de manganèse dihydraté, de 1,4

mg de sulfate de zinc heptahydraté, de 2,0 mg de chlorure de cobalt et d'eau déminéralisée qsp 1 L.

1.1.3. La culture principale en milieu solide

La culture principale en milieu solide a été réalisée en ensemençant une série de fioles d'Erlenmeyers de 500 mL à col large contenant 10 g de son de blé désamidonné chacune, supplémenté avec 10 mL de milieu Mandels dilué 10 fois ^[102]. Après traitement thermique à 121°C pendant 20 minutes, les milieux ont été inoculés à un taux de 1.10^7 conidies/g de son de blé désamidonné et l'humidité relative a été ajustée à 60% avec de l'eau déminéralisée stérile. Les cultures ont ensuite été mises à incuber pendant 5 jours à 30°C, puis les complexes enzymatiques produits ont été extraits en homogénéisant 30 g de son de blé désamidonné fermenté avec 200 mL d'eau déminéralisée dans un Waring®-blender 8010 EB modèle HGBTWT (Waring® Commercial, Torrington, Connecticut, Etats-Unis d'Amérique). La suspension obtenue a ensuite été centrifugée avec une centrifugeuse modèle 5804 R (Eppendorf®, Hambourg, Allemagne) à 10 000 rpm et 4°C pendant 10 minutes. Enfin, le surnageant a été récupéré et conservé à 4°C avant utilisation.

1.1.4. La culture principale en milieu submergé

La culture principale en milieu submergé a été réalisée en ensemençant une série de fioles d'Erlenmeyers de 500 mL à col large contenant 2% de son de blé désamidonné pour un volume final de 100 mL. Après traitement thermique à 121°C pendant 20 minutes, les milieux ont été inoculés à un taux de 1.10^7 conidies/g de son de blé désamidonné et mis sous agitation à 120 rpm dans une table d'agitation thermostatée Multitron® (Infors® HT, Bottmingen, Suisse) pendant 5 jours à 30°C. Les complexes enzymatiques ont ensuite été extraits en filtrant les cultures contre une toile de filtration en nylon, puis en centrifugeant le filtrat avec une centrifugeuse modèle 5804 R (Eppendorf®, Hambourg, Allemagne) à 10 000 rpm et 4°C pendant 10 minutes. Enfin, le surnageant a été récupéré et conservé à 4°C avant utilisation.

1.2. LES COMPLEXES ENZYMATIQUES COMMERCIAUX

Les complexes enzymatiques commerciaux utilisés lors de ces travaux de recherche sont :

- Celluclast[®] 1.5 L : un complexe cellulolytique commercial. Il a été produit à partir d'une souche sélectionnée de *Trichoderma reesei* QM 9414 ^[103] et est commercialisé par la société Novozymes[®] A/S (Bagsvaerd, Danemark).

- Lyvanol[®] devisco 1500 : un complexe hémicellulolytique commercial. Il a été produit à partir d'une souche non génétiquement modifiée de *Trichoderma longibrachiatum* ^[104] et est commercialisé par la société Lyven[®] (Colombelles, France).

- Amylyve[®] UHT : une α -amylase thermostable, commerciale. Elle a été produite à partir d'une souche de *Bacillus licheniformis* et est commercialisée par la société Lyven[®] (Colombelles, France).

- Lyvanol[®] GA : une préparation amylolytique commerciale, comprenant une α -amylase et une glucoamylase. Elle a été produite à partir d'une souche non génétiquement modifiée d'*Aspergillus niger* et est commercialisée par la société Lyven[®] (Colombelles, France).

- α -arabinofuranosidase : une enzyme partiellement purifiée, commerciale. Elle a été produite à partir d'une souche d'*Aspergillus niger* et est commercialisée par la société Megazyme[®] International (Wicklow, Irlande).

- Lichenase : une enzyme partiellement purifiée, commerciale. Elle a été produite à partir d'une souche de *Bacillus subtilis* et est commercialisée par la société Megazyme[®] International (Wicklow, Irlande).

- Novozym[®] 188 : une préparation commerciale de β -glucosidase. Elle a été produite à partir d'une souche d'*Aspergillus niger* et est commercialisée par la société Novozymes[®] A/S (Bagsvaerd, Danemark).

2. LES HYDROLYSES ENZYMATIQUES ET FERMENTATIONS ALCOOLIQUES

2.1. LES SUBSTRATS

- La cellulose microcristalline. Elle possède une taille moyenne d'environ 50 μm et est commercialisée sous la désignation Avicel[®] PH-101 par la société FMC Corporation (Philadelphie, Pennsylvanie, Etats-Unis d'Amérique).

- Le son de blé brut. Il est issu de blé tendre (*Triticum aestivum*) et a été fourni par le groupe Soufflet (Nogent-sur-Seine, France). Sa composition chimique a été analysée par la société InVivo Labs[®] (Chierry, France) et est constituée de : 35,5% d'hémicelluloses, 11,4% de cellulose, 4% de lignine, 13,7-15,8% d'amidon, 17,4% de protéines, 5,6% de sels minéraux.

2.2. LES PRETRAITEMENTS

2.2.1. Broyage en voie sèche

Un pré-broyage en voie sèche a été réalisé avant le broyage principal en voie humide. Pour cela, le son de blé a été micronisé à l'aide d'un broyeur à couteaux (VEM motors, Allemagne) équipé d'une grille de 500 μm .

2.2.2. Broyage en voie humide

Le broyage principal en voie humide du son de blé a été réalisé avec un broyeur à billes de laboratoire MiniFer (Netzsch[®], Selb, Allemagne), équipé d'un tamis séparateur de 0,8 mm et chargé avec 518 g de billes de 2,0-2,2 mm. Le broyage a été réalisé à une agitation de 3000 tr/min pendant 1h et à une température inférieure à 30°C ou à une température de 50°C.

2.2.3. Traitement enzymatique

Le son de blé a parfois subi un prétraitement enzymatique à l' α -amylase et à la lichenase. Pour cela, du son de blé brut a été mis en suspension à 10% de matière sèche dans

de l'eau de ville et a d'abord été traité avec une α -amylase thermostable (Amylyve[®] UHT, introduite à 500 mg/kg de son de blé) pendant 1h à 85°C et pH = 6,5, puis avec une lichenase (introduite à 100 U/10 g de son de blé) durant 2h à 60°C et pH = 6,5. A la fin des traitements, le son de blé résiduel a été filtré et lavé abondamment, puis sécher à 90°C. Ce son de blé prétraité a ensuite été utilisé comme matière première soit directement, soit après un broyage par voie humide.

2.3. LES HYDROLYSES ENZYMATIQUES

Les hydrolyses enzymatiques de la cellulose, du son de blé brut ou du son de blé prétraité ont été réalisées dans des flacons fermés de 500 mL contenant 2%, 5% ou 10% de substrat pour un volume de réaction final de 100 mL. Elles se sont déroulées à 50°C, soit dans du tampon citrate pH = 4,8 (50 ou 100 mM), soit dans du tampon phosphate pH = 6,5 (50 mM) et sous agitation à 120 rpm dans une table d'agitation thermostatée Multitron[®] (Infors[®] HT, Bottmingen, Suisse). Un prétraitement à 121°C pendant 20 minutes a systématiquement été effectué, avant l'ajout des enzymes, lors de l'utilisation du son de blé.

Les complexes enzymatiques ont été introduits soit à 5 activités cellulolytiques (5 activités papier filtre) par g de cellulose, soit à 0,5 activités cellulolytiques par g de son de blé, soit à 5 mg de protéines par g de cellulose. Des prélèvements de 2 mL ont été effectués à des intervalles de temps réguliers et ont été traités dans un bain à 100°C pendant 5 min avant détermination des sucres réducteurs ou du contenu en hydrates de carbone. Pour finir, les expériences ont été réalisées en duplicate et suivi durant 72 heures.

2.4. LES FERMENTATIONS ALCOOLIQUES

Les fermentations alcooliques ont été réalisées avec la levure commerciale Ethanol Red[®] (Lesaffre[®], France) introduite à 10⁷ levures/mL. Elles se sont déroulées à une température de 32°C, sous agitation à 100 rpm dans une table d'agitation thermostatée Multitron[®] (Infors[®] HT, Bottmingen, Suisse) et dans des flacons de 500 mL contenant 100 mL de milieu composé de 5% de matière sèche d'hydrolysate de son de blé, complété d'un apport d'azote sous forme d'urée à 500 ppm.

3. LES METHODES ANALYTIQUES

3.1. LES SUCRES REDUCTEURS

La concentration en sucres réducteurs a été estimée avec la méthode du DNS ^[105]. Pour cela, 200 µL d'échantillon ont été ajoutés à 200 µL de réactif DNS, puis homogénéiser au vortex et mis à chauffer à 100°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans un bain d'eau glacée, 2 mL d'eau déminéralisée ont été ajoutée avant lecture de l'absorbance à 540 nm à l'aide un spectrophotomètre Uvikon[®] 931 (Kontron Instruments[®], Italie). Une solution de glucose a servi de référence pour la réalisation d'une gamme d'étalonnage allant de 0 à 2 g/L.

3.2. LE DOSAGE DES PROTEINES

La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford ^[106]. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un kit de dosage commercialisé par la société Bio-Rad[®] (Hercules, Californie, Etats-Unis d'Amérique).

3.3. LES ACTIVITES ENZYMATIQUES

3.3.1. L'activité papier filtre ou cellulases totales (FPase)

Cette activité a permis de quantifier l'action globale du complexe cellulolytique et a été déterminée selon le protocole de l'IUPAC ^[107]. Une unité « papier filtre » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une µM de sucres réducteurs, équivalent glucose, par minute selon les conditions réactionnelles.

3.3.2. L'activité endoglucanase ou CMCase

Cette activité a permis de quantifier l'action des endoglucanases et a été déterminée selon le protocole de l'IUPAC ^[107]. Une unité « CMCase » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une µM de sucres réducteurs, équivalent glucose, par minute selon les conditions réactionnelles.

3.3.3. L'activité β -glucosidase

Cette activité a permis de quantifier l'action des β -glucosidases et a été déterminée à partir du protocole de Norkrans^[108] avec les modifications suivantes : le substrat a été utilisé à 5 mM dans du tampon citrate 50 mM pH = 4,8 et la réaction a été réalisée à 50°C durant 10 minutes. Une unité « β -glucosidase » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ mole de paranitrophénol par minute selon les conditions réactionnelles.

3.3.4. L'activité xylanase

Cette activité a été déterminée selon la méthode de Bailey^[109] avec les modifications suivantes : 0,1 mL de complexe enzymatique ont été ajoutés à 1,9 mL de substrat (xylane de bouleau) à 2% dans du tampon citrate 50 mM pH = 4,8. Une cinétique d'hydrolyse a ensuite été réalisée durant 10 minutes pour déterminer les sucres réducteurs libérés et calculer l'activité. Une unité « xylanase » a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ mole de sucres réducteurs, équivalent xylose, par minute selon les conditions réactionnelles.

3.3.5. L'activité amylolytique

Cette activité a été déterminée selon le protocole suivant : 1,0 mL de substrat (1% d'amidon) et 0,9 mL de tampon citrate 100 mM pH = 4,5 ont été mis à incuber à 60°C avec 0,1 mL de complexe enzymatique. Durant une période de 30 minutes, 0,2 mL d'échantillon ont été collectés toutes les 5 minutes et ont été bien mélangés avec 0,2 mL de réactif DNS. La détermination des sucres réducteurs libérés a ensuite été réalisée et les résultats reportés pour obtenir une pente. Enfin, l'activité a été calculée et exprimée comme une unité correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une μ M de sucres réducteurs, équivalent glucose, par minute selon les conditions réactionnelles.

3.4. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (C.L.H.P.)

La composition en hydrates de carbone des différents échantillons a été analysée avec un système de C.L.H.P. (LaChrom Elite[®], Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo,

Japon) équipé d'un détecteur à indice de réfraction modèle IOTA 2 (Precision Instruments, Marseille, France) et d'une colonne Aminex[®] HPX-87H (Bio-Rad[®], Hercules, Californie, Etats-Unis d'Amérique) thermostatée à 65°C ou d'une colonne Aminex[®] HPX-42A (Bio-Rad[®], Hercules, Californie, Etats-Unis d'Amérique) thermostatée à 85°C. Les analyses ont été réalisées à un débit de 0,6 mL/min, selon un mode isocratique, avec de l'acide sulfurique à 5 mM comme éluant pour la colonne Aminex[®] HPX-87H ou de l'eau ultrapure (conductivité 18,2 MOhms) comme éluant pour la colonne Aminex[®] HPX-42A.

3.5. LES ANALYSES GRANULOMETRIQUES

Les analyses granulométriques ont été réalisées sur une plage de mesure allant de 0,02 μm à 2000 μm à l'aide d'un Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments[®], Royaume-Uni). La distribution granulométrique a été caractérisée par le diamètre médian (d50) de la courbe de distribution cumulée en volume et par le *span* correspondant au rapport entre la dispersion et le diamètre médian ($d_{90}-d_{10}/d_{50}$) où les valeurs du d10, d50 et d90 représentent les 10%, 50% et 90% de la courbe cumulée en volume total.

CHAPITRE I

Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis

RESUME

La première partie de ces travaux de recherche a porté sur la comparaison en application de la fermentation en milieu solide et de la fermentation en milieu submergé lors de tests de saccharification. Pour cela, quatre complexes enzymatiques, deux produits par fermentation en milieu solide, dont l'un commercial et l'autre de laboratoire, et deux produits par fermentation en milieu submergé, dont l'un commercial et l'autre de laboratoire, ont été comparés. Les deux modes d'introduction des complexes enzymatiques servant actuellement de référence ont également été utilisés, à savoir : une introduction à iso-activité papier filtre (cellulase) et une introduction à iso-quantité de protéines. Enfin, cette comparaison a été réalisée sur deux types de matières premières : de la cellulose cristalline, utilisée comme substrat modèle, et du son de blé, utilisée comme substrat complexe.

Les résultats obtenus lors de l'hydrolyse du substrat modèle (cellulose) ont montré une meilleure performance du complexe enzymatique de laboratoire produit par fermentation en milieu solide, avec une nette amélioration du taux de saccharification atteint après 72 heures, par rapport aux autres complexes. Cette meilleure efficacité dans la conversion d'un substrat cellulosique insoluble serait vraisemblablement due à une quantité plus importante de cellobiohydrolases ou à une meilleure efficacité de ces exoglucanases (avec la présence possible de protéines auxiliaires).

Les résultats obtenus lors de l'hydrolyse du substrat complexe (son de blé) ont montré une meilleure performance des complexes enzymatiques produits par fermentation en milieu solide en comparaison de leur équivalent issu d'une fermentation en milieu submergé. Une meilleure accessibilité et capacité de conversion des glucanes a ainsi pu être observée, probablement due à la présence plus importante d'activités secondaires (arabinofuranosidases,...). Ces résultats ont permis de démontrer que les complexes enzymatiques produits par fermentation en milieu solide étaient plus performants dans la conversion de la lignocellulose que ceux produits par fermentation en milieu submergé.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats permet d'avancer que la fermentation en milieu solide est une technologie prometteuse qui pourrait favoriser une diminution de la quantité d'enzymes nécessaire à l'hydrolyse d'une biomasse lignocellulosique, et par conséquent diminuer le coût de l'étape de conversion.

Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis

Vincent Prévot ^{a, b}, Michel Lopez ^c, Estelle Copinet ^{a, b}, Francis Duchiron ^{a, b, *}

^a *Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR614 Fractionnement des AgroRessources et Environnement, B.P. 1039, F-51687 Reims cedex 2, France*

^b *INRA, UMR614 Fractionnement des AgroRessources et Environnement, B.P. 1039, F-51687 Reims cedex 2, France*

^c *Ets J. Soufflet, Quai du Général Sarrail, F-10402 Nogent-sur-Seine, France*

* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 34 07; fax: +33 3 26 91 39 16.

E-mail address: francis.duchiron@univ-reims.fr (F. Duchiron).

A B S T R A C T

The aim of this study was to compare the hydrolysis performances of four lignocellulolytic complexes from commercial or laboratory origin and produced either by solid-state fermentation or by submerged fermentation. To evaluate their potential, saccharification tests were performed on cellulose, as model substrate, and wheat bran, as lignocellulosic substrate, using either the same filter paper unit or the same amount of protein to introduce these enzymatic complexes. A great difference was observed for the laboratory enzymatic complex produced by solid-state fermentation, which has shown a greater efficiency of cellobiohydrolase on cellulose and better conversion capacity on wheat bran, probably due to the presence of side activities. This comparison has proved that solid-state fermentation could be a promising

technology to overcome the biomass recalcitrance and lower the cost of conversion step.

Keywords:

Solid-state fermentation

Submerged fermentation

Lignocellulose

Cellulases

Enzymatic hydrolysis

1. Introduction

Over the last three decades, lignocellulosic biomass conversion has received a great interest, mainly due to the potential use of carbohydrates and lignin as sustainable sources of bioethanol or bioproducts precursors in a biorefinery concept ([Kamm and Kamm, 2004](#))^[110]. Exploitation of the lignocellulose polysaccharides requires breaking them down into fermentable sugars. However, the major components of lignocellulosic biomass (cellulose, hemicelluloses and lignin) may have variations in their proportions and structural arrangements, depending on the type and age of the plant, resulting in a particularly recalcitrant structure to enzymatic hydrolysis ([Himmel et al., 2007](#))^[50].

Among the different feedstocks, wheat represents one of the most important crops produced worldwide with 653.6 million tons produced in 2010 and the most widespread on earth with 217.2 million hectares harvested in 2010 ([FAOSTAT, 2012](#))^[25]. Wheat milling industry generates a large amount of bran, a co-product corresponding to the outer part of the grain, which generally accounts for 14-19% of

the total mass. The main components of this fibrous material include (glucurono)arabinoxylans, mixed linkage β -glucans, cellulose, proteins, lignin and variable proportions of starch dependent on the milling conditions ([Maes and Delcour, 2001](#)) ^[30]. This agro-industrial residue remains an important source of lignocellulose with low value-added.

Currently, technical feasibility of the biochemical conversion processes from lignocellulosic biomass has been proved, but economical feasibility has not been yet demonstrated due to the low yield and high cost of enzymatic hydrolysis step ([Talebnia et al., 2010](#)) ^[64]. The wide diversity of plant-cell-wall-degrading enzymes necessary for an efficient saccharification, especially cellulases, hinders the competitiveness of the processes. Existing research with the GMO approach to reduce the conversion cost represent a considerable and very complicated work on many enzymes, which shows limited results for the moment. Development of new strategies is therefore requisite to overcome the biomass recalcitrance, to improve the cellulose accessibility and to make the conversion step cost-effective, but also the processes cost-competitive.

Among the different cellulolytic strains, *Trichoderma reesei* species are recognized as the best adapted for the production of enzymatic complexes, and more particularly the QM 9414 and Rut-C30 public access mutants ([Cen and Xia, 1999](#)) ^[79]. Two technologies are currently utilized to achieve the production of enzymatic complexes: traditional submerged fermentation (SmF), which occurs in the presence of excess water submerging nutrients and microorganisms, and solid-state fermentation (SSF), which happens on insoluble solids in the absence or near absence of free water. Most enzymes companies apply classical SmF technology to manufacture their biocatalysts because this process is regarded to be more easily controlled. However,

SSF technology could be an interesting alternative pathway, which is nowadays underexploited, to generate enzymatic complexes. One of the main SSF advantages is the direct use of raw materials (i.e., lignocellulose), which are employed to induce the production of a broad range of enzymes. This technology has also been recognized to have lower consumption of water and energy, high side activities, and it has been generally claimed that product yields are higher in SSF than in SmF (Singhania et al., 2010; Pandey, 2003)^[83, 84].

Many studies have been realized in order to compare SSF and SmF in terms of product yields and characteristics (Hölker et al., 2004)^[82]. Unfortunately, there has been few studies comparing these technologies on their performance in application. Consequently, the aim of this study was to fill this lack, and thus saccharification tests have been initiated on cellulose and wheat bran.

2. Methods

2.1. Chemicals and substrates

All chemicals used in this study were of analytical grade. Microcrystalline cellulose (Avicel[®] PH-101) was purchased from Sigma-Aldrich[®] Corporation (St. Louis, MO, USA). Wheat bran was kindly provided by Soufflet's group (Nogent-sur-Seine, France). This biomass contains about: 35.5% hemicelluloses, 11.4% cellulose, 4% lignin, 13.7% starch, 17.4% proteins and 5.6% ash (content analysis was performed by InVivo Labs[®], Chierry, France). Destarched wheat bran was produced by processing wheat bran with Amylyve[®] UHT, a commercial α -amylase provided by Lyven[®] (Colombelles, France), according to the application recommendation. After that, residual wheat bran was filtered and washed before drying at 90 °C, then store at room temperature until use.

2.2. Enzymes

A strain of *Trichoderma reesei* Rut-C30 was purchased from VTT Technical Research Centre of Finland (Espoo, Finland) and used to produce the laboratory enzymatic complexes. For SSF, the culture was carried out by fermenting 10 g of destarched wheat bran supplemented with 10 mL of Mandel's medium diluted 10 times (Mandels and Weber, 1969) ^[102]. Relative humidity was adjusted with sterile water to 60% before inoculation. For SmF, the culture was performed at 2% of destarched wheat bran for a final volume of 100 mL and was agitated at 120 rpm in a rotary shaker Multitron[®] (Infors[®] HT, Bottmingen, Switzerland). All cultures were done in 500 mL Erlenmeyer flasks and were inoculated at 1.10^7 conidia/g of destarched wheat bran with a conidial suspension from a one week culture on potato dextrose agar (PDA). Thereafter, cultures were incubated at 30 °C for five days. Extraction of enzymatic complexes was achieved either by mixing together 30 g of fermented destarched wheat bran and 200 mL of deionized water in a blender 8010 EB model HGBTWT (Waring[®] Commercial, Torrington, CT, USA) for SSF, or by filtering against a filter cloth for SmF. Then, both extracts were centrifugated in a centrifuge model 5804 R (Eppendorf[®], Hamburg, Germany) at 10,000 rpm and 4 °C for 10 min. Finally, the extracts were stored at 4 °C before use and designated below as the SSF extract and the SmF extract.

Celluclast[®] 1.5 L was used as SmF commercial complex and purchased from Sigma-Aldrich[®] Corporation. This product was manufactured from a selected strain of *Trichoderma reesei* QM 9414 (Krishna and Chowdary, 2000) ^[103] by Novozymes[®] A/S (Bagsvaerd, Denmark). Lyvanol[®] devisco 1500 was used as SSF commercial complex. This product was manufactured from a non-GMO strain of *Trichoderma longibrachiatum* (Soupe, 2012, personal communication) ^[104] and given by Lyven[®].

2.3. Enzymatic hydrolysis

The enzymatic hydrolyses of cellulose and wheat bran were carried out in 500 mL stoppered flasks at 2% of dry substrate (DS) for a final reaction volume of 100 mL. A pretreatment step was done at 121 °C for 20 min prior to wheat bran hydrolysis. Reactions were performed at 50 °C in citrate buffer 100 mM, pH 4.8 and agitated at 120 rpm in a rotary shaker Multitron® (Infors® HT). Each enzymatic complex was introduced at 5 filter paper unit (FPU) or 5 mg protein per gram of cellulose. Samples of 2 mL were removed at stipulated time intervals and placed in a boiling bath at 100 °C for 5 min to stop the reaction before determination of reducing sugars or carbohydrate content. Experiments were realized in duplicate and followed for 72 h.

2.4. Analytical methods

Cellulase (FPase) and endoglucanase activities were determined in accordance with the IUPAC procedure ([Ghose, 1987](#))^[107]. One unit was defined as the amount of enzyme required to liberate one μ M of reducing sugars, equivalent as glucose, per min from filter paper or carboxymethyl cellulose under the assay conditions. β -glucosidase activity was determined according to the method of [Norkrans \(1957\)](#)^[108] with the following modifications: substrate was used at 5 mM in citrate buffer pH 4.8 and reaction was performed at 50 °C during 10 min. Xylanase activity was determined according to the method of [Bailey et al. \(1992\)](#)^[109] with some modifications: 0.1 mL of enzymatic complex was added to 1.9 mL of substrate at 2% in buffer pH 4.8. Then, kinetics was followed during 10 min to determine the reducing sugars liberated and finally calculate the activity. One unit was defined as the amount of enzyme required to liberate one μ M of reducing sugars, equivalent as xylose, per

min under the assay conditions. The protein concentration was determined with an assay kit (Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA) according to Bradford (1976)^[106] method.

Estimation of reducing sugars was accomplished by the DNS method (Bernfeld, 1955)^[105] with glucose as reference. Carbohydrate composition was analyzed using a HPLC system (LaChrom Elite[®], Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a refractive index detector model IOTA 2 (Precision Instruments, Marseille, France) and an Aminex[®] HPX-87H column (Bio-Rad[®]) thermostated at 65 °C. Analyses were performed at a flow rate of 0.6 mL/min in an isocratic mode with 5 mM sulfuric acid as eluent.

3. Results and discussion

3.1. Comparison of hydrolysis performances on cellulose

First of all, saccharification tests were performed on cellulose in order to understand the action of the different enzymatic complexes on this fiber alone. After 72 h of hydrolysis at the same FPU added (Table 1A), a conversion degree of 44.7%, 34.8%, 34.8%, 33.2% as reducing sugars (data not show) and of 55%, 38.4%, 37.4%, 35.5% as carbohydrate content (Table 1B) was reached respectively for the SSF extract, Lyvanol[®] devisco 1500, the SmF extract and Celluclast[®] 1.5 L. Surprisingly, results indicate a higher hydrolysis degree (based on carbohydrate content) of at least 40% for the SSF extract and demonstrate an extraordinary conversion capacity for only five FPU introduced. As can be seen, a great correlation may be done between β -glucosidases activities introduced, residual cellobiose and glucose release for all complexes, except for the SSF extract that shows an important amount of residual cellobiose. In view of the others activities introduced, no

explanation can be formulated for this result. Consequently, these findings suggest either an elevated amount of cellobiohydrolases or a better efficiency of these exoglucanases with the possible presence of auxiliary proteins. According to [Brethauer et al. \(2011\)](#) ^[111] and as observed for the SSF extract, a largest amount of protein added than for the others complexes could provide a protective role against de-activation like the addition of BSA or surfactant. However, in our opinion, protein addition could lead to a more diffuse adsorption of cellobiohydrolases over time that would limit the de-activation occurring due to irreversible adsorption onto cellulose fiber ([Sun and Cheng, 2002](#)) ^[22].

Following this part, saccharification tests were performed at the same amount of protein added ([Table 1A](#)). After 72 h of hydrolysis, analysis of carbohydrate content ([Table 1B](#)) shows a cellulose conversion degree of 44.6%, 43.7% and 39.7%, respectively, for Celluclast[®] 1.5 L, the SmF extract and Lyvanol[®] devisco 1500. Only the SSF extract exhibits a low conversion degree (22.4%), which is mainly due to the low FPU introduced. However, as discussed above, an important and unexplained amount of cellobiose was again released with this complex. In spite of the 4-6 times less FPU introduced in comparison to the others complexes, an important degree of hydrolysis was achieved with only a lesser conversion of about 50%. This proves that the crude unprocessed SSF extract demonstrates a significantly better efficiency in cellulose conversion reported to the presence of cellulolytic complex than the other enzymatic complexes.

3.2. Comparison of hydrolysis performances on lignocellulosic complex

In this part, we aimed to understand the behavior of the different enzymatic complexes on wheat bran hydrolysis and in particular on the accessibility to the

cellulose fibers. Experiments were performed by introducing the enzymatic complexes depending on the cellulose content in wheat bran (Table 2A). After 72 h of hydrolysis, analyses of carbohydrate content (Table 2B) show a great difference between the different enzymatic complexes. Firstly, the SSF extract profile for the same FPU added confirms a significantly higher reducing sugars concentration of 1.5 times relative to the other complexes (data not show) with the highest amount of glucose, cellobiose and xylose released. In addition, an exceptionally high glucose concentration (3.39 g/L) was reached in comparison to Lyvanol[®] devisco 1500 (1.91 g/L), Celluclast[®] 1.5 L (1.45 g/L) and the SmF extract (1.41 g/L). An examination on the presence of amylolytic activities in the complexes has revealed low activities in the commercial enzymatic complexes but none in the laboratory enzymatic complexes (data not show), probably due to the use of destarched wheat bran to produce theses complexes. These findings suggest that the main part of glucose released by the laboratory enzymatic complexes comes from cellulose and/or mixed linkage β -glucans. Moreover, a total of cellobiose and glucose at 4.06 g/L and at 2.49 g/L, respectively for the same FPU added and for the same amount of protein added, confirms a better accessibility and conversion capacity of the glucans fibers for the SSF extract. Secondly, no detection of arabinose was noticed for the commercial enzymatic complexes, whereas this compound was observed for the crude unprocessed laboratory enzymatic complexes. This result suggests the lack of arabinofuranosidase, and this is not surprising in liquid enzyme preparations from industry to obtain a higher protein concentration. Moreover, presence of this side activity in the SSF extract could partially explain the higher amount of xylose released and the better accessibility to glucans fibers. Thirdly, the SSF enzymatic complexes are always better in releasing the carbohydrates compared to their equivalent SmF

enzymatic complexes. These observations seem to prove that the SSF enzymatic complexes are more efficient in lignocellulose conversion than the SmF enzymatic complexes. Finally, all the polymers of glucose present in wheat bran were not converted (data not show). Further investigations must therefore be made with a particular focus on lignin that could limit partially the efficiency of the enzymatic complexes as demonstrated by [Narra et al. \(2012\)](#) ^[112] on rice straw.

4. Conclusions

In conclusion, this study has compared the conversion capabilities of different SSF and SmF enzymatic complexes from best public *Trichoderma* strains and has proved that the SSF enzymatic complexes present a greater efficiency in lignocellulose saccharification, more particularly a crude unprocessed complex. The SSF is a promising technology to reduce the cost of conversion step of lignocellulosic biomass. A comparative economic analysis of the entire process, from biocatalysts production to their use and between the crude unprocessed SSF complex and the best enzymatic complexes produced from GMOs by SmF, could help to confirm the great potential of the SSF technology.

Acknowledgement

This work was supported by Soufflet's group.

References

Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23 (3), 257-270.

- Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β , in: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 1. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 149-158.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1-2), 248-254.
- Brethauer, S., Studer, M.H., Yang, B., Wyman, C.E., 2011. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. *Bioresour. Technol.* 102 (10), 6295-6298.
- Cen, P., Xia, L., 1999. Production of cellulase by solid-state fermentation. *Adv. Biochem. Eng.* 65, 69-92.
- FAOSTAT (2012). FAOSTAT Agriculture Data, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (accessed August).
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59 (2), 257-268.
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315 (5813), 804-807.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 175-186
- Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2), 137-145.
- Krishna, S.H., Chowdary, G.V., 2000. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. *J. Agric. Food Chem.* 48 (5), 1971-1976.

Maes, C., Delcour, J.A., 2001. Alkaline hydrogen peroxide extraction of wheat bran non-starch polysaccharides. *J. Cereal Sci.* 34 (1), 29-35.

Mandels, M., Weber, J., 1969. The production of cellulases, in: Gould, R.F. (Ed.), *Cellulases and Their Applications. Advances in Chemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, vol. 95, pp. 391-414.

Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Madamwar, D., Shah, A.R., 2012. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresour. Technol.* 121, 355-361.

Norkrans, B., 1957. Studies of β -glucoside- and cellulose splitting enzymes from *Polyporus annosus* Fr. *Physiol. Plant.* 10 (1), 198-214.

Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13 (2-3), 81-84.

Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Technol.* 46 (7), 541-549.

Soupe, J., 2012. Personal communication: jsoupe.lyven@soufflet-group.com.

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83 (1), 1-11.

Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101 (13), 4744-4753.

Table 1

Enzymatic complexes activities introduced in cellulose (Avicel[®] PH-101) hydrolysis tests (A) and carbohydrate content of the hydrolyzates after 72 h of hydrolysis (B).

Table 2

Enzymatic complexes activities introduced in lignocellulosic complex (wheat bran) hydrolysis tests (A) and carbohydrate content of the hydrolyzates after 72 h of hydrolysis (B).

Table 1

A

		SSF extract (Rut-C30)	SmF extract (Rut-C30)	Lyvanol [®] devisco 1500	Celluclast [®] 1.5 L
Same FPU added	Cellulases (U/g of DS)	5	5	5	5
	Endoglucanases (U/g of DS)	103	64	145	79
	β -glucosidases (U/g of DS)	38.1	27.1	275.5	20.8
	Proteins (mg/g of DS)	19.56	3.17	4.50	3.35
Same amount of protein added	Cellulases (U/g of DS)	1.3	7.9	5.5	7.4
	Endoglucanases (U/g of DS)	26	102	161	117
	β -glucosidases (U/g of DS)	9.7	42.7	306.1	30.7
	Proteins (mg/g of DS)	5	5	5	5

B

		SSF extract (Rut-C30)	SmF extract (Rut-C30)	Lyvanol [®] devisco 1500	Celluclast [®] 1.5 L
Same FPU added	Glucose (g/L)	7.53	6.78	7.87	5.63
	Cellobiose (g/L)	4.04	1.10	0.22	1.85
Same amount of protein added	Glucose (g/L)	2.56	8.05	8.17	7.40
	Cellobiose (g/L)	2.16	1.16	0.20	1.99

Table 2

A

		SSF extract (Rut-C30)	SmF extract (Rut-C30)	Lyvanol® devisco 1500	Celluclast® 1.5 L
Same FPU added	Cellulases (U/g of DS)	0.5	0.5	0.5	0.5
	Endoglucanases (U/g of DS)	10.3	6.4	14.5	7.9
	β-glucosidases (U/g of DS)	3.81	2.71	27.55	2.08
	Xylanases (U/g of DS)	75.6	140.6	1 010	10.5
	Proteins (mg/g of DS)	1.956	0.317	0.45	0.335
Same amount of protein added	Cellulases (U/g of DS)	0.13	0.79	0.55	0.74
	Endoglucanases (U/g of DS)	2.6	10.2	16.1	11.7
	β-glucosidases (U/g of DS)	0.97	4.27	30.61	3.07
	Xylanases (U/g of DS)	19.3	222	1 122	15.5
	Proteins (mg/g of DS)	0.5	0.5	0.5	0.5

B

		SSF extract (Rut-C30)	SmF extract (Rut-C30)	Lyvanol® devisco 1500	Celluclast® 1.5 L
Same FPU added	Glucose (g/L)	3.39	1.41	1.91	1.45
	Cellobiose (g/L)	0.67	0.48	ND	ND
	Xylose (g/L)	2.59	1.71	2.17	1.95
	Arabinose (g/L)	0.34	0.30	ND	ND
Same amount of protein added	Glucose (g/L)	1.80	1.57	2.01	1.75
	Cellobiose (g/L)	0.69	0.20	ND	ND
	Xylose (g/L)	2.09	1.97	2.25	2.08
	Arabinose (g/L)	0.23	0.29	ND	ND

ND: not detected.

CHAPITRE II

Understanding the recalcitrant factors in lignocellulosic biomass hydrolysis to determine the carbohydrates potentially releasable in wheat bran

RESUME

Dans la partie précédente, une comparaison a été réalisée entre des complexes enzymatiques, produits par fermentation en milieu solide ou par fermentation en milieu liquide, lors de tests de saccharification sur de la cellulose ou du son de blé. Cette comparaison a permis de démontrer le potentiel de la fermentation en milieu solide grâce à une meilleure efficacité de ces produits, notamment lors de la conversion d'un substrat lignocellulosique comme le son de blé. Cependant, malgré cette amélioration de la performance des biocatalyseurs, l'ensemble des polysaccharides contenus dans cette matière première n'a pas été converti (données non présentées).

Aussi, dans la deuxième partie de ces travaux, une étude de la conversion du son de blé a été entreprise, et plus particulièrement une étude des facteurs de la récalcitrance de cette biomasse à l'hydrolyse enzymatique. L'objectif de cette étude était également de déterminer le potentiel de glucides libérables et leur origine. Pour cela, une hydrolyse successive du son de blé a été réalisée à l'aide d'une α -amylase, d'une lichenase et d'un complexe cellulolytique et hémicellulolytique provenant d'une culture par FMS de *Trichoderma reesei* Rut-C30. Un broyage et/ou une complémentation avec une arabinofuranosidase ou une β -glucosidase d'origine commerciale a également été réalisé. Les résultats obtenus ont permis de démontrer qu'il y avait principalement deux facteurs dans la récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique du son de blé : un facteur physique, provenant d'une accessibilité limitée aux polysaccharides contenus dans cette matière première, et un facteur biochimique, provenant d'une absence ou d'une faible présence de certaines activités enzymatiques (féruloyl estérase, β -glucosidase,...). Ces résultats ont également permis de déterminer que le glucose libéré provenait d'amidon résiduel issu de l'endosperme, de β -glucanes à liaisons mixtes issus de la couche aleurone et de cellulose vraisemblablement issue des parois des couches cellulaires non lignifiées (couche à aleurone, bande hyaline, testa), mais aussi que les pentoses provenaient très probablement des parois des couches cellulaires non lignifiées. Enfin, cette étude a permis de déterminer un potentiel en glucides libérables de 147 g de pentoses et de 257,7 g de glucose à partir d'un kilogramme de son de blé.

Understanding the recalcitrant factors in lignocellulosic biomass hydrolysis to determine the carbohydrates potentially releasable in wheat bran

Vincent Prévot ^{a, b}, Michel Lopez ^c, Estelle Copinet ^{a, b}, Francis Duchiron ^{a, b, *}

^a *Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR614 Fractionnement des AgroRessources et Environnement, B.P. 1039, F-51687 Reims cedex 2, France*

^b *INRA, UMR614 Fractionnement des AgroRessources et Environnement, B.P. 1039, F-51687 Reims cedex 2, France*

^c *Ets J. Soufflet, Quai du Général Sarrail, F-10402 Nogent-sur-Seine, France*

* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 91 34 07; fax: +33 3 26 91 39 16.

E-mail address: francis.duchiron@univ-reims.fr (F. Duchiron).

A B S T R A C T

Aim of this study was to understand the recalcitrant factors in lignocellulosic biomass hydrolysis and to determine the carbohydrates potentially releasable in wheat bran with their origin. A successive enzymatic hydrolysis of wheat bran was performed with a α -amylase, a lichenase, and a cellulolytic and hemicellulolytic complex from *Trichoderma reesei* Rut-C30. A grinding and/or a complementation with an arabinofuranosidase or a commercial β -glucosidase preparation have also been made. Results have demonstrated two mains factors in recalcitrance of this biomass: a physical limitation and a biochemical limitation. The determination of the glucose source of glucose (residual starch from endosperm, mixed linkage β -glucans from cell wall of aleurone layer, and cellulose probably from cell wall of non-lignified cells (aleurone layer, hyaline layer and seed coat)) and of pentose source (from non-

lignified cells) have also be performed. Finally, this study has confirmed a total of carbohydrates potentially releasable of 147 g of pentoses and of 257.7 g of glucose for 1 kg of wheat bran.

Keywords:

Lignocellulose

Enzymatic hydrolysis

Accessibility

Cell wall

Recalcitrance

1. Introduction

The biorefinery concept is based on the use of carbon molecules extracted from the whole plant to replace the carbon from fossil energy source ([Octave and Thomas, 2009](#))^[17]. Currently, most of the industrial plants are only based on the use of food parts of plants to produce biotechnological products (i.e. bioethanol, bioproducts). However, a competition for food has emerged with the growing world population expected to reach about 8~11 billion in 2050 ([Percival Zhang, 2008](#))^[45] and changing consumption patterns in emerging countries. Therefore, the development of biorefineries will likely using the structural parts of plants, mainly composed of lignocellulose.

Lignocellulosic biomass is an abundant and renewable energy source with an annual production of about 2.10^{11} tons per year ([Percival Zhang, 2008](#))^[45] and could be a great feedstock to replace petroleum. Lignocellulose represents the main structural component of plant cell wall and is a complex matrix mainly composed of

three polymers: cellulose, hemicellulose and lignin. Cellulose is a linear homopolysaccharide of D-anhydroglucopyranose units linked together by β -1,4 glycosidic bonds, which is combined with hemicellulose, a various group of heteropolymers (arabinoxylans, mixed-linkage β -glucans, xyloglucans, mannans), and is embedded in lignin, a complex heteropolyphenolic structure ([Chundawat et al., 2011](#))^[37]. These components may have variations in their proportions and structural arrangements, depending on the plant cell type and maturity, with about 35 cells types ([Cosgrove, 2005](#))^[38], resulting in a recalcitrant structure to the enzymatic hydrolysis ([Himmel et al., 2007](#))^[50].

Among the different feedstocks, wheat represents the fourth most important crops produced worldwide, with 653.6 million tons produced in 2010, and the most widespread on earth, with 217.2 million hectares harvested in 2010 ([FAOSTAT, 2012](#))^[25]. Processing of wheat kernel in the milling industry generates a large amount of bran, a co-product to the flour production representing about 14-19% of the grain total mass ([Maes and Delcour, 2001](#))^[30]. Annual production of wheat bran represents about 2 million tons for France and 6 million tons in the European Union ([Rouau et al., 2008](#))^[32]. Currently, this agro-industrial residue remains an abundant and commercially available source of lignocellulose with low value-added.

The biochemical composition of wheat bran from milling industry consists of (glucurono)arabinoxylans (22-25%), mixed-linkage β -glucans, cellulose (7-11%), proteins (14-17%), lignin (3-10%) and variable proportions of residual starch (11-30%) depending on the milling conditions ([Kabel et al., 2005](#))^[29]. However, wheat bran has a heterogeneous structure and its biochemical composition does not reflect the real conversion potential by enzymatic hydrolysis.

Histologically, wheat bran comprises the outer tissues of the wheat kernel. These tissues are composed of different layers with, from the external to the internal part: the outer pericarp, the inner pericarp, the testa and the hyaline layer. Wheat bran from milling industry comprises also the aleurone layer and residual starch from endosperm (Evers and Millar, 2002)^[113]. Its heterogeneous recalcitrant structure comes from variability in the cell wall composition (Table 1).

In the present study, we propose to investigate the enzymatic hydrolysis of wheat bran in order to understand the recalcitrant factors of this lignocellulosic biomass and to determine the carbohydrates potentially releasable with their origin.

2. Methods

2.1. Chemicals and substrate

All chemicals used in this investigation were of analytical grade. Wheat bran (WB) from common wheat (*Triticum aestivum*) was kindly provided by Soufflet's group (Nogent-sur-Seine, France). This biomass contains about: 35.5% hemicelluloses, 17.4% proteins, 15.8% starch, 11.4% cellulose, 5.6% ash and 4% lignin (composition analysis was performed by InVivo Labs[®], Chierry, France). Destarched wheat bran was produced by processing wheat bran in tap water at 90 °C and pH 6.5 during 1 h with Amylyve[®] UHT, a commercial heat stable α -amylase from *Bacillus licheniformis* provided by Lyven[®] (Colombelles, France), introduced at 250 mg/kg of WB. After that, residual wheat bran was filtered and washed thoroughly before drying at 90 °C, then store at room temperature until use.

2.2. Enzymes

The cellulolytic and hemicellulolytic complex was produced by solid-state fermentation in our laboratory. A strain of *Trichoderma reesei* Rut-C30 was purchased from VTT Technical Research Centre of Finland (Espoo, Finland) and was cultured on 10 g of destarched wheat bran supplemented with 10 mL of Mandel's medium diluted 10 times (Mandels and Weber, 1969)^[102] in 500 mL Erlenmeyer flasks. After sterilization at 121 °C during 20 min, medium was inoculated at 1.10^7 conidia/g of destarched wheat bran with a conidial suspension from a one week culture on potato dextrose agar (PDA) and relative humidity was adjusted with sterile water to 60%. Immediately after, culture was incubated at 30 °C for five days. Extraction of enzymatic complex was achieved by mixing together 30 g of fermented destarched wheat bran and 200 mL of deionized water in a blender 8010 EB model HGBTWT (Waring® Commercial, Torrington, CT, USA). Then, extract was centrifugated in a centrifuge model 5804 R (Eppendorf®, Hamburg, Germany) at 10,000 rpm and 4 °C for 10 min. Finally, extract was stored at 4 °C before use and designated below as the SSF extract.

Lyvanol® GA, a commercial glucoamylase preparation manufactured from a strain of *Aspergillus niger*, was given by Lyven®. α -L-arabinofuranosidase, manufactured from a strain of *Aspergillus niger*, and lichenase, manufactured from a strain of *Bacillus subtilis*, were purchased from Megazyme® International (Wicklow, Ireland). Novozym® 188, a commercial β -glucosidase preparation manufactured from a strain of *Aspergillus niger*, was purchased from Sigma-Aldrich® Corporation (St. Louis, MO, USA). This product was manufactured by Novozymes® A/S (Bagsvaerd, Denmark).

2.3. Successive processing of wheat bran

Processing of wheat bran was performed according to the procedure described in [Figure 1](#). Briefly, wheat bran (10% based on a dry matter) suspended in tap water was first treated during 1 h at 85 °C and pH 6.5 with a α -amylase (Amylyve[®] UHT) introduced at 500 mg/kg of WB. Then, wheat bran was treated during 2 h at 60 °C and pH 6.5 with a lichenase introduced at 100 U/10 g of WB. At each step, a sample was collected and centrifuged to recover the soluble fraction in order to determine the carbohydrates released. This determination was performed by hydrolyzing each sample with a mix of Lyvanol[®] GA and Novozym[®] 188 during 24 h at 50 °C and pH 6.5 before HPLC analysis. After the α -amylase and lichenase treatment, residual wheat bran was filtered, washed thoroughly and dried at 90 °C. This pretreated wheat bran (PWB) was then used either directly in enzymatic hydrolysis or previously ground during 1 h with a laboratory mill MiniFer (Netzsch[®], Selb, Germany) equipped with a 0.8 mm sieve and balls of 2.0 mm.

2.4. Enzymatic hydrolysis

The enzymatic hydrolyses were performed with the PWB previously ground or not and were carried out in 500 mL stoppered flasks at 5% of dry substrate for a final reaction volume of 100 mL. A pretreatment step was done at 121 °C for 20 min prior to the addition of biocatalysts. Reactions were performed at 50 °C either in citrate buffer (50 mM, pH 4.8) or in phosphate buffer (50 mM, pH 6.5) for the lichenase control and were agitated at 120 rpm in a rotary shaker Multitron[®] (Infors[®] HT, Bottmingen, Switzerland). Each enzyme or enzymatic complex was introduced as follows: Lyvanol[®] GA at 100 U of amylolytic activity/g of PWB, lichenase at 10 U/g of PWB, α -L-arabinofuranosidase at 40 U/g of PWB, Novozym[®] 188 at 100 U of β -

glucosidase activity/g of PWB and the SSF extract at 0,5 U of cellulase activity/g of PWB (with also 7.3 U of endoglucanase activity, 2.7 U of β -glucosidase and 150 U of xylanolytic activity/g of PWB). Samples of 2 mL were removed at stipulated time intervals and placed in a boiling bath at 100 °C for 5 min to stop the reaction before determination of reducing sugars or carbohydrate content. Experiments were realized in duplicate and followed for 72 h.

2.5. *Analytical methods*

Cellulase (FPase) and endoglucanase (CMCase) activities were determined in accordance with the IUPAC procedure ([Ghose, 1987](#))^[107]. One unit was defined as the amount of enzyme required to liberate one μ M of reducing sugars, equivalent as glucose, per min from filter paper or carboxymethyl cellulose under the assay conditions. β -glucosidase activity was determined according to the method of [Norkrans \(1957\)](#)^[108] with the following modifications: substrate was used at 5 mM in citrate buffer pH 4.8 and reaction was performed at 50 °C during 10 min. Xylanase activity was determined according to the method of [Bailey et al. \(1992\)](#)^[109] with some modifications: 0.1 mL of enzymatic complex was added to 1.9 mL of substrate at 2% in buffer pH 4.8. Then, kinetics was followed during 10 min to determine the reducing sugars liberated and finally calculate the activity. One unit was defined as the amount of enzyme required to liberate one μ M of reducing sugars, equivalent as xylose, per min under the assay conditions. Amylolytic activity was assayed as follows: 1.0 mL of substrate (1% starch) and 0.9 mL of citrate buffer (100 mM, pH 4.5) were incubated at 60 °C with 0.1 mL of enzymatic complex. 0.2 mL of sample was collected and mixed well with 0.2 mL of DNS reagent every 5 min during a period of 30 min. Determination of reducing sugars liberated was done and results were reported to

obtain a slope. Finally, activity was calculated and expressed as one unit corresponding to the amount of enzyme required to liberate one μM of reducing sugars, equivalent as glucose, per min under the assay conditions.

Estimation of reducing sugars was accomplished by the DNS method (Bernfeld, 1955)^[105] with glucose as reference. Carbohydrate composition was analyzed using a HPLC system (LaChrom Elite[®], Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a refractive index detector model IOTA 2 (Precision Instruments, Marseille, France) and either an Aminex[®] HPX-87H column (Bio-Rad[®], Hercules, CA, USA) thermostated at 65 °C or an Aminex[®] HPX-42A column (Bio-Rad[®]) thermostated at 85 °C. Analyses were performed at a flow rate of 0.6 mL/min in an isocratic mode either with 5 mM sulfuric acid as eluent for the Aminex[®] HPX-87H column or with deionized water (conductivity 18.2 M Ω) as eluent for the Aminex[®] HPX-42H column.

3. Results and discussion

3.1. Carbohydrates releasable from wheat bran without pretreatment and complementation

First of all, this investigation started by determining the carbohydrates potentially releasable from wheat bran without pretreatment and complementation. In this view, a successive wheat bran hydrolysis was performed with a α -amylase, a lichenase and a cellulolytic and hemicellulolytic complex (the SSF extract) according to the procedure described in Figure 1. The first enzymatic treatment with the α -amylase (Amylyve[®] UHT) shows the liberation of different oligosaccharides. After a complete hydrolysis of the sample collected, results indicate a glucose potential from starch of about 165.5 g/kg of WB (149 g of starch/kg of WB), representing an estimated

conversion of 94.3%. The second enzymatic treatment with the lichenase shows the liberation of cellotriose and cellotetraose (data not show) thus demonstrating the presence of mixed linkage β -glucans. Analysis of glucose content from the sample collected after complete hydrolysis indicates a glucose potential from mixed linkage β -glucans of 35 g/kg of WB, representing a content of 3.15% in wheat bran and about 6.72% of the non-starch polysaccharides. This result is in agreement with the content generally found in wheat bran (6% of the non-starch polysaccharides) according to [Basic and Stone \(1981\)](#) ^[114]. Finally, the last enzymatic treatment ([Table 2](#)) shows that all the remaining glucose liberated comes from cellulose because no new significant release of glucose, cellotriose, cellotetraose, or reducing sugars was detected (data not show) after the action of glucoamylase or lichenase. Results indicate that the cellulolytic and hemicellulolytic complex allows the liberation of about 1.5 g/L of glucose and 0.35 g/L of cellobiose, representing a cellulose conversion of 19.7% (22.5 g/kg of WB), but also the liberation of xylotriose (1.19 g/L), xylobiose (4.60 g/L), xylose (2.70 g/L) and arabinose (1.21 g/L), representing an arabinoxylans hydrolysis of 110.1 g/kg of WB. Finally, the arabinose/xylose ratio (A/X ratio) obtained is of 0.14 and corresponds to the A/X ratio found for the non-lignified cells (aleurone layer, hyaline layer, seed coat) of WB suggesting a specific hydrolysis of these cell layers. These results are in agreement with those of [Beaugrand \(2005\)](#) ^[115] showing that the enzymatic digestion of wheat bran starts from the aleurone layer and progresses towards the inner parts of the bran.

3.2. Limitation of hydrolysis by physical factors

To continue this investigation, a study of the structural factors limiting the wheat bran hydrolysis was performed. In a first approach, the physical accessibility to the

polysaccharides was studied. The same hydrolysis experiments as previously were performed with the cellulolytic and hemicellulolytic complex but after grinding the PWB ([Figure 1](#)). As can be seen in [Table 3](#), all the glucose released comes from cellulose because there is no liberation of cellotriose, cellotetraose or reducing sugars observed after the action of lichenase and despite the low amount of glucose detected with the Lyvanol[®] GA that could be due to the presence of cellulolytic activity in this complex (confirmed by the presence of cellobiose). Grinding results show an increase of about 1.5 times for the glucose released (2.39 g/L with grinding against 1.46 g/L without grinding), and of at least 3.5 times for the cellobiose released (1.28 g/L with grinding against 0.36 g/L without grinding). Finally, the grinding of PWB has doubled the glucose potential (glucose and cellobiose) with 3.67 g/L released, representing a cellulose conversion of 39.1% (44.58 g/kg of WB). In contrast, the grinding has not improved the amount of pentoses released (9.7 g/L with grinding against 9.9 g/L without grinding). This result could be explain by the decreasing effect of endoxylanase on arabinoxylans from the aleurone layer to the pericarp ([Benamrouche et al., 2002](#)) ^[116], thus indicating that all the arabinoxylans potentially hydrolyzable could be converted. However, a lower amount of xylobiose was observed (4.04 g/L with grinding against 4.60 g/L without grinding), which was converted into xylose (3.12 g/L with grinding against 2.70 g/L without grinding), and also a higher amount of arabinose (1.59 g/L with grinding against 1.21 g/L without grinding) with a greater A/X ratio (0.19 with grinding against 0.14 without grinding). These results could be explained by a better accessibility and consequently a best hydrolysis. All these results have demonstrated that the physical accessibility to the polysaccharides is a limiting factor in wheat bran hydrolysis, and that grinding could improve the accessible surface and conversion. This physical limitation was probably

due to the narrow pore size of the external layers (testa and pericarp) according to the results of [Beaugrand \(2005\)](#) ^[115].

3.3. *Limitation of hydrolysis by biochemical factors*

After demonstrated the physical limitation in wheat bran hydrolysis, an investigation on the biochemical factors limiting the hydrolysis was performed. The same hydrolysis experiments as previously were performed with the ground PWB and the SSF extract complemented either with an arabinofuranosidase or a commercial β -glucosidase preparation (Novozym[®] 188). In the case of an arabinofuranosidase complementation ([Table 4](#)), an increase of 24.5% was observed in the amount of arabinose released (1.98 g/L with complementation against 1.59 g/L without complementation) but only a slight increase in the total amount of xylotriose, xylobiose and xylose released (8.60 g/L with complementation against 8.31 g/L without complementation), to finally obtain a higher A/X ratio with 0.23. Moreover, no improvement was noticed in the amount of cellobiose or glucose released thus demonstrating only a low limitation due to the arabinofuranosidase. In the case of a β -glucosidase complementation, a significant decrease in the cellobiose concentration was observed (0.36 g/L with complementation against 1.28 g/L without complementation) due to this conversion into glucose, which increased of 60%. This complementation has improved the glucose potential (glucose and cellobiose) of 14.4% and allows the cellulose conversion of 44.75% (51.02 g/kg of WB). Results show also the disappearance of the xylotriose peak and an important decrease of the xylobiose concentration (0.29 g/L with complementation against 4.04 g/L without complementation), while a significant increase of the xylose concentration was observed (8.54 g/L with complementation against 3.12 g/L without complementation).

This result was probably due to the presence of a β -xylosidase in the commercial preparation used. Similarly, an important increase of the arabinose amount was observed and could also be explain by the presence of arabinofuranosidase in this commercial enzymatic complex. Finally, an unidentified peak was detected in HPLC corresponding probably to feruloylated oligosaccharides from arabinoxylans of the aleurone layer (Antoine et al., 2003) ^[59]. This peak is probably due to the lack of feruloyl esterase in the *Trichoderma reesei* enzymatic complex according to the genome sequential (Martinez et al., 2008) ^[78]. These results confirm a biochemical limitation due to the lack of enzyme (feruloyl esterase) or to low activity (β -glucosidase, β -xylosidase) in the *Trichoderma reesei* complex.

3.4. Balance sheet

These results have shown that the glucose released during the wheat bran hydrolysis has mainly three sources: residual starch from endosperm, mixed linkage β -glucans from cell wall of aleurone layer, and cellulose probably from cell wall of non-lignified cells (aleurone layer, hyaline layer and seed coat). The investigation on the recalcitrant factors in wheat bran hydrolysis has revealed at least two mains factors: a physical limitation due to the polysaccharides accessibility, most likely the polysaccharides contained in the lignified cells (pericarp), and a biochemical limitation due to the lack or low activity of enzymes in the enzymatic complex of *Trichoderma reesei* Rut-C30. Currently, the hydrolysis of a ground wheat bran with a cellulolytic and hemicellulolytic complex from *Trichoderma reesei* Rut-30, complemented with an amylolytic source and a commercial β -glucosidase preparation (Novozym[®] 188) can allow the liberation of 147 g of pentose sugars and 257.69 g of glucose from 1 kg of WB, corresponding to a conversion of 45.16% of

non-starch polysaccharides and of 57.54% of total polysaccharides from WB. Finally, further investigations should be made to understand the others recalcitrant factors in wheat bran hydrolysis, more particularly the biochemical factors, with a particular focus on the lignified cells (pericarp) and on their hemicelluloses composition (i.e. xyloglucane).

4. Conclusions

In conclusion, this study has demonstrated that the limiting factors in wheat bran hydrolysis are the physical accessibility to the polysaccharides and the lack or low activity of enzymes in the cellulolytic and hemicellulolytic complex from the mutant strain *Trichoderma reesei* Rut-C30. Further investigations should be made to understand the others recalcitrant factors with a particular focus on lignified cells and their composition.

Acknowledgement

This work was supported by Soufflet's group.

References

- Antoine, C., Peyron, S., Mabilhe, F., Lapierre, C., Bouchet, B., Abecassis, J., Rouau, X., 2003. Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* 51 (7), 2026-2033.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23 (3), 257-270.

- Barron, C., Surget, A., Rouau, X., 2007. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *J. Cereal Sci.* 45 (1), 88-96.
- Basic, A., Stone, B.A., 1981. Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 8 (5), 475-495.
- Beaugrand, J., Paës, G., Reis, D., Takahashi, M., Debeire, P., O'Donohue, M., Chabbert, B., 2005. Probing the cell wall heterogeneity of micro-dissected wheat caryopsis using both active and inactive forms of a GH11 xylanase. *Planta* 222 (2), 246-257.
- Benamrouche, S., Crônier, D., Debeire, P., Chabbert, B., 2002. A chemical and histological study on the effect of (1→4)-β-endo-xylanase treatment on wheat bran. *J. Cereal Sci.* 36 (2), 253-260.
- Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β, in: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 1. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 149-158.
- Chundawat, S.P.S., Beckham, G.T., Himmel, M.E., Dale, B.E., 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2, 121-145.
- Cosgrove, D.J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (11), 850-861.
- Evers, T., Millar, S., 2002. Cereal grain structure and development: some implications for quality. *J. Cereal Sci.* 36 (3), 261-284.
- FAOSTAT (2012). FAOSTAT Agriculture Data, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (accessed December).
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59 (2), 257-268.

- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315 (5813), 804-807.
- Kabel, M.A., van der Maarel, M.J.E.C., Klip, G., Voragen, A.G.J., Schols, H.A., 2006. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnol. Bioeng.* 93 (1), 56-63).
- Maes, C., Delcour, J.A., 2001. Alkaline hydrogen peroxide extraction of wheat bran non-starch polysaccharides. *J. Cereal Sci.* 34 (1), 29-35.
- Martinez et al., 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* 26 (5), 553-560.
- Mandels, M., Weber, J., 1969. The production of cellulases, in: Gould, R.F. (Ed.), *Cellulases and Their Applications. Advances in Chemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, vol. 95, pp. 391-414.
- Norkrans, B., 1957. Studies of β -glucoside- and cellulose splitting enzymes from *Polyporus annosus* Fr. *Physiol. Plant.* 10 (1), 198-214.
- Octave, S., Thomas, D., 2009. Biorefinery: towards an industrial metabolism. *Biochim.* 91 (6), 659-664.
- Parker, M.L., Ng, A., Waldron, K.W., 2005. The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *J. Sci. Food Agric.* 85 (15), 2539-2547.
- Percival Zhang, Y.-H., 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (5), 367-375.

Rouau, X., Ghizzy, G., Hemery, Y., Barron, C., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J., 2008. Dry refinery of plant material for green chemistry. Biopolymers, Biomaterials, Green chemistry workshop, december 4-5th, La Baule (France).

Table 1

Composition of different layers in mature wheat bran. Adapted from [Parker et al. \(2005\)](#) ^[35] and from [Barron et al. \(2007\)](#) ^[34].

Figure 1

Experimental procedure used to successive processing of wheat bran.

Table 2

Carbohydrate content after 72 h of enzymatic hydrolysis of the pretreated wheat bran without grinding and complementation.

Table 3

Carbohydrate content after 72 h of enzymatic hydrolysis of the pretreated wheat bran with grinding and without complementation.

Table 4

Carbohydrate content after 72 h of enzymatic hydrolysis of the pretreated wheat bran with grinding and complementation.

Table 1

	Approximate yield (% dry weight)	A/X ratio	AX (g/100 g)*	Glucose (g/100 g)*
Aleurone layer	61.8	0.35	24.4	11.8
Hyaline layer	4.9	0.13	60.0	4.4
Seed coat		0.13		
Inner pericarp	6.2	1.1	38.9	15.7
Outer pericarp	27.1	1.1	47.0	25.9

AX: sum of arabinose and xylose; A/X: arabinose/xylose ratio

* In g/100 g of tissue.

Figure 1

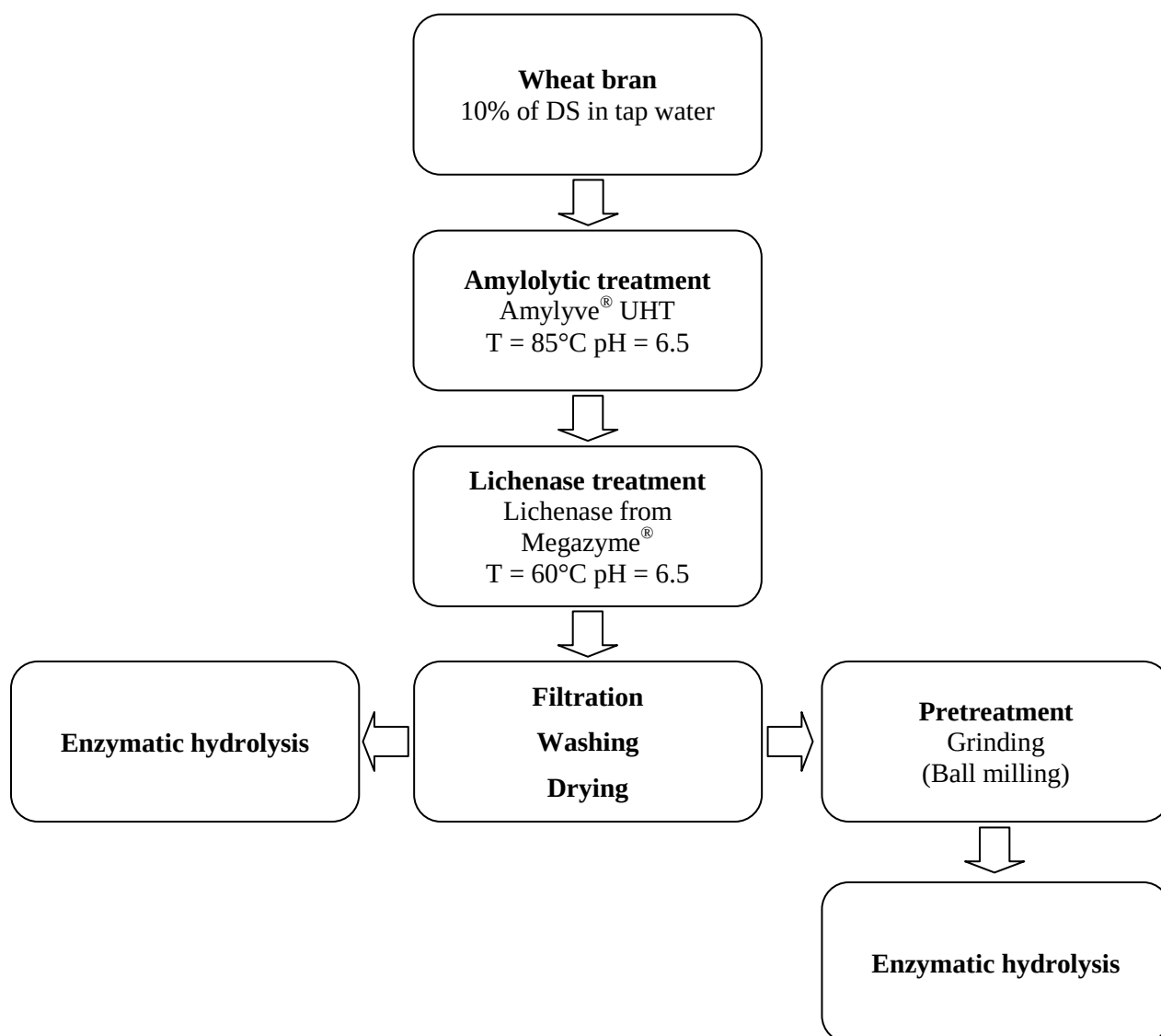


Table 2

	Without grinding			
	Control	Lyvanol® GA	Lichenase	SSF extract
Glucose (g/L)	0.08	0.22	0.08	1.46
Cellobiose (g/L)	ND	ND	ND	0.36
Xylotriose (g/L)	ND	ND	ND	1.19
Xylobiose (g/L)	ND	ND	ND	4.60
Xylose (g/L)	ND	ND	ND	2.70
Arabinose (g/L)	0.19	0.22	0.09	1.21
Potential of glucose ¹	0.08	0.22	0.08	1.82
Potential of pentoses (A + X) ²	0.19	0.22	0.09	9.70
A/X ratio ³	NC	NC	NC	0.14

ND: not detected; NC: not calculated.

¹: calculated from the sum of cellobiose and glucose content in the hydrolyzates.

²: calculated from the sum of arabinose, xylotriose, xylobiose and xylose content in the hydrolyzates.

³: calculated from the arabinose content and the sum of xylose, xylobiose and xylotriose content in the hydrolyzates.

Table 3

	With grinding			
	Control	Lyvanol® GA	Lichenase	SSF extract
Glucose (g/L)	0.07	0.45	0.10	2.39
Cellobiose (g/L)	ND	0.22	ND	1.28
Xylotriose (g/L)	ND	ND	ND	1.15
Xylobiose (g/L)	ND	ND	ND	4.04
Xylose (g/L)	ND	ND	ND	3.12
Arabinose (g/L)	0.52	0.58	0.32	1.59
Potential of glucose ¹	0.07	0.67	0.10	3.67
Potential of pentoses (A + X) ²	0.52	0.58	0.32	9.90
A/X ratio ³	NC	NC	NC	0.19

ND: not detected; NC: not calculated.

¹: calculated from the sum of cellobiose and glucose content in the hydrolyzates.

²: calculated from the sum of arabinose, xylotriose, xylobiose and xylose content in the hydrolyzates.

³: calculated from the arabinose content and the sum of xylose, xylobiose and xylotriose content in the hydrolyzates.

Table 4

	With grinding and complementation			
	Control	SSF extract	SSF extract + AraF	SSF extract + Novozym [®] 188
Glucose (g/L)	0.07	2.39	2.35	3.84
Cellobiose (g/L)	ND	1.28	1.22	0.36
Xylotriose (g/L)	ND	1.15	1.31	ND
Xylobiose (g/L)	ND	4.04	4.33	0.29
Xylose (g/L)	ND	3.12	2.96	8.54
Arabinose (g/L)	0.52	1.59	1.98	2.06
Potential of glucose ¹	0.07	3.67	3.57	4.20
Potential of pentoses (A + X) ²	0.52	9.90	10.58	10.89
A/X ratio ³	NC	0.19	0.23	0.23

ND: not detected; NC: not calculated; AraF: arabinofuranosidase.

¹: calculated from the sum of cellobiose and glucose content in the hydrolyzates.

²: calculated from the sum of arabinose, xylotriose, xylobiose and xylose content in the hydrolyzates.

³: calculated from the arabinose content and the sum of xylose, xylobiose and xylotriose content in the hydrolyzates.

CHAPITRE III

Etude pratique d'un concept innovant de procédé favorisant la conversion des polysaccharides du son de blé

RESUME

Dans la partie précédente, une étude de la conversion du son de blé, et plus particulièrement des facteurs de la récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique de cette biomasse lignocellulosique, a permis de démontrer une limitation physique liée à l'accessibilité des biocatalyseurs aux polysaccharides. Les résultats obtenus ont également permis de montrer que les couches cellulaires non lignifiées seraient préférentiellement attaquées, tandis que les cellules lignifiées du péricarpe seraient peu ou pas attaquées. Hors, les cellules lignifiées comportent une proportion significative de cellulose et d'arabinoxylanes, laissant par conséquent une forte quantité de polysaccharides non disponibles. Dans la seconde partie de ces travaux, nous avons également pu observer qu'un broyage du son de blé permettait d'améliorer l'accessibilité aux polysaccharides, en particulier à la cellulose. Cependant, la taille des particules atteintes lors de ces travaux n'a pas permis de garantir l'éclatement de toutes les cellules (dont celles du péricarpe, ce qui permettrait un accès des biocatalyseurs à des portions de la cellule plus faiblement lignifiées). Un broyage plus poussée permettrait donc de garantir cet éclatement. Néanmoins, le principal problème rencontré lors d'un fractionnement par voie humide d'une matière première végétale réside dans la forte prise de viscosité du substrat limitant la taille de particules atteignable et provoquant une consommation énergétique excessive (agitation, pompage).

Aussi, la troisième et dernière partie de ces travaux de recherche a eu pour objectif l'étude pratique d'un concept innovant de procédé permettant théoriquement de lever la limitation physique au transfert de masse et les principales contraintes (viscosité, consommation énergétique) rencontrées lors de la conversion de cette matière première. Les trois phases de ce procédé ont ainsi été mise en œuvre :

- Phase 1 : pré-hydrolyse des composés accessibles et facilement hydrolysables (arabinoxylanes, amidon) ;
- Phase 2 : broyage ultrafin des particules résiduelles, notamment des cellules lignifiées (péricarpe) ;
- Phase 3 : hydrolyse avec un complexe cellulolytique et hémicellulolytique (*Trichoderma reesei* Rut-C30) et fermentation.

Les résultats obtenus ont permis de lever la barrière physique au transfert de masse tout en limitant la prise de viscosité et par conséquent la consommation énergétique, mais également d'atteindre une taille de particules plus fine permettant de valider ce concept.

Etude pratique d'un concept innovant de procédé favorisant la conversion des polysaccharides du son de blé

1. Introduction

Lors de précédents travaux (présentés dans le chapitre II), nous avons pu mettre en évidence une partie des facteurs de la récalcitrance à l'hydrolyse du son de blé, dont une limitation physique liée à l'accessibilité des biocatalyseurs aux polysaccharides. Ce phénomène de barrière physique au transfert de masse serait vraisemblablement dû à la taille des pores, se rétrécissant de l'intérieur vers l'extérieur du son de blé, et au caractère propre de la lignine. En outre, le ratio arabinose/xylose (caractéristique des arabinoxylanes des différentes parois cellulaires) obtenu laisse à penser que les couches cellulaires internes non lignifiées (couche à aleurone, bande hyaline, testa) seraient préférentiellement attaquées, tandis que les cellules lignifiées du péricarpe ne seraient pas ou peu hydrolysées. Hors, ces cellules comportent une proportion importante de cellulose et d'arabinoxylanes, laissant par conséquent une forte quantité de polysaccharides non disponibles.

Les travaux de recherche réalisés précédemment ont également pu démontrer qu'un broyage permettait d'améliorer l'accessibilité aux polysaccharides, en particulier à la cellulose. Cependant, selon les analyses granulométriques effectués, une taille de particules de seulement 115 μm pour le d50 et de 328 μm pour le d_{90} a été atteinte. Hors, selon les données de la littérature scientifique (tableau n°1), cette taille ne permet pas de garantir un éclatement de toutes les cellules (ce qui permettrait un accès des biocatalyseurs à des portions de la cellule plus faiblement lignifiées comme illustrer sur la figure n°5, page 40 de ce manuscrit). Un broyage plus poussée permettrait donc de garantir cet éclatement. Cependant, on peut observer une forte prise de viscosité lors du fractionnement par voie humide d'une matière première végétale, limitant la taille de particules atteignable et provoquant une consommation énergétique excessive (agitation, pompage).

Tableau n°1 : Taille et épaisseur des cellules et couches cellulaires constituant le son de blé

[26]

	Couche à aleurone	Bande hyaline	Testa	Péricarpe interne	Péricarpe externe
Taille des cellules (μm)	37-65 25-75	125-210 25-30	100-150 9-20	100-250 12-20	125-210 25-30
Epaisseur de la couche (μm)	40-65	12-20	5-8	5-15	15-30

L'objectif de ces investigations a donc été de démontrer la validité d'un concept innovant de procédé permettant théoriquement de lever la limitation physique au transfert de masse et les principales contraintes (viscosité, consommation énergétique) rencontrées lors de la conversion des différents polysaccharides contenu dans le son de blé en sucres fermentescibles puis en bioproduits. Ce concept repose principalement sur trois phases (figure n°1) :

- Phase 1 : pré-hydrolyse des composés accessibles et facilement hydrolysables (arabinoxylanes, amidon) ;
- Phase 2 : broyage ultrafin des particules résiduelles, notamment des cellules lignifiées (péricarpe) ;
- Phase 3 : hydrolyse et fermentation.

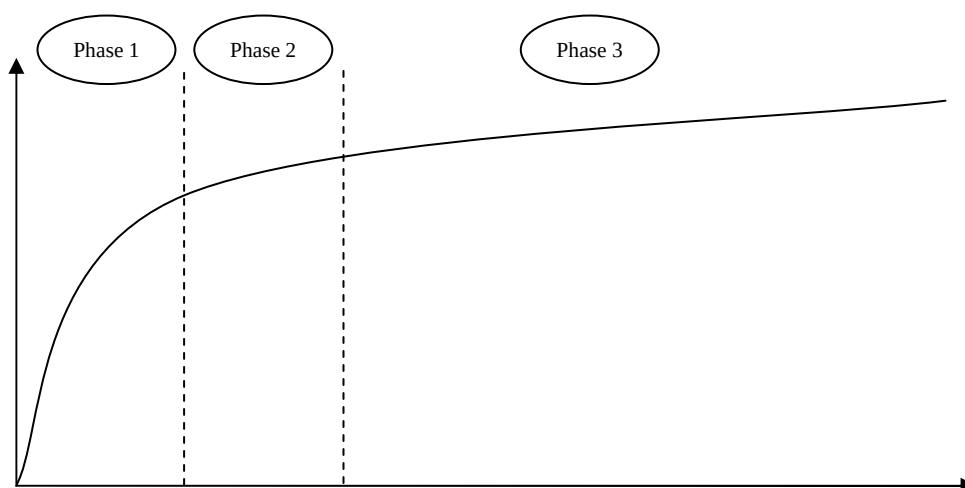


Figure n°1 : Illustration d'une cinétique d'hydrolyse selon le concept de procédé établi.

2. Matériel et méthodes

Le substrat, les produits chimiques, les méthodes analytiques et les complexes enzymatiques (commerciaux ou de laboratoire) utilisés lors de ces travaux étaient les mêmes que ceux décrits précédemment.

2.1. *Le broyage*

Le son de blé utilisé lors de la phase 1 de ce procédé a subi un pré-broyage à l'aide d'un broyeur à marteau (VEM motors, Allemagne), équipé d'une grille de 500 μm . Le son de blé en suspension récupéré après la phase d'hydrolyse (phase 1) de ce procédé a été réparti en deux lots, dont un a été broyé à l'aide d'un broyeur à billes de laboratoire type MiniFer (Netzsch[®], Selb, Allemagne), équipé d'un tamis de 0,8 mm et chargé avec 518 g de billes de 2,0-2,2 mm. Le broyage a été réalisé à 50°C et à une agitation de 3000 tr/min pendant 1 h.

2.2. *L'hydrolyse enzymatique et la fermentation éthanolique*

L'hydrolyse enzymatique de la phase 1 de ce procédé a été réalisée pendant 8 heures avec du Lyvanol[®] devisco 1500 (un complexe hémicellulolytique), introduit à 100 U xylanase/g de son de blé, et du Lyvanol[®] GA (une glucoamylase), introduite à 50 U amylolytique/g de son de blé. La réaction enzymatique s'est déroulée à 50°C dans du tampon citrate (50 mM, pH = 4,8). Le milieu réactionnel (préalablement stérilisé à 121°C pendant 30 minutes) comportait du son de blé à 10% de matière sèche (MS) pour un volume final de 2 L et a été agité à 120 rpm.

A la fin de la première phase de ce procédé, le son de blé en suspension a été réparti en deux lots, l'un maintenu à 50°C sous agitation, l'autre broyé à 50°C. Cette étape consistant en la phase 2 de ce procédé.

Les deux lots de son de blé ont enfin été réparti chacun en quatre lots (100 mL à 5% de MS/flacon de 500 mL) : un lot témoin, un lot additionné uniquement de levure, un lot additionné uniquement d'enzymes et un lot additionné d'enzymes et de levure. Cette étape, consistant en la phase 3 de ce procédé, s'est déroulée à 32°C sous agitation (100 rpm). Le complexe enzymatique ajouté (désigné sous le terme enzyme ci-après) a été produit par FMS (comme expliqué précédemment) et a été introduit à 0,5 activité cellulase/g de son de blé. La levure utilisée était l'Ethanol Red[®] (Lesaffre[®], France) et a introduite à 10^7 levures/mL, complété d'un apport d'azote (urée à 500 ppm). Les flacons ne contenant pas de levure ont été

additionnés d'azoture de sodium avec une concentration finale à 0,2 g/L. Enfin, chaque essai a été dupliqué.

2.3. Les analyses granulométriques

Les analyses granulométriques ont été réalisées sur une plage de mesure allant de 0,02 μm à 2000 μm à l'aide d'un Mastersizer[®] 2000 (Malvern Instruments[®], Royaume-Uni). La distribution granulométrique a été caractérisée par le diamètre médian (d50) de la courbe de distribution cumulée en volume et par le *span* correspondant au rapport entre la dispersion et le diamètre médian ($d_{90}-d_{10}/d_{50}$) où les valeurs du d10, d50 et d90 représentent les 10%, 50% et 90% de la courbe cumulée en volume total.

3. Résultats

La première phase de ce procédé a donc consisté à réaliser une pré-hydrolyse des composés accessibles et facilement hydrolysables (arabinoxylanes et amidon) grâce à l'introduction d'une glucoamylase (Lyvanol[®] GA) et d'un complexe hémicellulolytique (Lyvanol[®] devisco 1500). Lors de cette phase, une libération importante de sucres réducteurs a pu être mesurée, suivi d'un début de ralentissement dans l'allure de cette courbe (données non présentées). Après 8 heures d'hydrolyse, le son de blé a été réparti en deux lots : un lot témoin non broyé et un lot destiné à subir un broyage ultrafin (phase 2 de ce procédé). Au cours de ce fractionnement, le milieu réactionnel n'a pas ou peu pris en viscosité (observation visuelle), confirmant l'efficacité de la première phase de ce procédé dans la limitation théorique de la consommation d'énergie. En outre, l'analyse granulométrique réalisée sur un échantillon prélevé à la fin de cette phase de broyage montre clairement une forte diminution de la taille des particules, avec un d50 de 12,53 μm et un d90 de 42,81 μm , par rapport à la taille des particules initiales (d50 de 238,14 μm et d90 de 601,64 μm), mais également une distribution plus homogène avec un *span* de 3,054 contre un *span* de 2,389 initialement. Enfin, la comparaison de la taille des particules obtenue lors de ces travaux avec celle obtenue lors de nos précédemment travaux (d50 de 115,45 μm et d90 de 327,90 μm) démontre bien la meilleure efficacité du broyage et permet de confirmer, d'après les données de la littérature scientifique (tableau n°1), l'éclatement de toutes les cellules du son de blé (y compris les cellules lignifiées du péricarpe), validant ainsi la phase 2 de ce procédé.

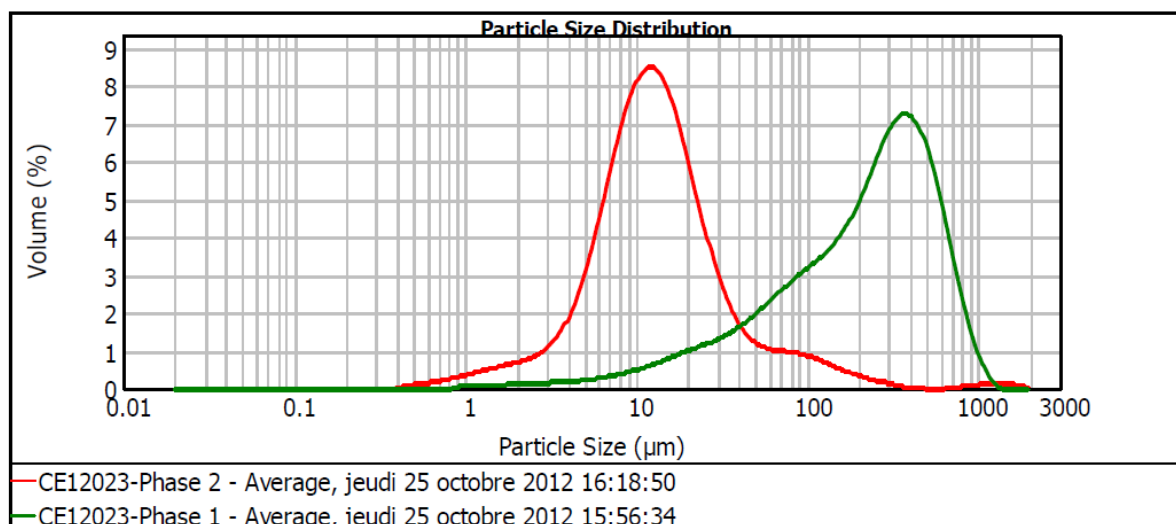


Figure n°2 : Distribution de la taille des particules au début de la phase 1 et à la fin de la phase 2 de ce procédé.

La troisième et dernière phase de ce procédé a consisté à réaliser différents essais d'hydrolyse et/ou de fermentation éthanolique afin de déterminer les éventuelles améliorations obtenues grâce à ce procédé. Les résultats obtenus après 6 heures d'hydrolyse et/ou de fermentation éthanolique (et l'atteinte d'un plateau de production d'éthanol) sont présentées dans le tableau n°2.

Tableau n°2 : Profil chromatographique obtenu par C.L.H.P. des différents essais après 6 heures d'hydrolyse et/ou de fermentation.

	Son de blé non broyé				
	T0	Témoin (T6)	Enzyme (T6)	Levure (T6)	Enzyme et levure (T6)
Cellobiose (g/L)	1,16 ± 0,01	1,37 ± 0,02	1,88 ± 0,01	1,67 ± 0,01	1,99 ± 0,03
Glucose (g/L)	9,96 ± 0,02	9,75 ± 0,03	9,84 ± 0,00	0,53 ± 0,01	0,74 ± 0,04
Xylobiose (g/L)	1,79 ± 0,30	1,64 ± 0,01	2,15 ± 0,36	1,03 ± 0,00	1,84 ± 0,02
Xylose (g/L)	2,07 ± 0,02	2,37 ± 0,04	3,06 ± 0,01	1,92 ± 0,01	2,65 ± 0,04
Arabinose (g/L)	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,67 ± 0,01
Ethanol (g/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,50 ± 0,02	4,52 ± 0,07
Total source de glucose (g/L)	11,12 ± 0,03	11,12 ± 0,05	11,72 ± 0,01	2,20 ± 0,02	2,73 ± 0,07
Total source de pentoses (g/L)	4,02 ± 0,34	4,16 ± 0,06	5,85 ± 0,38	3,10 ± 0,01	5,16 ± 0,07

	Son de blé broyé				
	T0	Témoin (T6)	Enzyme (T6)	Levure (T6)	Enzyme et levure (T6)
Cellobiose (g/L)	1,16 ± 0,01	1,41 ± 0,02	1,83 ± 0,02	1,63 ± 0,01	1,95 ± 0,00
Glucose (g/L)	9,96 ± 0,02	9,62 ± 0,03	9,78 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,61 ± 0,01
Xylobiose (g/L)	1,79 ± 0,30	1,96 ± 0,01	2,70 ± 0,00	1,86 ± 0,01	2,68 ± 0,00
Xylose (g/L)	2,07 ± 0,02	2,13 ± 0,03	2,74 ± 0,00	1,61 ± 0,00	2,27 ± 0,01
Arabinose (g/L)	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,61 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,61 ± 0,01
Ethanol (g/L)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	4,39 ± 0,01	4,38 ± 0,02
Total source de glucose (g/L)	11,12 ± 0,03	11,03 ± 0,05	11,61 ± 0,05	2,10 ± 0,02	2,56 ± 0,01
Total source de pentoses (g/L)	4,02 ± 0,34	4,23 ± 0,05	6,05 ± 0,00	3,57 ± 0,01	5,56 ± 0,02

Malgré l'efficacité des deux premières phases de ce procédé et l'éclatement des cellules du son de blé, nous n'observons pas d'amélioration dans la conversion des différents polysaccharides du son de blé, puisqu'il n'y a pas de différence dans la quantité de sucres libérés ou la quantité d'éthanol produite entre le son de blé broyé et non broyé. Au vu de nos précédents travaux, ces résultats laissent à penser à une limitation de la conversion due à l'absence de complémentation en β -glucosidase ou à une faible amélioration non décelable à l'échelle du laboratoire. La possibilité d'une limitation biochimique liée à la nature des composants des parois cellulaires lignifiées pourrait également être avancée.

4. Conclusion

L'étude pratique de ce concept innovant de procédé a permis de lever la barrière physique au transfert de masse tout en limitant la prise de viscosité et par conséquent la consommation énergétique. Bien que ce concept de procédé ait pu être validé, aucune amélioration dans la conversion des polysaccharides contenus dans le son de blé n'a pu être observée, confirmant ainsi l'autre facteur de la récalcitrance à l'hydrolyse : une limitation biochimique liée à l'absence de certaines enzymes dans le cocktail enzymatique de la souche mutée *Trichoderma reesei* Rut-C30. De nouvelles recherches devront donc être entreprises en se focalisant sur la sélection d'une souche plus appropriée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux de recherche était de développer des biocatalyseurs lignocellulolytiques par fermentation en milieu solide, puis de les comparer à ceux produits par fermentation en milieu submergé, tout en cherchant à convertir le son de blé en sucres fermentescibles afin d'envisager une autre valorisation de cette matière première qu'en alimentation animale. Pour cela, une comparaison en application a tout d'abord été effectuée. Cette comparaison a permis de démontrer le potentiel technologique de la fermentation en milieu solide puisqu'une meilleure efficacité des biocatalyseurs produits par fermentation en milieu solide a pu être observée lors de l'hydrolyse de cellulose, probablement due à une quantité plus importante ou à une meilleure efficacité des cellobiohydrolases et/ou à la présence de protéines auxiliaires, et lors de l'hydrolyse de son de blé, probablement liée à la présence d'activités secondaires. Cette meilleure efficacité d'hydrolyse sur substrat solide des complexes enzymatiques produits par fermentation en milieu solide permet d'envisager une diminution de la quantité d'enzymes nécessaire à la conversion des biomasses lignocellulosiques. Dans la deuxième partie de ces travaux, une étude des facteurs de la récalcitrance à l'hydrolyse enzymatique du son de blé a permis de déterminer les principaux verrous limitant la conversion des polysaccharides en sucres fermentescibles. Une limitation physique au transfert de masse liée à l'accessibilité des biocatalyseurs aux polysaccharides et une limitation biochimique liée à l'absence de certaines enzymes (féruloyl estérase,...) dans le complexe enzymatique de la souche mutée *Trichoderma reesei* Rut-C30 a ainsi pu être démontrée. Cette partie des travaux a également permis de déterminer qu'une conversion d'environ 94,3% de l'amidon, de 44,75% de la cellulose et de 46,44% de l'hémicellulose (arabinoxylanes et β -glucanes à liaisons mixtes), soit un total de 45,16% des polysaccharides hors amidon, était actuellement envisageable. Enfin, dans la troisième et dernière partie de ces travaux, le développement d'un concept innovant de procédé permettant de lever la barrière physique au transfert de masse tout en limitant la consommation énergétique a été réalisé. Bien que ce concept ait pu être validé, aucune amélioration n'a cependant pu être relevée, probablement due à une limitation biochimique liée à l'absence de certaines enzymes dans le complexe enzymatique de la souche mutée *Trichoderma reesei* Rut-C30.

L'ensemble de ces travaux a clairement permis de démontrer que la fermentation en milieu solide est une technologie prometteuse. Bien qu'une limitation biochimique ait pu être rencontrée, due au caractère de la souche utilisée dans ces travaux, des perspectives très intéressantes concernant la valorisation du son de blé sont envisageables. Afin de finaliser ces recherches et atteindre complètement les objectifs fixés, d'autres travaux devront être entrepris en se focalisant particulièrement sur :

1) La sélection d'une souche sauvage disposant d'un profil enzymatique plus équilibré (ce qui est généralement le cas) et présentant une meilleure capacité de culture par fermentation en milieu solide.

2) L'étude et la compréhension des facteurs biochimiques limitant encore l'hydrolyse enzymatique, notamment en mettant l'accent sur les cellules lignifiées et leur composition.

Avec les travaux menés actuellement par le groupe Soufflet, la fermentation en milieu solide peut devenir un procédé maîtrisé, occupant désormais des marchés de masse et pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'essor des bioraffineries.

GLOSSAIRE

Biomasse

La biomasse est la « *fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture (y compris les substances végétales et animales), de la sylviculture et de ses industries connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et municipaux* » ^[117].

Bioproduit

Les bioproduits sont des « *produits énergétiques et industriels issus du végétal hors des domaines de l'alimentaire et de la santé et dont les applications portent sur l'énergie, la chimie organique et les biomatériaux, fabriqué directement ou indirectement à partir de biomasse. Il peut s'agir de produits nouveaux ou novateurs ou de produits traditionnels* » ^[118].

Bioraffinerie

Les bioraffineries sont définies comme étant des : « *industries bio-intégrées produisant à partir de la biomasse végétale via différentes technologies (enzymatiques, thermochimiques...) à la fois des produits chimiques, de l'énergie, des agromatériaux (y compris des fibres végétales) et des aliments et ingrédients à destination de l'alimentation humaine et animale* ». Le consortium *Biorefinery Euroview* a sélectionné quatre concepts de bioraffineries représentant l'existant européen et reposant sur la nature des ressources végétales utilisées plutôt que sur le procédé de traitement de la matière première :

- *green biorefinery* / bioraffinerie verte : industries travaillant selon les cycles saisonniers pour la transformation de la biomasse humide, c'est-à-dire à partir de ressources périssables nécessitant un traitement rapide, comme les pommes de terre et les betteraves sucrières ;
- *cereal biorefinery* / bioraffinerie céréalière : industries transformant des céréales sèches sous formes de graines pour produire principalement de l'amidon et des dérivés énergétiques. Les espèces végétales cibles majeures sont le maïs, le blé, et le riz ;
- *oilseed biorefinery* / bioraffinerie oléagineuse : industries transformant des graines de type oléagineuses (colza, tournesol, olive, soja,...) afin de produire principalement des aliments et ingrédients à destination de l'alimentation humaine et animale, et du biodiesel ;

- *forest based and lignocellulosic biorefinery* / bioraffinerie de la forêt et des produits lignocellulosiques : industries transformant les ressources issues de la forêt (bois) et toute biomasse lignocellulosique pour produire principalement des fibres de cellulose, des produits chimiques, de la lignine et de l'énergie ^[119].

Une bioraffinerie peut également être définie comme « *un ensemble industriel, localisé sur un même site, qui transforme la biomasse agricole et forestière en une diversité de produits biosourcés (alimentation humaine et animale, produits chimiques, biomolécules, agro-matériaux) et de bioénergie (biocarburants, électricité, chaleur) dans le cadre d'une stratégie de développement durable. C'est donc à la fois la transformation de la plante dans sa totalité en valorisant tous ses constituants et l'intégration des composantes d'un site industriel pour réaliser un véritable « Métabolisme Industriel* » » ^[20].

Biotechnologie

La biotechnologie est « *l'application de la science et de la technologie à des organismes vivants, de même qu'à ses composantes, produits et modélisations, pour modifier des matériaux vivants ou non-vivants aux fins de la production de connaissances, de biens et de services* » ^[120].

Consommation totale d'énergie finale

La consommation totale d'énergie finale est « la somme des consommations des différents secteurs d'utilisation finale » ^[121].

Consommation intérieure brute

La consommation intérieure brute correspond à la demande totale d'énergie d'un pays ou d'une région. Elle représente la quantité d'énergie nécessaire pour satisfaire à la demande intérieure de l'entité géographique considérée ^[122].

Développement durable

Le développement durable est « *un développement qui répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures de répondre aux leurs. Deux concepts sont inhérents à cette notion :*

- *le concept de « besoins », et plus particulièrement des besoins essentiels des plus démunis, à qui il convient d'accorder la plus grande priorité, et*

- *l'idée des limitations que l'état de nos techniques et de notre organisation sociale impose sur la capacité de l'environnement à répondre aux besoins actuels et à venir »* ^[123].

Energie renouvelable

Source d'énergie inépuisable ou se renouvelant assez rapidement pour être considérée comme inépuisable à l'échelle du temps géologique. Il existe cinq sources principales d'énergies dites renouvelables : le vent (éoliennes), l'eau (barrages hydroélectriques, énergie marémotrice), le soleil (panneaux photovoltaïques ou thermiques), [la biomasse] (bois, biocarburants) et la chaleur du sol (géothermie) ^[124].

Energie primaire

L'énergie primaire est l'ensemble des produits énergétiques non transformés, exploités directement ou importés. Ce sont principalement le pétrole brut, les schistes bitumineux, le gaz naturel, les combustibles minéraux solides, la biomasse, le rayonnement solaire, l'énergie hydraulique, l'énergie du vent, la géothermie et l'énergie tirée de la fission de l'uranium ^[125].

Forçage radiatif

Le forçage radiatif est la « *variation de l'éclairement énergétique net (différence entre l'éclairement descendant et l'éclairement ascendant, exprimée en Wm^{-2}) à la tropopause due à une modification d'un agent externe du changement climatique, comme par exemple une modification de la concentration de dioxyde de carbone ou du rayonnement solaire* » ^[14].

Niveau de vie

Le niveau de vie est égal au revenu disponible du ménage divisé par le nombre d'unités de consommation (uc). Le niveau de vie est donc le même pour tous les individus d'un même ménage. Les unités de consommation sont généralement calculées selon l'échelle d'équivalence dite de l'OCDE modifiée qui attribue 1 uc au premier adulte du ménage, 0,5 uc aux autres personnes de 14 ans ou plus et 0,3 uc aux enfants de moins de 14 ans ^[125].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (OECD/IEA). *Key World Energy Statistics 2012* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf>
- [2] LAURENT, Eric. *La face cachée du pétrole*. Paris (France) : Plon, 2006. 411 p. ISBN : 978-2259203234.
- [3] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (OECD/IEA). *World Energy Outlook 2012. Presentation to the press* [en ligne]. 12 novembre 2012, Londres. Disponible à l'adresse : <http://www.worldenergyoutlook.org/media/weowebiste/2012/PresentationtoPress.pdf>
- [4] THE ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PEAK OIL AND GAS (ASPO). *Newletter 2004* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.peakoil.net/>
- [5] LOPES FERREIRA, Nicolas. Valorisation des ressources renouvelables : de la production d'éthanol au développement de nouveaux bioproduits. *Journal de la Société de Biologie* [en ligne], novembre 2008, vol. 202, n°3, p. 191-199. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1051/jbio:2008021>
- [6] EUROSTAT. Données de 2009 [en ligne]. [Consulté le 28 novembre 2012]. Disponible à l'adresse : <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>
- [7] DEMMOU, Lilas. La désindustrialisation en France. *Les Cahiers « Documents de travail de la DG Trésor »* [en ligne], juin 2010, n°2010/01. Disponible à l'adresse : <https://www.tresor.economie.gouv.fr/file/326045>
- [8] LATIEULE Sylvie. Editorial. *Formule verte. Le magazine des matières premières et des ingrédients renouvelables*, octobre 2010, n°3.
- [9] COMMISSION EUROPEENNE. *Communication de la Commission « Europe 2020. Une stratégie pour une croissance intelligente, durable et inclusive »* (COM(2010)2020) [en ligne]. Bruxelles, le 3 mars 2010. Disponible à l'adresse : http://ec.europa.eu/archives/growthandjobs_2009/pdf/complet_fr.pdf

[10] PARLEMENT EUROPEEN. *Rapport sur l'avenir de la politique agricole commune après 2013* (2009/2236/(INI)) [en ligne]. Commission de l'agriculture et du développement rural, rapporteur : George Lyon, juin 2010. Disponible à l'adresse :

<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//NONSGML+REPORT+A7-2010-0204+0+DOC+PDF+V0//FR>

[11] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *How to Feed the World in 2050* [en ligne]. Octobre 2009. Disponible à l'adresse :

[http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How to Feed the World in 2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)

[12] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Global food losses and food waste. Extent causes and prevention* [en ligne]. Rome, 2011. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>

[13] LE MONDE. *La FAO réclame une suspension de la production de bioéthanol de maïs aux Etats-Unis* [en ligne]. 10 août 2012. Disponible à l'adresse :

http://www.lemonde.fr/planete/article/2012/08/10/la-fao-reclame-une-suspension-de-la-production-de-bioethanol-de-mais-aux-etats-unis_1744806_3244.html

[14] GROUPE D'EXPERTS INTERGOUVERNEMENTAL SUR L'EVOLUTION DU CLIMAT (GIEC). *Bilan 2007 des changements climatiques : Rapport de synthèse* [en ligne]. Genève (Suisse) : Groupe d'experts intergouvernemental sur le climat, 2008. 114 p. ISBN : 92-9169-222-0. Disponible à l'adresse :

http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_fr.pdf

[15] ORGANISATION METEOROLOGIQUE MONDIALE (OMM). *Bulletin de l'OMM sur les gaz à effet de serre* [en ligne]. 19 novembre 2012, n°8. Disponible à l'adresse :

http://www.wmo.int/pages/prog/arep/gaw/ghg/documents/GHG_Bulletin_No.8_fr.pdf

[16] RIFKIN, Jeremy. *La troisième révolution industrielle : comment le pouvoir latéral va transformer l'énergie, l'économie et le monde*. Paris (France) : Les Liens qui Libèrent, 2012. 380 p. ISBN : 978-2918597476.

- [17] OCTAVE, Stéphane, THOMAS, Daniel. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie* [en ligne], juin 2009, vol. 91, n°6, p. 659-664. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.015>
- [18] AGRO-INDUSTRIE RECHERCHES ET DEVELOPPEMENT (ARD). *Le complexe Agro-industriel des Sohettes* [en ligne]. 2013. Disponible à l'adresse : http://www.a-r-d.fr/w_docs/plaquette_complexe-agro-industriel-des-sohettes.pdf
- [19] KNAUF, Michael, MONIRUZZAMAN, Mohammed. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal*, 2004, vol. 106, n°1263, p. 147-150.
- [20] LES ENTRETIENS IAR. *Les alternatives végétales aux ressources fossiles. Concept et enjeu territorial* [en ligne]. Laon (France) : Pôle de compétitivité IAR, septembre 2012. 62 p. ISBN : 978-2-9542799-0-9. Disponible à l'adresse : <http://www.iar-pole.com/wp-content/uploads/downloads/2012/10/LivreEntretiensFR.pdf>
- [21] XIMENES, Edivaldo. *The role of hydrolases on degradation of plant material* [en ligne] : I Symposium on Cellulosic Ethanol, 9-10 septembre 2008, São Paulo (Brésil), FAPESP. Disponible à l'adresse : <http://www.fapesp.br/pdf/4491/14-00-Edivaldo-Palestra-Hidrolases.pdf>
- [22] SUN, Ye, CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* [en ligne], mai 2002, vol. 83, n°1, p. 1-11. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- [23] DIDDEREN, Isabelle, DESTAIN, Jacqueline, THONART, Philippe. *Le bioéthanol de seconde génération : la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Gembloux (Belgique) : Les Presses agronomiques de Gembloux, 2008. 128 p. ISBN : 978-2870160855.
- [24] INTERNATIONAL GRAINS COUNCIL (IGC). *Grain Market Report* [en ligne]. 28 septembre 2012, n°426. Disponible à l'adresse : <http://www.igc.int/en/default.aspx>

[25] FAOSTAT. Données de 2010 [en ligne]. [Consulté le 30 novembre 2012]. Disponible à l'adresse : <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>

[26] SURGET, Anne, BARRON, Cécile. Histologie du grain de blé. *Industries des Céréales* [en ligne], novembre-décembre 2005, n°145, p. 3-7. Disponible à l'adresse : <http://www.industriesdescereales.com/Images/Produits/548E2BE8-6F6B-447B-8E94-4C8E59097B35.PDF>

[27] HEMERY, Youna, ROUAU, Xavier, LULLIEN-PELLERIN, Valérie, BARRON, Cécile, ABECASSIS, Joël. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science* [en ligne], novembre 2007, vol. 46, n°3, p. 327-347. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2007.09.008>

[28] STONE, Bruce. *Cell walls of cereal grains* [en ligne] : 55th Australian Cereal Chemistry Conference and AACCI Pacific Rim Symposium, 3-7 juillet 2005, Sydney (Australie). Disponible à l'adresse : <http://www.regional.org.au/au/cereals/2/12stone.htm>

[29] KABEL, Mirjam A., VAN DER MAAREL, Marc J.E.C., KLIP, Gert, VORAGEN, Alphons G.J., SCHOLS, Henk A.. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering* [en ligne], janvier 2006, vol. 93, n°1, p. 56-63. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20685>

[30] MAES, C., DELCOUR, J.A.. Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran Non-starch Polysaccharides. *Journal of Cereal Science* [en ligne], juillet 2001, vol. 34, n°1, p. 29-35. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2001.0377>

[31] HEMERY, Youna, ROUAU, Xavier, DRAGAN, Ciprian, BILICI, Mihai, BELECA, Radu, DASCALESCU, Lucian. Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. *Journal of Food Engineering* [en ligne], juillet 2009, vol. 93, n°1, p. 114-124. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.003>

[32] ROUAU, Xavier, GHIZZY, Gabriela, HEMERY, Youna, BARRON, Cécile, LULLIEN-PELLERIN, Valérie, ABECASSIS, Joël. *Dry Refinery of Plant Material for Green Chemistry* [en ligne] : Journées Biopolymères, Biomatériaux, Chimie verte, 4-5 décembre 2008, La Baule (France). Disponible à l'adresse :

https://colloque2.inra.fr/chimie_verte_nantes/content/download/625/6336/file/O06%20Rouau%20Xavier.pdf

[33] BEAUGRAND, Johnny. *Bases cytologiques et moléculaires de la dégradation enzymatique du son de blé tendre* [en ligne]. Thèse de doctorat : biochimie. Reims : Université de Reims Champagne-Ardenne, 2004. Disponible à l'adresse :

<http://ebureau.univ-reims.fr/slide/files/quotas/SCD/theses/exl-doc/GED00000039.pdf>

[34] BARRON, Cécile, SURGET, Anne, ROUAU, Xavier. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science* [en ligne], janvier 2007, vol. 45, n°1, p. 88-96. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2006.07.004>

[35] PARKER, Mary L., NG, Annie, WALDRON, Keith W.. The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [en ligne], décembre 2005, vol. 85, n°15, p. 2539-2547. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2304>

[36] DUPONT, M. Susan, SELVENDRAN, Robert R.. Hemicellulosic polymers from the cell walls of beeswing wheat bran: Part I, polymers solubilised by alkali at 2°. *Carbohydrate Research* [en ligne], juin 1987, vol. 163, n°1, p. 99-113. Disponible à l'adresse :

[http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80169-6](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(87)80169-6)

[37] CHUNDAWAT, Shishir P.S., BECKHAM, Gregg T., HIMMEL, Michael E., DALE, Bruce E.. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* [en ligne], juillet 2011, vol. 2, p. 121-145. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205>

[38] COSGROVE, Daniel J.. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [en ligne], novembre 2005, vol. 6, n°11, p. 850-861. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1038/nrm1746>

[39] BALLERINI, Daniel. *Les biocarburants. Répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports*. Paris (France) : Technip, 2011. 381 p. ISBN : 978-2710809692.

[40] GIDENNE, T.. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* [en ligne], juin 2003, vol. 81, n°2-3, p. 105-117. Disponible à l'adresse :

[http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00301-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00301-9)

[41] HOPKINS, William G.. *Physiologie végétale*. Bruxelles (Belgique) : De Boeck, 2003. 514 p. ISBN : 978-2744500893.

[42] VARNAI, Anikó, SIIKA-AHO, Matti, VIIKARI, Liisa. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme and Microbial Technology* [en ligne], mars 2010, vol. 46, n°3-4, p. 185-193. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.12.013>

[43] MOHNEN, Debra. *Plant cell walls* [en ligne]. 2006. Disponible à l'adresse :

<http://www.ccrc.uga.edu/~dmohnen/bcmb8020/PlantWall-06-2page.pdf>

[44] JUNG, H.G., ALLEN, M.S.. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* [en ligne], septembre 1995, vol. 73, n°9, p. 2774-2790. Disponible à l'adresse :

<http://www.journalofanimalscience.org/content/73/9/2774.long>

[45] PERCIVAL ZHANG, Y.-H.. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [en ligne], mai 2008, vol. 35, n°5, p. 367-375. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-007-0293-6>

[46] PERCIVAL ZHANG, Y.-H., HIMMEL, Michael E., MIELENZ, Jonathan R.. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* [en ligne], septembre-octobre 2006, vol. 24, n°5, p. 452-481. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>

[47] GRAOULLY. Structure de la cellulose. *Wikipédia* [image numérique]. 25 août 2006. [Consulté le 10 décembre 2012]. Disponible à l'adresse :

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0a/Polym%C3%A8re_cellulose.PNG

[48] LAGHI.I. Cellulose strands. *Wikipédia* [image numérique]. 27 novembre 2007. [Consulté le 10 décembre 2012]. Disponible à l'adresse :

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c3/Cellulose_strand.jpg

[49] BAZOOYAR, Faranak, MOMANY, Frank A., BOLTON, Kim. Validating empirical force fields for molecular-level simulation of cellulose dissolution. *Computational and Theoretical Chemistry* [en ligne], mars 2012, vol. 984, p. 119-127. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.comptc.2012.01.020>

[50] HIMMEL, Michael E., DING, Shi-You, JOHNSON, David K., ADNEY, William S., NIMLOS, Mark R., BRADY, John W., FOUST, Thomas D.. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* [en ligne], février 2007, vol. 315, n°5813, p. 804-807. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1126/science.1137016>

[51] BROWN, R. Malcolm Jr.. Cellulose structure and biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry* [en ligne], 1999, vol. 71, n°5, p. 767-775. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1351/pac199971050767>

[52] WERTZ, Jean-Luc. Les hémicelluloses. Note de synthèse. 15 novembre 2011. ValBiom. Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Disponible à l'adresse :

<http://www.valbiom.be/files/gallery/leshemicelluloses1323437241.pdf>

[53] KUMAR, Raj, SINGH, Sompal, SINGH, Om V.. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [en ligne], mai 2008, vol. 35, n°5, p. 377-391. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0327-8>

[54] NOGAWA, Masahiro, YATSUI, Kenji, TOMIOKA, Akiko, OKADA, Hirofumi, MORIKAWA, Yasushi. An α -L-Arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* Containing a Noncatalytic Xylan-Binding Domain. *Applied and Environmental Microbiology* [en ligne], septembre 1999, vol. 65, n°9, p. 3964-3968. Disponible à l'adresse :

<http://aem.asm.org/content/65/9/3964.full.pdf+html>

[55] BRILLOUET, Jean-Marc. Investigation of the structure of a heteroxyylan from the outer pericarp (beeswing bran) of wheat kernel. *Carbohydrate Research* [en ligne], janvier 1987, vol. 159, n°1, p. 109-126. Disponible à l'adresse :

[http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90009-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90009-0)

[56] SAULNIER, Luc, GUILLON, Fabienne, CHATEIGNER-BOUTIN, Anne-Laure. Cell wall deposition and metabolism in wheat grain. *Journal of Cereal Science* [en ligne], juillet 2012, vol. 56, n°1, p. 91-108. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.02.010>

[57] CUI, Steve W., WANG, Qi. Cell wall polysaccharides in cereals: chemical structures and functional properties. *Structural Chemistry* [en ligne], avril 2009, vol. 20, n°2, p. 291-297. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1007/s11224-009-9441-0>

[58] ALIMARDANI-THEUIL, Parissa, GAINVORS-CLAISSE, Angélique, DUCHIRON, Francis. Yeasts: An attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry* [en ligne], août 2011, vol. 46, n°8, p. 1525-1537. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.010>

- [59] ANTOINE, Carole, PEYRON, Stéphane, MABILLE, Frédéric, LAPIERRE, Catherine, BOUCHET, Brigitte, ABECASSIS, Joël, ROUAU, Xavier. Individual Contribution of Grain Outer Layers and Their Cell Wall Structure to the Mechanical Properties of Wheat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en ligne], mars 2003, vol. 51, n°7, p. 2026-2033. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1021/jf0261598>
- [60] SAULNIER, Luc, SADO, Pierre-Etienne, BRANLARD, Gérard, CHARMET, Gilles, GUILLON, Fabienne. Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science* [en ligne], novembre 2007, vol. 46, n°3, p. 261-281. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.014>
- [61] WERTZ, Jean-Luc. La lignine. Note de synthèse. 22 novembre 2010. ValBiom. Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Disponible à l'adresse : <http://www.valbiom.be/files/gallery/rapportlignine2411101294320328.pdf>
- [62] CAMARERO, S., BOCCHINI, P., GALLETTI, G.C., MARTINEZ, M.J., MARTINEZ, A.T. Compositional changes of wheat lignin by a fungal peroxidase analyzed by pyrolysis-GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [en ligne], avril 2001, vol. 58-59, p. 413-423. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2370\(00\)00115-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2370(00)00115-7)
- [63] MOSIER, Nathan, WYMAN, Charles, DALE, Bruce, ELANDER, Richard, LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, Mark, LADISCH, Michael. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* [en ligne], avril 2005, vol. 96, n°6, p. 673-686. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- [64] TALEBNIA, Farid, KARAKASHEV, Dimitar, ANGELIDAKI, Irini. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* [en ligne], juillet 2010, vol. 101, n°13, p. 4744-4753. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>
- [65] ALVIRA, P., TOMAS-PEJO, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M.J.. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* [en ligne], juillet 2010, vol. 101, n°13, p. 4851-4861. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>

[66] PALMQVIST, Eva, HAHN-HAGERDAL, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* [en ligne], août 2000, vol. 74, n°1, p. 25-33. Disponible à l'adresse :

[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)

[67] ARANTES, Valdeir, SADDLER, Jack N.. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* [en ligne], février 2010, vol. 3, n°4. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>

[68] BANSAL, Prabuddha, HALL, Mélanie, REALFF, Matthew J., LEE, Jay H., BOMMARIUS, Andreas S.. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances* [en ligne], novembre-décembre 2009, vol. 27, n°6, p. 833-848. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.005>

[69] HENRISSAT, B., DRIGUEZ, H., VIET, C., SCHULEIN, M.. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nature Biotechnology* [en ligne], août 1985, vol. 3, p. 722-726. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0885-722>

[70] GUSAKOV, Alexander V.. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology* [en ligne], septembre 2011, vol. 29, n°9, p. 419-425. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>

[71] SHALLOM, Dalia, SHOHAM, Yuval. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* [en ligne], juin 2003, vol. 6, n°3, p. 219-228. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)

[72] CARVALHEIRO, Florbela, DUARTE, Luís C., GIRIO, Francisco M.. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research* [en ligne], novembre 2008, vol. 67, n°11, p. 849-864.

[73] *ExplorEnz – The Enzyme Database* [en ligne]. [Consulté le 26/12/2012]. Disponible à l'adresse : <http://www.enzyme-database.org/index.php>

[74] MONTENECOURT, Bland S., EVELEIGH, Douglas E.. Selective Screening Methods for the Isolation of High Yielding Cellulase Mutants of *Trichoderma reesei*. In : BROWN, Ross D., JURASEK, Lubo. *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis, Advances in Chemistry Series* [en ligne]. Washington D.C. (Etats-Unis d'Amérique) : American Chemical Society, juin 1979, vol. 181, p. 289-301. 399 p. ISBN: 978-0841204607. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1021/ba-1979-0181.ch014>

[75] BHAT, M.K., BHAT, S.. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* [en ligne], 1997, vol. 15, n°3-4, p. 583-620. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(97\)00006-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00006-2)

[76] ENARI, T.-M., MARKKANEN, P.. Production of Cellulolytic Enzymes by Fungi. *Advances in Biochemical Engineering* [en ligne], 1977, vol. 5, p. 1-24. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1007/BFb0008739>

[77] EVELEIGH, Douglas E.. Reducing the cost of cellulase production – Selection of the hypercellulolytic *Trichoderma reesei* Rut-C30 mutant. A general review of the Rutgers cellulase program supported by the Department of Energy (SERI) [en ligne]. 15 juillet 1982. Disponible à l'adresse : <http://infohouse.p2ric.org/ref/35/34587.pdf>

[78] MARTINEZ, Diego, et al.. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology* [en ligne], mai 2008, vol. 26, n°5, p. 553-560. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1403>

[79] CEN, Peilin, XIA, Liming. Production of Cellulase by Solid-State Fermentation. In : TSAO, G.T., et al.. *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* [en ligne]. Berlin (Allemagne) : Springer, septembre 1999, vol. 65, p. 69-92. 304 p. ISBN : 978-3540655770. Disponible à l'adresse : http://dx.doi.org/10.1007/3-540-49194-5_4

[80] LAJOIE, Denis. *Lactose hydrolases de Trichoderma reesei MCG-80* [en ligne]. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de maitre ès sciences. Laval (Canada) : Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Université Laval, 1997. Disponible à l'adresse : <http://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk2/ftp04/mq26227.pdf>

[81] PALONEN, Hetti. *Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose* [en ligne]. Dissertation for the degree of Doctor of Technology. Espoo (Finlande) : Helsinki University of Technology, 2004. Disponible à l'adresse :

<http://www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2004/P520.pdf>

[82] HOLKER, U., HOFER, M., LENZ, J.. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* [en ligne], avril 2004, vol. 64, n°2, p. 175-186. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>

[83] COMMISSION EUROPEENNE. *Aide d'Etat N 349/2007 – France. Soutien de l'Agence de l'innovation industrielle en faveur du programme OSIRIS* (C(2007) 4536 final) [en ligne]. Bruxelles, le 10.X.2007. Disponible à l'adresse : http://ec.europa.eu/eu_law/state_aids/comp-2007/n349-07.pdf

[84] SINGHANIA, Reeta Rani, SUKUMARAN, Rajeev K., PATEL, Anil Kumar, LARROCHE, Christian, PANDEY, Ashok. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* [en ligne], juin 2010, vol. 46, n°7, p. 541-549. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>

[85] HARRIS, Paul V., WELNER, Ditte, MCFARLAND, K.C., RE, Edward, NAVARRO POULSEN, Jens-Christian, BROWN, Kimberly, SALBO, Rune, DING, Hanshu, VLASENKO, Elena, MERINO, Sandy, XU, Feng, CHERRY, Joel, LARSEN, Sine, LO LEGGIO, Leila. Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry including biophysical chemistry and molecular biology* [en ligne], avril 2010, vol. 49, n°15, p. 3305-3316. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1021/bi100009p>

[86] HOLKER, Udo, LENZ, Jürgen. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology* [en ligne], juin 2005, vol. 8, n°3, p. 301-306. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.006>

- [87] PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* [en ligne], mars 2003, vol. 13, n°2-3, p. 81-84. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- [88] DUCHIRON, Francis, COPINET, Estelle. Fermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur* [en ligne]. 10 mai 2011. Référence BIO620. Disponible à l'adresse : <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/concepts-equipements-et-reglementations-des-biotechnologies-42164210/fermentation-en-milieu-solide-fms-bio620/#>
- [89] ASSAMOI, Allah Antoine, DESTAIN, Jacqueline, THONART, Philippe. Aspect microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* [en ligne], 2009, vol. 13, n°2, p. 281-294. Disponible à l'adresse : <http://www.bib.fsagx.ac.be/base/text/v13n2/281.pdf>
- [90] RAHARDJO, Yovita S.P., TRAMPER, Johannes, RINZEMA, Arjen. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances* [en ligne], mars-avril 2006, vol. 24, n°2, p. 161-179. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>
- [91] GRIFFIN, D.M.. Water and Microbial Stress. In : ALEXANDER, M., *Advances in Microbial Ecology* [en ligne]. s.l. : Springer, 1981, vol. 5, p. 91-136. 262 p. Disponible à l'adresse : http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8306-6_3
- [92] RODRIGUEZ COUTO, S., SANROMAN, M.A.. Application of solid-state fermentation to lignolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* [en ligne], février 2005, vol. 22, n°3, p. 211-219. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.013>
- [93] MUROOKA, Yoshikatsu, YAMSHITA, Mitsuo. Traditional healthful fermented products of Japan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [en ligne], août 2008, vol. 35, n°8, p. 791-798. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0362-5>

[94] BOURGEOIS, C.M., LARPENT, J.-P.. *Microbiologie Alimentaire : Tome 2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Paris (France) : Tec & Doc Lavoisier, 1996. Sciences et techniques agro-alimentaires. 523 p. ISBN : 978-2743008826.

[95] MANPREET, S., SAWRAJ, S., SACHIN, D., PANKAJ, S., BANERJEE, U.C.. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology* [en ligne], 2005, vol. 1, n°2, p. 1-9. Disponible à l'adresse : <http://web.usm.my/mjm/issues/vol1no2/review1.pdf>

[96] RAIMBAULT, Maurice. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* [en ligne], décembre 1998, vol. 1, n°3, p. 174-188. Disponible à l'adresse : <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/9/9.PDF>

[97] DURAND, Alain. La fermentation en milieu solide. *Biofutur* [en ligne], septembre 1998, n°181, p. 41-43. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S0294-3506\(98\)80171-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0294-3506(98)80171-3)

[98] KRISHNA, Chundakkadu. Solid-State Fermentation System-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology* [en ligne], 2005, vol. 25, n°1-2, p. 1-30. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1080/07388550590925383>

[99] SMITH, John E., BERRY, David R., KRISTIANSEN, Bjorn. *The Filamentous Fungi: Fungal Technology*. Londres (Royaume-Uni) : Edward Arnold, 1983. 416 p. ISBN : 978-0713128574.

[100] SANDHYA, Chandran, SUMANTHA, Alagarsamy, SZAKACS, George, PANDEY, Ashok. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* [en ligne], juillet 2005, vol. 40, n°8, p. 2689-2694. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>

[101] COUTO, Susana Rodríguez, ANGELES SANROMAN, Ma. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering* [en ligne], octobre 2006, vol. 76, n°3, p. 291-302. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>

[102] MANDELS, Mary, WEBER, James. The Production of Cellulases. In: HAJNY, George J., REESE, Elwyn T.. *Cellulases and Their Applications, Advances in Chemistry Series* [en ligne]. Washington D.C. (Etats-Unis d'Amérique) : American Chemical Society, juin 1969, vol. 95, pp. 391-414. ISBN : 978-0841200951. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023>

[103] HARI KRISHNA, S., CHOWDARY, G.V.. Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en ligne], avril 2000, vol. 48, n°5, p. 1971-1976. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1021/jf991296z>

[104] SOUPPE, Jérôme. Communication personnelle, 2012 : jsoupe.lyven@soufflet-group.com.

[105] BERNFELD, Peter. Amylases, alpha and beta. In : COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O.. *Methods in Enzymology*. New York (Etats-Unis d'Amérique) : Academic Press, 1955, vol. 1, p. 149-158.

[106] BRADFORD, Marion M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* [en ligne], 1976, vol. 72, n°1-2, p. 248-254. Disponible à l'adresse :

<http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lab-bioq-gen/archivos/Bradford%201976.pdf>

[107] GHOSE, T.K.. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* [en ligne], 1987, vol. 59, n°2, p. 257-268. Disponible à l'adresse :

<http://www.iupac.org/publications/pac/59/2/0257/>

[108] NORKRANS, Birgitta. Studies of β -glucoside- and Cellulose Splitting Enzymes from *Polyporus annosus* Fr. *Physiologia Plantarum* [en ligne], janvier 1957, vol. 10, n°1, p. 198-214. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1957.tb07621.x>

[109] BAILEY, Michael J., BIELY, Peter, POUTANEN, Kaisa. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* [en ligne], mai 1992, vol. 23, n°3, p. 257-270. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)

[110] KAMM, B., KAMM, M.. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology* [en ligne], avril 2004, vol. 64, n°2, p. 137-145. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>

[111] BRETHAUER, Simone, STUDER, Michael H., YANG, Bin, WYMAN, Charles E.. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. *Bioresource Technology* [en ligne], mai 2011, vol. 102, n°10, p. 6295-6298. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.016>

[112] NARRA, Madhuri, DIXIT, Garima, DIVECHA, Jyoti, MADAMWAR, Datta, SHAH, Amita R.. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresource Technology* [en ligne], octobre 2012, vol. 121, p. 355-361. Disponible à l'adresse :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.140>

[113] EVERS, Tony, MILLAR, S.. Cereal Grain Structure and Development: Some Implications for Quality. *Journal of Cereal Science* [en ligne], novembre 2002, vol. 36, n°3, p. 261-284. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2002.0435>

[114] BASIC, A., STONE, B.A.. Chemistry and Organization of Aleurone Cell Wall Components From Wheat and Barley. *Australian Journal of Plant Physiology* [en ligne], 1981, vol. 8, n°5, p. 475-495. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1071/PP9810475>

[115] BEAUGRAND, Johnny, PAES, Gabriel, REIS, Danièle, TAKAHASHI, Masayuki, DEBEIRE, Philippe, O'DONOHUE, Michael, CHABBERT, Brigitte. Probing the cell wall heterogeneity of micro-dissected wheat caryopsis using both active and inactive forms of a GH11 xylanase. *Planta* [en ligne], octobre 2005, vol. 222, n°2, p. 246-257. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-005-1538-0>

[116] BENAMROUCHE, S., CRONIER, D., DEBEIRE, P., CHABBERT, B.. A Chemical and Histological Study on the Effect of (1→4)-β-endo-xylanase Treatment on Wheat Bran. *Journal of Cereal Science* [en ligne], septembre 2002, vol. 36, n°2, p. 253-260. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2001.0427>

[117] Directive 2003/30/CE du Parlement européen et du Conseil du 8 mai 2003 visant à promouvoir l'utilisation de biocarburants ou autres carburants renouvelables dans les transports. Journal officiel de l'Union européenne L 123 du 17 mai 2003, p. 42-46 [en ligne].

Disponible à l'adresse :

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:123:0042:0042:FR:PDF>

[118] COLONNA, Paul. Lexique. In : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. *Atelier de Réflexion Prospective. Quels végétaux et systèmes de production durables pour la biomasse dans l'avenir ?* [en ligne]. Date de dernière mise à jour : 19 novembre 2008. [Consulté le 16 janvier 2013]. Disponible à l'adresse :

http://www7.inra.fr/arpvega/s_informer/lexique

[119] CHRISTIAN, Delphine, JOLLY, Guillaume, GRENIER DE MARCH, Ghislaine, STEINMETZ, Vincent. La bioraffinerie : un concept qui fait son chemin. *Biofutur*, novembre 2007, n°282, p. 20-23.

[120] ORGANISATION DE COOPERATION ET DE DEVELOPPEMENT ECONOMIQUE (OCDE). *Définition statistique de la biotechnologie (mise à jour en 2005)* [en ligne]. [Consulté le 21 décembre 2012]. Disponible à l'adresse :

<http://www.oecd.org/fr/sti/biotech/definitionstatistiquedelabiotechnologiemiseajouren2005.htm>

[121] INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). *Glossary* [en ligne]. [Consulté le 21 décembre 2012]. Disponible à l'adresse : <http://www.iea.org/aboutus/glossary/>

[122] EUROSTAT. *Glossaire : Consommation intérieure brute d'énergie* [en ligne]. [Consulté le 22 décembre 2012]. Disponible à l'adresse :

http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Glossary:Gross_inland_energy_consumption/fr

[123] BRUNDTLAND, Gro Harlem. *Notre avenir à tous*. Rapport de la commission mondiale sur l'environnement et le développement de l'ONU, présidée par Madame Gro Harlem Brundtland [en ligne]. Avril 1987. Disponible à l'adresse :

http://www.diplomatie.gouv.fr/fr/sites/odyssee-developpement-durable/files/5/rapport_brundtland.pdf

[124] VICTOR, Jean-Christophe. *Le dessous des cartes : Itinéraires géopolitiques*. Paris (France) : Tallandier/ARTE, 2011. 223 p. ISBN : 978-2847348231.

[125] INSTITUT NATIONAL DE LA STATISTIQUE ET DES ETUDES ECONOMIQUES (INSEE). *Définitions* [en ligne]. Date de dernière mise à jour : 2 février 2013. [Consulté le 2 février 2013]. Disponible à l'adresse :

<http://www.insee.fr/fr/methodes/default.asp?page=definitions/liste-definitions.htm>

La fermentation en milieu solide est un bioprocédé pouvant éventuellement être utilisé comme technologie de rupture pour diminuer le coût des biocatalyseurs utilisés dans la conversion de biomasse lignocellulosique comme le son de blé. La première partie de ces travaux de recherche a donc étudié le potentiel de cette technologie par rapport à celle de fermentation en milieu submergé lors d'une comparaison en application. Plusieurs tests de saccharification ont ainsi été réalisés sur différentes matières premières (cellulose, son de blé) et ont permis de montrer l'avantage différenciateur des biocatalyseurs produits par fermentation en milieu solide. Ensuite, la deuxième partie de ces travaux de recherche a porté sur l'étude des facteurs de la récalcitrance du son de blé à l'hydrolyse enzymatique. Deux principaux facteurs ont ainsi pu être démontrés : un facteur physique, lié à l'accessibilité des biocatalyseurs aux polysaccharides, et un facteur biochimique, lié à l'absence ou à la faible présence de certaines activités enzymatiques (féruloyl estérase,...) dans le complexe enzymatique de *Trichoderma reesei* Rut-C30. Cette étude a également permis d'identifier l'origine des différentes fractions glucidiques hydrolysées et de déterminer le potentiel glucidique actuellement hydrolysable à partir de cette biomasse. Enfin, la dernière partie de ces travaux de recherche a été consacrée à l'étude pratique d'un concept innovant de procédé permettant de favoriser la conversion des polysaccharides contenus dans le son de blé. Une levée de la barrière physique au transfert de masse et par conséquent une validation de ce concept a finalement pu être réalisée.

Mots-clés : fermentation en milieu solide, fermentation en milieu submergé, comparaison, lignocellulose, son de blé, *Trichoderma reesei*.

Solid-state fermentation is a bioprocess that can optionally be used as disruptive technology to reduce the cost of biocatalysts used in the lignocellulosic biomass conversion like wheat bran. The first part of this research has explored the potential of this technology compared to submerged fermentation in an application comparison. Several saccharification tests have thus been carried on different feedstocks (cellulose, wheat bran) and have shown the differentiator advantage of biocatalysts produced by solid state fermentation. Then, the second part of this research has investigated the recalcitrance factors of wheat bran to enzymatic hydrolysis. Two main factors have thus been demonstrated: a physical factor, related to the accessibility of biocatalysts to the polysaccharides, and a biochemical factor, related to the absence or the low presence of some enzymatic activities (feruloyl esterase, ...) in the enzymatic complex of *Trichoderma reesei* Rut-C30. This study has also identified the origin of the various carbohydrate moieties hydrolyzed and has determined the carbohydrate potential currently releasable from this biomass. Finally, the last part of this research has been devoted to the practical study of an innovative concept of process to promote the conversion of polysaccharides in wheat bran. A removal of the physical barrier to mass transfer and therefore a validation of this concept has finally been achieved.

Keywords: solid-state fermentation, submerged fermentation, comparison, lignocellulose, wheat bran, *Trichoderma reesei*.
